UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CYRUS ANTÔNIO VILLAS BOAS

**Avaliação comportamental e eletrofisiológica da
atividade do córtex pré-frontal em processos de
tomada de decisões em ratos**

**Behavioral and electrophysiological evaluation of the
prefrontal cortex activity in decision-making processes in
rats**

São Paulo

2014

CYRUS ANTÔNIO VILLAS BOAS

**Avaliação comportamental e eletrofisiológica da
atividade do córtex pré-frontal em processos de
tomada de decisões em ratos**

**Behavioral and electrophysiological evaluation of the
prefrontal cortex activity in decision-making
processes in rats**

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

Área de concentração: Fisiologia Geral

Orientador: Dr. Gilberto Fernando Xavier - IB-USP

Co-orientador: Dr. Koichi Sameshima - FMUSP

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Villas-Boas, Cyrus Antônio

Avaliação comportamental e eletrofisiológica da atividade do córtex pré-frontal em processos de tomada de decisões em ratos / Cyrus Antônio Villas-Boas; orientador: Gilberto Fernando Xavier. São Paulo, 2014

161 f.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, 2014

1. Córtex pré-frontal. 2. Córtex orbitofrontal. 3. Córtex pré-frontal ventromedial. 4. Ansiedade. 5. Memória operacional. 6. Tomada de decisões. 7. Eletrofisiologia. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

Comissão Julgadora

Prof. (a) Dr (a) _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. (a) Dr (a) _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. (a) Dr (a) _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. (a) Dr (a) _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. (a) Dr (a) _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Tese defendida e aprovada em: ____/____/____

À minha família

*“O homem nasceu para aprender, aprender
tanto quanto a vida lhe permita.”*

- João Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Gilberto, não só pela confiança depositada em mim durante a execução deste e de outros trabalhos, mas também pela liberdade que me deu para discutir e colocar em prática minhas ideias. Mais ainda, por ter estado ao meu lado como professor, orientador e amigo durante minha longa jornada pelo IB. Não tenho como resumir aqui o quanto aprendi com sua extrema cautela em planejar e fazer ciência e com sua perícia em embasar discussões e dominar o conteúdo que estuda. Não poderia deixar de citar todo o apoio e suporte na montagem e manutenção de equipamentos de pesquisa, habilidades ímpares que renderam-lhe as merecidas alcunhas de prof. Pardal, MacGyver ou mestre dos acrílicos e que me ensinaram a exercitar a criatividade a fim de sempre buscar alternativas para que não se interrompa a execução de um experimento científico. Finalmente, agradeço por ter me dado um cérebro e por ter sido um dos grandes mentores em meu processo de crescimento e amadurecimento intelectual. E que venham novos experimentos, tanto científicos quanto cervejeiros.

Ao meu co-orientador, prof. Dr. Koichi Sameshima, que tão gentilmente me recebeu após meu retorno do Japão, depositando extrema confiança em minhas habilidades e em meu conhecimento apesar de me conhecer havia tão pouco tempo. Agradeço por ter cedido o equipamento

de registro eletrofisiológico, sem o qual este trabalho jamais poderia ter sido executado. Não poderia deixar de agradecer o convite para participar das cirurgias no Hospital Sírio-Libanês que, de maneira surpreendente, revelaram-me novas possibilidades de estudo e pesquisa.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a realização do presente estudo (processo FAPESP n. 2011/07804-2).

Aos funcionários do IB, que sempre estiveram presentes, em especial meu grande amigo Manoel, o Manú, único que esteve comigo no laboratório desde minha chegada em meados de 2004 até o fim, sempre de bom humor e solícito, cuidando do que mais importa para nossos experimentos: os ratos e a alegria.

Aos colegas do departamento, Brunão, Marceles, Toninho e Popetar (membros vitalícios do *Fisio Lounge*), que fizeram as risadas da hora do café da Suzi (a quem também agradeço), os desabafos, os questionamentos e as filosofias do dia. A todos os colegas de Biologia, em especial ao grande Ari pelos relaxantes, embora pouco frequentes, refrescos da tarde. Aos professores Frazão, pelas discussões, risadas e cervejas; ZéGui, pelos atendimentos médicos de emergência e pelas risadas baseadas em piadas tanto de bom quanto de mau gosto; Silvinha, pelas discussões e histórias interessantes; Pedro, o Físico, que embora não

seja oficialmente professor, considero como um dos maiores deste departamento.

Aos grandes amigos do Japão, Mariana e Matsumoto-san, com quem se deram início as discussões que iriam levar a este trabalho. Aos professores Hori e Nishijo, que me ensinaram as técnicas utilizadas no doutorado, técnicas estas que, sem dúvida, renderam grandes experiências de vida e aprendizado.

Aos amigos e colegas do Sírio-Libanês, Edgard, pelas orientações e resoluções de problemas, Taisa e Carol, pelas dicas e auxílio na montagem de eletrodos e nas cirurgias iniciais de implante e, em especial, ao André Coleman, com quem tive boas discussões e boas risadas no início do doutorado.

Aos colegas de laboratório, Elisa, Lívia, Carol, Aline, com quem tive discussões interessantes e divertidas em reuniões de laboratório. À nova geração do lab, Daniel e Mateus. Aos queridos, Felipão, Renata, Pavãozinho e Ilton, companheiros de experiências e de congressos e que fazem falta demais na rotina do lab.

À Barbara, que esteve presente por quase todos os momentos, que me ensinou a arte das neurocirurgias (sem dúvida, aprendi com a melhor), que (nem) sempre esteve de bom humor, sempre disposta a ajudar no que fosse preciso. Não poderia deixar de ressaltar o quanto aprendi com você, tanto em termos técnicos quanto intelectuais.

Aos mais que especiais Leopoldo Poldera e “Don” Diego, colegas de laboratório e de brodeiragem, amigos do peito, que sempre estiveram presentes em todos os momentos: momentos alegres, momentos em que eu não via muita graça no que falavam, momentos de zuera interminável (porque a zuera pode ser intermitente, mas não tem fim), momentos de tradicionais massagens do Diegão, momentos de nível 5 de refrescância, momentos de produção e/ou degustação cervejeira, momentos de discussão intelectual, de discussão da vida pessoal, de reflexões profundas e de reflexões não tão profundas assim e de elaboração de planos futuros, para muito além da vida de laboratório. Enfim, pessoas sem as quais essa jornada teria sido muito mais árdua e para quem, tenho certeza, ainda escreverei muitos agradecimentos futuros.

Agradeço à minha família, meus ídolos e minha inspiração, que me deram o coração para seguir meus sonhos e me deram apoio através de carinho e amor incondicionais durante toda a minha vida e, tenho certeza, até o final dela. Finalmente, agradeço à Fabi, meu amor, que passou pelo suportável e o insuportável ao meu lado para que nossas coisinhas dessem certo (e darão!), me dando a coragem para vestir meu sapato mágico e sair colocar em prática ideias malucas e ousadas.

Sumário

Resumo	11
Abstract	13
Lista de abreviaturas e siglas	15
1.Introdução	16
Breve histórico	17
Tomada de decisões	20
O córtex pré-frontal	27
Neurofisiologia da tomada de decisões	33
Tomada de decisões e avaliação de risco	41
2. Objetivos	47
3. Experimento 1	49
3.1. Materiais e Métodos	50
3.2. Resultados	55
3.3. Discussão	57
4. Experimento 2	60
4.1. Materiais e Métodos	61
4.2. Resultados	67
4.3. Discussão	74
4.4. Conclusão dos Experimentos 1 e 2	76
5. Experimento 3	79
5.1. Materiais e Métodos	80
5.2. Resultados	92
5.3. Discussão	96

6. Experimento 4	101
6.1. Materiais e Métodos	102
6.2. Resultados	108
6.3. Discussão	115
7. Discussão geral	119
8. Conclusão	131
Referências Bibliográficas	133
Apêndice I	149
Apêndice II	151
Apêndice III	156

RESUMO

As teorias mais influentes acerca do funcionamento do córtex pré-frontal (PFC) tomam essa estrutura como um córtex de associação e de integração de informações oriundas de outras estruturas nervosas. Isso implicaria na participação direta do PFC nos processos de memória operacional e em processos atencionais. Estudos psicológicos e neurofisiológicos sugerem, que o córtex orbitofrontal (OFC) seria responsável pela integração de informações de caráter sensorial, motivacional e afetivo, enquanto o córtex pré-frontal ventromedial (vmPFC) seria diretamente ligado ao OFC, tendo um papel crucial na codificação de estímulos emocionais oriundos da amígdala.

Nesse contexto, é aceito que a integração das informações feita por essas estruturas seja essencial para o processo de tomada de decisões, uma vez que esse comportamento necessita de uma avaliação do ambiente em termos de comparações de situações novas a experiências prévias armazenadas na memória, assim como um balanço entre custos, benefícios e cálculo de possíveis valores da recompensa.

Para testar essas hipóteses, ratos com danos seletivos no vmPFC foram submetidos testes de avaliação de ansiedade e medo condicionado no paradigma de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE), assim como a testes de memória de referência espacial e memória operacional no

labirinto aquático de Morris. Outro grupo de animais teve matrizes de multi-eletrodos implantadas no OFC para a avaliação da atividade neuronal dessa estrutura em um teste envolvendo tomada de decisões, no qual devem escolher entre ganhar 1 *pellet* de chocolate imediatamente ou 4 *pellets* envolvendo atrasos variados.

No teste no LCE, animais com lesão no vmPFC diferem dos animais controle por apresentarem uma diminuição do tempo de avaliação de risco sem apresentar alterações nos parâmetros que aferem memória, atividade locomotora e ansiedade. No teste de memória de referência espacial após treinamento extensivo de busca pela plataforma em um mesmo local no labirinto aquático, animais com lesão persistem no local quando se retira a plataforma (*probe test*). Já no teste de memória operacional, no qual a localização da plataforma é alterada diariamente, esses animais não diferem do grupo controle. Na tarefa envolvendo tomada de decisões, observou-se uma atividade eletrofisiológica de neurônios do OFC relacionada ao momento crítico no qual o animal deve realizar uma escolha.

Em conjunto, esses resultados mostram que o vmPFC está relacionado à flexibilidade comportamental e tomada de decisões, possivelmente em conjunto com o OFC, cuja atividade neuronal sugere uma participação nos processos de tomada de decisões e de elaboração de estratégias.

ABSTRACT

The most influential theories on the function of the prefrontal cortex (PFC) suggest that this structure is an association cortex, responsible for integration of information received from other parts of the brain. This would implicate in direct participation of the PFC in working memory and attentional processes. Given this context, hodological and neurophysiological studies suggest that the orbitofrontal cortex (OFC) would be responsible for the integration of sensory, motivational and affective aspects, while the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC), which is directly connected to the OFC, would have a key role in encoding emotional stimuli from the amygdala.

It is well accepted that the processing of these aspects of information is crucial for decision-making processes, given the fact that this expression of behavior requires an evaluation of the environment in terms of comparing novel situation to previous experiences, as well as processing the balance between costs, outcomes and reward values.

In order to test these hypotheses, rats with selective lesions to the vmPFC were subjected to the elevated plus maze (EPM) to evaluate anxiety and conditioned fear in the test retest paradigm. Animal were also tested in a spatial reference memory and a working memory tasks in the Morris water maze. Another group of rats had multi-electrode arrays

chronically implanted in the OFC for the evaluation of the neuronal activity during a decision-making task, in which the animals had to choose between a small reward of one chocolate pellet immediately and a large reward of four chocolate pellets after varying delays.

The results of the EPM show that animals with lesion to the vmPFC differ from control animals by showing diminished time evaluating risk in the second exposure to the EPM, without damage to locomotor activity, memory and anxiety levels. In the reference spatial memory task in the water maze, after extensive training searching for the hidden platform in the same location, lesioned animals persisted searching for the platform in that particular location after it was removed (probe test). However, in the working memory task, in which the platform is presented in a different location each day, lesioned animals did not differ from control animals. In the decision-making task, differential electrophysiological activity in OFC neurons was observed, particularly in the moment of the task in which the animal was required to perform the choice between rewards.

Together, these results suggest that the vmPFC is related to behavioral flexibility and decision-making, possibly acting together with the OFC, which neuronal activity suggests participation in decision-making processes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- PFC** – córtex pré-frontal
- OFC** - córtex orbitofrontal
- vmPFC** – córtex pré-frontal ventromedial
- IPFC** – córtex pré-frontal lateral
- ACC** – córtex cingulado anterior
- BLA** – complexo basolateral da amígdala
- SAS** – Sistema Atencional Supervisor
- EPM** – *elevated plus maze*
- LCE** – labirinto em cruz elevado
- IGT** – *Iowa Gambling Task*
- PTSD** – transtorno de estresse pós-traumático
- AP** – ântero-posterior
- ML** – médio-lateral
- DV** – dorso-ventral
- ITI** – intervalo entre tentativas
- LED** – diodo emissor de luz
- BC** – buraco central
- BL** – buraco lateral
- BD** – buraco da direita
- BE** – buraco da esquerda
- PCA** – análise de componentes principais
- ANOVA** – análise de variância
- GLM** – *General Linear Model*

1. Introdução

Breve histórico

O início dos estudos sobre tomada de decisões remonta ao início da Economia Clássica, que, por sua vez, teve início com a publicação da obra de Adam Smith, *A Riqueza das Nações*, em 1776. Essa obra é um marco nos estudos de Economia, que descrevia fenômenos críticos para o entendimento do comportamento de escolha e como essas diferentes escolhas podiam influenciar a atividade de mercado. A obra de Adam Smith trata, na essência, de ensaios psicológicos a respeito do comportamento humano frente às possibilidades presentes no mercado.

Essa obra apresentava uma abordagem utilitária, ou seja, que remontava ao Princípio do Utilitarianismo ou Teoria da Utilidade, escola de pensamento vigente na época e utilizada ainda hoje, embora com modificações. Utilidade, neste contexto, é uma medida de satisfação relativa, usado em Economia para explicar o comportamento econômico como um meio de se aumentar ou diminuir a utilidade de uma escolha. Esse princípio preconiza que as escolhas são feitas a fim de maximizar a utilidade dos resultados, ainda que os benefícios não sejam os máximos possíveis.

O que se seguiu ao período clássico foi um intervalo no qual as teorias econômicas se tornaram muito heterogêneas. Nos anos 1930, Paul Samuelson desenvolveu a teoria que viria a transformar a Economia e daria

início à revolução neoclássica, a teoria da preferência revelada (“*revealed preference*”). Essa teoria abordava matematicamente como uma escolha binária com uma preferência previamente conhecida poderia influenciar a atividade de mercado. A partir dessa teoria, no período neoclássico, novas ideias surgiram, fortalecendo cada vez mais estudos na área de decisão.

Em 1944, von Neumann e Morgenstern desenvolveram a Teoria dos Jogos, que leva em conta situações envolvendo mais de um “jogador”, em oposição às teorias individualistas anteriores. Essa nada mais é do que um caso particular da Teoria da Utilidade, onde os resultados são influenciados por outras escolhas simultâneas feitas por outros “jogadores”. O risco que é levado em conta nessa abordagem acabou por maximizar a teoria proposta por Nicholas Bernoulli em 1713, a Teoria da Utilidade Esperada, que leva em conta escolhas envolvendo risco.

Foi dentro desse contexto bem estruturado da Economia neoclássica que começaram, então, a surgir as primeiras teorias cognitivas a respeito dos processos de tomada de decisões. Em 1957, Herbert Simon, estudioso das ciências cognitivas, propôs seu modelo de racionalidade limitada, no qual admite que as decisões são satisfatórias e não maximizadas. Isso ocorre devido às habilidades limitadas de processamento de informações, uma vez que os “jogadores” são capazes de explorar somente um número limitado de alternativas por decisão. Dessa forma, um resultado mínimo

satisfatório é aceito e escolhido em oposição a um resultado máximo possível.

Baseados na teoria de Simon, os psicólogos Kahneman e Tversky (1979) mostraram, por meio de experimentos envolvendo julgamentos e decisões, que muitos resultados não se encaixavam na Teoria da Utilidade Esperada descrita anteriormente. Foi assim que economistas, psicólogos e neurocientistas que buscavam explicar os fenômenos envolvidos nos processos de tomada de decisões, começaram a unificar suas teorias para um melhor entendimento desses processos. Deu-se então o início de estudos sobre decisões que envolviam risco (quando se sabe a probabilidade de se obter determinado resultado, e.g., loteria) e incerteza (quando a probabilidade de um resultado é de previsão impossível em um jogo honesto, e.g., corrida de cavalos), definidos separadamente por Frank Knight, em 1921.

Nesse contexto, a Neuroeconomia se propõe a auxiliar a Neurociência na interpretação dos mecanismos neurais envolvidos nos processos de tomada de decisões fornecendo uma base teórica e matemática bem estruturada. A Teoria dos Jogos fornece uma base para esses estudos, uma vez que relaciona estratégias envolvendo um ou múltiplos indivíduos de acordo com seu contexto e resultados possíveis.

Tomada de decisões

Decisões são tidas como processos cognitivos envolvendo incerteza, que abrangem a seleção de uma entre várias alternativas, resultando em uma escolha. Esta é baseada em um propósito ou orientada a um objetivo definido, uma recompensa. Essa, por sua vez, é um evento que aumenta a probabilidade ou taxa de execução de um comportamento quando este evento é dependente daquele comportamento, ou seja, envolve a aquisição de novas informações acerca dos contingentes vigentes, seu processamento e o confronto com informações previamente adquiridas (Glimcher *et al.*, 2009). A avaliação de alternativas e escolhas requer uma integração de diferentes estímulos com variáveis como a magnitude do ganho (“*payoff*”) envolvendo aquela ação, probabilidade de sucesso e avaliação dos contingentes que envolvem o dilema da escolha, como custos relacionados ao tempo e esforço despendidos (Bautista *et al.*, 2001; Kennerley and Wallis, 2009; Kahneman e Tversky, 1979; Stephens e Krebs, 1986).

Atualmente, decisões são classificadas em três categorias, duas das quais são objeto de estudo do presente trabalho: (1) tomada de decisões perceptual, (2) tomada de decisões baseada em valores e (3) tomada de decisões em contexto social.

A tomada de decisões perceptual se dá no âmbito das informações sensoriais que chegam ao sistema nervoso. Entretanto, como os estímulos

sensoriais nunca ou raramente são isentos de interferência externa, faz-se necessário um sistema que tome uma decisão acerca do próprio estímulo, sendo essa geralmente implícita (Heekeren, 2008). Esse tipo de tomada de decisões é influenciado também por fatores como a memória ou representação prévia que se tem de estímulos similares, de fatores atencionais e da complexidade do estímulo (Ridderinkoff *et al.*, 2004; Ullsperger *et al.*, 2004).

Por ser um sistema basal de recepção e interpretação de informações, não há como dissociar essa modalidade de tomada de decisões das demais. Esse sistema é caracterizado atualmente por conter quatro módulos principais com funções distintas entre si: (1) o primeiro módulo acumula e compara evidências sensoriais com informações prévias armazenadas; (2) o segundo detecta as interferências e as dificuldades contidas no sinal e recruta sistemas atencionais para que se desempenhe a tarefa com maior chance de se obter resultados satisfatórios; (3) o terceiro promove a representação das diversas variáveis de decisão, indicando as possíveis escolhas a serem feitas, além de recrutar neurônios das áreas pré-motora e motora; (4) o quarto faria a supervisão e o monitoramento da ação executada, detectando possíveis erros e ajustando os comportamento a fim de se obter resultados otimizados (Heekeren, 2008; Mazurek *et al.*, 2003). Um experimento simples acerca de tomada de decisões perceptual foi feito com o intuito de se registrar as regiões neurais envolvidas nesse

processamento por meio de ressonância magnética funcional (Heekeren *et al.*, 2004). Voluntários sentados em frente a um computador que mostrava imagens nítidas ou borradas de uma face e de uma casa deveriam decidir a qual desses dois objetos as imagens correspondiam (Figura 1.1). Haveria uma “fronteira de decisão”, uma figura na qual o ruído seria baixo a ponto de ser filtrado de forma eficiente o suficiente para que se decidisse, inequivocamente, a qual classe a figura pertencia. Essa fronteira dependeria da filtragem do estímulo ruidoso e da avaliação das suas características (Freedman *et al.*, 2002) o que, de acordo com Heekeren *et al.* (2004), seria feito pela parte dorso-lateral do córtex pré-frontal.

Curiosamente, os autores observaram que o nível de ruído nas imagens era inversamente proporcional aos níveis de atividade eletrofisiológica de diferentes áreas na via visual ventral, o que permitiu

Figura 1.1 - sujeitos deveriam decidir o que cada imagem significava. A dificuldade se dava devido às quantidades de ruído presentes nas figuras. **a** – porcentagem de respostas corretas; **b** – exemplo das imagens apresentadas. Retirado de Heekeren *et al.* (2004).

que se explorasse a evidência de que casas e faces ativam seletivamente locais diferentes do córtex temporal ventral (Ishai *et al.*, 1999).

A tomada de decisões baseada em valores é o objeto de estudo principal da Neuroeconomia. Embora não seja tão basal quanto a tomada de decisões perceptual, a tomada de decisões baseada em valores se vale de sistemas de memória e da comparação de acontecimentos prévios com o presente, estando presente no repertório comportamental de diversos grupos de animais. Exemplos incluem desde o forrageamento em insetos até decisões complexas presentes no comportamento humano, como transações financeiras e investimento no mercado de ações.

Esse tipo de decisão é baseada em valores subjetivos atribuídos a eventos de acordo com experiências prévias, não havendo certo ou errado, mas sim maior ou menor vantagem (Rangel *et al.*, 2008). Uma vez que se trata de valores subjetivos, a informação na qual a decisão é baseada contém grande conteúdo emocional. Dessa forma, não são só reforçadores primários que guiam o comportamento, mas também reforçadores secundários. No caso de humanos, um exemplo de reforçador secundário é o dinheiro, um estímulo em princípio neutro que, dada a sua função na sociedade, ganha subjetivamente um elevado valor reforçador (Wallis, 2007).

Rangel *et al.* (2008) propõem um modelo envolvendo cinco etapas para que se dê uma tomada de decisões baseada em valores. Inicialmente,

os contingentes relacionados ao problema teriam uma representação baseada na gama de possíveis ações e nos meios internos e externos no qual se encontra o indivíduo. A seguir, as possíveis ações seriam avaliadas e, a cada uma, seria atribuído um valor de acordo com as características do ganho. Posteriormente a ação seria selecionada e os resultados poderiam ser avaliados, sendo armazenados para decisões futuras. É interessante notar que as informações acerca de experiências prévias são utilizadas em todas as etapas da decisão, sugerindo a importância do sistema emocional e de memória não só na atribuição de significado à decisão, mas também ao processo de escolha em si (Figura 1.2). A estrutura chave apontada por

Figura 1.2 - computação básica envolvida em uma escolha baseada em valores. O processo pode ser separado em cinco módulos que se conectam entre si para gerar uma resposta. Retirado de Rangel *et al.* (2008).

esses autores seria o OFC. Dada sua conectividade elevada com áreas como o hipocampo e amígdala, essa estrutura atuaria como um centro de integração de diversas modalidades sensoriais, informações emocionais e motivacionais para, no sistema de memória operacional, arquitetar uma resposta comportamental em conjunto com outras estruturas frontais, como o córtex pré-frontal medial e o córtex pré-frontal dorsolateral (Wallis, 2007) (Figura 1.3). Já o processo de tomada de decisões em contexto social, embora não abordado no presente trabalho, vale-se dos demais processos descritos anteriormente para criar representações acerca de interações sociais. Essa capacidade é desenvolvida em animais sociais, particularmente aqueles com o córtex frontal desenvolvido, em especial primatas e humanos. Interações sociais são usualmente complexas e desestruturadas, requerendo uma integração grande de diversos tipos de estímulos com o intuito de se compreender ou de gerar expectativas acerca de outro indivíduo (Dziobek *et al.*, 2008; Heekeren *et al.*, 2005). Baseando-se nessas características acerca do outro, podemos gerar previsões e, com isso, alterar nosso comportamento com a finalidade de ajustar a interação com o outro. É nessa categoria de tomada de decisões que se inserem comportamentos altamente complexos, como a geração de empatia, senso de justiça e injustiça, compaixão, e comportamentos morais em geral (Prehn *et al.*, 2008). A Neuroeconomia também aborda esse tipo de tomada

de decisões se utilizando de jogos que envolvem mais de um jogador, risco e incerteza.

Figura 1.3 - modelo dos mecanismos neurais envolvidos nos processos de tomada de decisões no córtex pré-frontal. Retirado de Wallis (2007).

O córtex pré-frontal

O córtex pré-frontal (PFC) é definido por alguns autores como a parte do córtex que recebe projeções do núcleo médio-dorsal do tálamo (Fuster, 2008), embora se conecte a diversas outras estruturas do encéfalo, conferindo uma grande capacidade associativa a essa região. Resultados de estudos envolvendo lesão excluem tanto a possibilidade de uma homogeneidade funcional relacionada ao PFC, dada a sua enorme complexidade anatômica, quanto a de um papel único no sistema nervoso.

Sendo um córtex predominantemente associativo e voltado a ações, o PFC é tido como um regulador no sistema nervoso por meio de conexões, aferências e eferências com diversas outras regiões (Arnsten, 2009). O PFC é usualmente dividido em regiões ventromediais e dorsolaterais, sendo ambas as regiões conectadas a regiões encefálicas posteriores e subcorticais. A região ventromedial apresenta conexões recíprocas com regiões relacionadas com processamento emocional (amígdala), memória (hipocampo) e áreas corticais de processamento superior, enquanto a região dorsolateral possui conexões recíprocas a regiões associadas ao controle motor (núcleos da base, córtex pré-motor e área motora suplementar), monitoramento de estímulos ambientais (córtex cingulado) e áreas de processamento sensorial superiores (Wood e Grafman, 2003). Essas conexões indicam que o PFC é candidato a executar funções de

integração entre informações emocionais, sensoriais e experiências prévias adquiridas, sendo essencialmente integrativas e dirigidas a objetivos (Miller e Cohen, 2001).

Entre as diversas funções atribuídas ao PFC, três merecem papel de maior destaque. São elas (1) o planejamento, (2) tomada de decisões e (3) atenção executiva, sendo essa última, das mais relevantes para a integração de informações e, de certa forma, indispensável às duas primeiras. Um dos componentes principais da atenção executiva é a memória operacional, que embora não se localize especificamente no PFC, necessita de sua ação constante para ser mantida (Fuster, 2008). Estudos em primatas não humanos mostram que células piramidais do PFC apresentam maior número de ramificações, o que confere uma maior capacidade de receberem aferências do que outras células piramidais em regiões distintas do córtex (Elston, 2000). Essa seria uma possível explicação para a enorme capacidade integrativa do PFC, que seria capaz de criar uma “anotação mental” (“*mental sketch pad*”), termo cunhado por Alan Baddeley (Baddeley, 1986) ao descrever o sistema de memória operacional, atualizado em Baddeley (2000), dos estímulos ambientais (Figura 1.4). Nesse sistema, uma central executiva denominada sistema atencional supervisor (SAS), controlaria a manutenção de informações relevantes de natureza visual ou auditiva, respectivamente em uma alça visuo-espacial e

uma alça fonológica. Em caso de grande relevância de determinada informação, ela pode ser arquivada temporariamente em um retentor episódico ou arquivada em sistemas de longa duração, podendo ser convertida em memória declarativa visual, episódica ou em linguagem (Figura 1.4). Esse sistema é capaz de reter informações por determinados períodos de tempo mesmo na ausência de estímulos externos (Fuster, 2008), de reter informações recentes e de evocar informações armazenadas previamente, usando essas representações para regular o comportamento (Goldman-Rakic, 1996). O PFC (mais especificamente sua porção dorso-lateral) corresponderia ao sistema atencional supervisor (SAS) e teria a capacidade de manter essas informações livres de interferências externas, sendo uma estrutura crucial para a elaboração e execução de comportamentos que levem a respostas apropriadas de acordo com os contingentes envolvidos em cada situação (Baddeley, 1986; Berman, 1995; Fuster, 2008). De acordo com Norman e Shallice (1980, 1986), o SAS está envolvido com tomada de decisões e resposta a eventos a respeito dos quais não há representação no sistema nervoso. Dessa maneira, o PFC permitiria ao animal manter uma representação do estímulo ao longo do tempo (Fuster *et al.*, 2000; Levy e Goldman-Rakic, 2000), permitindo que um comportamento seja emitido com vista a obter uma resposta tanto a curto quanto a longo prazo. Esse controle é chamado de cima para baixo (Thompson, 2002; Buschman e Miller, 2007; Gazzaley, 2007).

Figura 1.4 - Representação do sistema de memória operacional.
Modificado de Baddeley (2000).

É interessante notar que há uma ligação direta entre o sistema de memória operacional e um sistema atencional. De acordo com o modelo de Norman e Shallice (1980), há dois mecanismos para o controle da atenção: (1) um sistema que é ativado automaticamente dado um estímulo saliente e (2) o SAS, localizado no PFC, que poderia suprimir o mecanismo automático de acordo com a necessidade. Dessa maneira, o sistema atencional não é tido como um sistema de arquivamento de informações, mas sim como um sistema de processamento (Wood e Grafman, 2003), indissociável do próprio conceito de memória operacional. Sabe-se que danos ao SAS resultam em uma diminuição da capacidade de concentração de indivíduos lesados, possivelmente devido à falta da inibição do mecanismo automático (Fuster, 1997; Dimitrov *et al.*, 1999; Masterman e

Cummings, 1997). A ação desses sistemas atencionais promove uma mudança no foco da atenção, permitindo uma flexibilidade comportamental de acordo com eventos do ambiente, influenciando o processo de tomada de decisões (Arnsten, 2009).

A orientação da atenção é um processo que está presente em vários níveis do comportamento animal. Atualmente, entende-se atenção como um processo responsável por priorizar e direcionar o processamento de estímulos relevantes em detrimento de estímulos irrelevantes em determinados contextos, dadas as limitações da capacidade de processamento do sistema nervoso (Luck e Vecera, 2002). Dessa forma, os estímulos priorizados receberiam um processamento preferencial mais eficiente, garantindo ao animal maior vantagem adaptativa (Helene e Xavier, 2003; Sarter, *et al.*, 2001). Para tanto, o direcionamento da atenção se dá baseado em experiências prévias, ou seja, o animal é capaz de planejar suas ações e decidir por aquela que lhe será mais vantajosa, quer seja em termos energéticos, quer seja em termos de sobrevivência (Helene e Xavier, 2003).

A orientação da atenção envolve uma sequência de etapas, que inclui desde a apresentação do estímulo até a efetuação de uma resposta

comportamental requerida. Estudos envolvendo seres humanos indicam que áreas frontais, juntamente com áreas parietais, influenciam tanto a orientação da atenção (Thompson *et al.*, 2005; Corbetta *et al.*, 1998) quanto o alerta (Morrison e Foote, 1986), mediado através de norepinefrina a partir do locus cerúleos (Aston-Jones e Cohen, 2005).

Estudos envolvendo pacientes e primatas não-humanos mostram o envolvimento de diversas estruturas nervosas no curso temporal da orientação da atenção. Entretanto, ainda não se sabe ao certo como essas estruturas interagem para selecionar o estímulo a ser priorizado.

Sabe-se que regiões frontais, em especial o córtex pré-frontal ventromedial, são responsáveis, juntamente com o córtex cingulado anterior, pela valoração de ganhos baseada em experiências prévias (Kaping *et al.*, 2011; Villas-Boas *et al.* – em preparação). Regiões frontais também parecem estar envolvidas na memória operacional (Baddeley, 2000) e, além de receberem projeções noradrenérgicas do locus cerúleos, também se inserem no sistema dopaminérgico de recompensa, sendo cruciais para a valoração entre custos e benefícios e, conseqüentemente, para o processo de tomada de decisões (Fuster, 1991). Áreas corticais modalmente específicas seriam recrutadas para o processamento de

informações referentes à qualidade dos estímulos (Desimone & Duncan, 1995; Hopfinger *et al.*, 2000).

Já o córtex parietal posterior participaria da integração de informações oriundas de regiões de processamento sensorial. Essa área parece participar diretamente de operações envolvendo a seleção de informações sensoriais que receberão um processamento preferencial (Behrmann *et al.*, 2004). Além disso, possui projeções para outras regiões de processamento, incluindo o córtex pré-frontal ventromedial, sugerindo um sistema conjunto de escolhas baseadas em risco e avaliação de probabilidades (Studer *et al.*, 2013).

Neurofisiologia da tomada de decisões

Os córtices cingulado e pré-frontal (Gazzaniga, 2000), o neocórtex, envolvido em representações de valor subjetivo (Rangel *et al.*, 2008) e estruturas do sistema límbico, incluindo a amígdala (Damasio *et al.*, 1994), parecem contribuir para o processo de tomada de decisões.

Escolhas otimizadas estão relacionadas à avaliação de experiências prévias envolvendo ganhos e perdas após decisões similares (Rangel *et al.*, 2008; Kennerley e Wallis, 2009). Nesse contexto, neurônios do córtex cingulado anterior (ACC), do córtex pré-frontal lateral (LPFC) e do córtex

orbitofrontal (OFC) codificam informações sobre o valor previsto do reforço em escolhas envolvendo ganho, custo e probabilidade de sucesso, por meio de neurônios dopaminérgicos do sistema fronto-estriatal (Lau e Glimcher, 2007; Kennerley *et al.*, 2009). A atividade do ACC, LPFC e OFC é modulada por eventos inesperados (Niki e Watanabe, 1979; Hikosaka e Watanabe, 2000; Tremblay e Schultz, 2000; Walton *et al.*, 2004; Sallet *et al.*, 2007) e também por experiências prévias envolvendo a quantificação de sucessos obtidos anteriormente (Hikosaka e Watanabe, 2000; Rolls, 2000; O'Doherty *et al.*, 2001; Amiez *et al.*, 2006; Roesch *et al.*, 2006). Por outro lado, lesões no ACC ou OFC parecem limitar a habilidade de utilizar experiências prévias no processo de tomada de decisões (Shima e Tanji, 1998; Kennerley *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2007).

Os córtices orbitofrontal e cíngulo anterior vêm sendo implicados no processo de tomada de decisões desde o caso clássico de Phineas Gage, trabalhador que teve parte de seu córtex pré-frontal destruído por uma barra de metal (Harlow, 1848). Alterações drásticas ocorreram, tanto do ponto de vista emocional quanto de personalidade e chamaram a atenção de familiares e amigos (Harlow, 1868). Em casos mais recentes de lesão na mesma região, pacientes mostram comportamentos similares aos observados em Gage, como problemas para tomar decisões, falta de afetuosidade e de empatia, inadequação social e irresponsabilidade

(Hornak *et al.*, 2003; Hornak *et al.*, 1996).

O córtex orbitofrontal se desenvolveu enormemente ao longo da evolução dos primatas e é tido como o principal componente do sistema de tomada de decisões (Kringelbach, 2005). Existem três razões principais que fazem com que o OFC seja um forte candidato a exercer esse papel: (1) o OFC apresenta receptores dopaminérgicos em grande quantidade e recebe numerosas aferências de sistemas subcorticais, sendo, portanto, um sistema envolvido na codificação de recompensa; (2) o OFC recebe sinais viscerais, o que confere informações acerca do meio interno; (3) é parte de um sistema complexo envolvendo estruturas do sistema límbico, especialmente hipocampo (Cavada *et al.*, 2000) e amígdala (Amaral e Price, 1984; Carmichael e Price, 1995), que estão fortemente ligados à codificação de resposta emocional e atribuição de significado motivacional tanto a estímulos externos quanto internos (Fuster, 2008). Todas essas aferências levaram Barbas (1988) a considerar o OFC uma das regiões corticais polimodais no sistema nervoso (Barbas, 1988). O OFC também faz conexões recíprocas com o córtex cingulado (Van Hoesen, 1993; Ongur e Price, 2000), ínsula/opérculo (Mesulam e Mufson, 1982), hipotálamo (Rempel-Clower e Barbas, 1998), estriado (Eblen e Graybiel, 1995), substância cinzenta periaquedutal (Eblen e Graybiel, 1995) e córtex pré-frontal dorso-lateral (Carmichael e Price, 1995; Barbas e Pandya,

1989), além de conexões com regiões nervosas modalmente específicas, incluindo olfato, gustação, visão, audição e somatossensorial (Carmichael e Price, 1995).

As projeções dopaminérgicas do estriado ventral e do núcleo *accumbens* também parecem contribuir na avaliação do valor do reforço (Schultz, 2007), uma vez que o sistema de recompensa é essencial para que decisões sejam tomadas. Estudos envolvendo humanos mostram que há diferenças qualitativas entre a atividade do OFC, modulada pelo risco, e do estriado, que apresenta atividade proporcional ao valor esperado do reforço (Breiter *et al.*, 2001; Tobler *et al.*, 2009).

Tomada de decisões em jogos-de-azar parece depender da atividade do córtex pré-frontal ventromedial. Por exemplo, em experimentos envolvendo o Iowa *Gambling Task* (IGT) (Bechara *et al.*, 1994) são apresentadas 4 pilhas de cartas, denominadas A, B, C e D, com as faces voltadas para baixo e o participante deve, em cada tentativa, retirar uma carta de uma dessas pilhas. São realizadas 100 tentativas no total. Em todas as pilhas há cartas pré-estabelecidas que levam ao “ganho” e cartas que levam à “perda” de valores fictícios. As pilhas C e D resultam em lucros pequenos associados a prejuízos menores que os lucros, sendo portanto vantajosas ao participante, i.e., há um ganho final. Já as pilhas A e B levam a lucros imediatos elevados, associados a prejuízos mais elevados do que

os lucros, sendo portanto desvantajosas ao participante, i.e., há uma perda final. Pessoas saudáveis aprendem, por tentativa e erro, a evitar as pilhas que levam a ganhos imediatos associados a perdas a longo prazo, optando pelas pilhas vantajosas, ao passo que pacientes com lesão no córtex pré-frontal ventromedial insistem em optar por escolhas nas pilhas que levam a ganhos imediatos, mantendo essa estratégia apesar das perdas a longo prazo. Assim, pacientes lesados parecem ter dificuldade no desenvolvimento de uma estratégia de planejamento a longo prazo (Pais-Vieira *et al.*, 2007), adotando um comportamento impulsivo e de alto risco (Bechara *et al.*, 2000a; Bechara *et al.*, 2000b). Sob outro ponto de vista, podemos interpretar também os resultados como uma possível dificuldade de memória sobre a sequência de eventos.

O córtex pré-frontal ventromedial (vmPFC) é uma área intimamente relacionada ao córtex orbitofrontal (OFC), ambas fazendo parte do conjunto de estruturas que constituem o córtex pré-frontal (Figura 1.5). Juntamente com o núcleo basolateral da amígdala (BLA), essas estruturas parecem exercer uma atividade “de cima para baixo” sobre o medo e a ansiedade. Entretanto, foi verificado que pacientes com lesão no vmPFC apresentam comportamento compulsivo em testes de escolha, fazendo com que se tornem menos cautelosos ao fazer apostas.

Fig. 1.5 - Ilustração esquemática das estruturas principais envolvidas no circuito de recompensa. Áreas e setas em cinza representam as estruturas e conexões básicas do sistema córtico-basal. Amy, amígdala; dACC, córtex cingulado anterior dorsal; DPFC, córtex pré-frontal dorsal; DS, estriado dorsal; Hipp, hipocampo; hypo, hipotálamo; LHb, habênula lateral; OFC, córtex orbitofrontal, PPT, núcleo pedúnculo-pontino; SNc, substância negra parte compacta; STN, núcleo sub-talâmico; Thal, tálamo; VP, pálido ventral; VS, estriado ventral; VTA, área tegmental ventral; vmPFC, córtex pré-frontal ventromedial.

Sendo o vmPFC e o OFC intimamente ligados e ambos relacionados ao comportamento de tomada de decisões, faz sentido que a possível atividade conjunta do OFC e BLA tenha influência direta do vmPFC.

Sabe-se que o vmPFC e o OFC estão altamente ativados durante a avaliação de recompensas e de comportamentos motivados com conteúdo emocional (Fuster, 2001). O córtex frontal é organizado de forma hierárquica e pode ser subdividido em regiões funcionais (Fuster, 2001): o

córtex cingulado anterior (ACC), o córtex orbitofrontal (OFC) e o córtex pré-frontal ventromedial (vmPFC). Embora células corticais difusas sejam ativadas durante o processamento de recompensa, o OFC e o ACC são os principais responsáveis para o processamento do valor da recompensa e do ganho. O vmPFC participa do monitoramento de respostas corretas baseadas em experiências passadas, sendo ativado quando respostas anteriormente aprendidas não são mais eficientes em uma situação nova. Assim, essa região é essencial para a extinção de um comportamento aprendido (Mayberg, 2003; Milad *et al.*, 2007). O OFC, por sua vez, exerce papel importante na avaliação do valor da recompensa, magnitude e probabilidade do ganho. O ACC apresenta funções mais complexas e aparentemente menos específicas, tais quais motivação, cognição e controle motor, cujo papel geral seria de monitorar todas essas funções em situações de conflito que envolvem escolha e tomada de decisões (Paus, 2001; Vogt *et al.*, 2005; Walton *et al.*, 2002). Alguns autores sugerem que o OFC e o vmPFC participam da escolha do tipo de reforço ao qual a ação será direcionada, especialmente quando há várias possibilidades de reforço e um engajamento atencional é necessário enquanto a avaliação de balanços é feita (Noonan *et al.*, 2012; Boorman *et al.*, 2009), ao invés da escolha de uma ação propriamente dita. Isso explicaria o motivo pelo qual lesões nessa região causam um prejuízo no julgamento do valor do reforço e um aumento da influência de distratores no processo de escolha (Noonan

et al., 2010). Após a seleção do objetivo, o ACC participaria da decisão acerca de qual a melhor ação a ser tomada com a finalidade de se alcançar o objetivo previamente selecionado (Noonan *et al.*, 2011; Cai e Padoa-Schioppa, 2012). Estudos envolvendo dupla dissociação reforçam essa hipótese, uma vez que se observa que lesões no sistema vmPFC/OFC em macacos (Rudebeck, 2008) e humanos (Camille, 2011) levam a um prejuízo na codificação do estímulo-reforço, mas não a um prejuízo na codificação da ação-reforço, e vice-versa (Rushworth, 2012).

Ainda fazendo parte desse sistema, porém de forma indireta, estão o hipocampo e a amígdala (Barbas e Blatt, 1995; Carmichael e Price, 1995). O hipocampo se projeta mais densamente para o vmPFC e de forma menos proeminente para o OFC. A amígdala, por sua vez, se projeta para regiões do vmPFC, OFC e ACC, com particular proeminência para o vmPFC e OFC. Nesta rede, o vmPFC teria o papel de regular negativamente, de cima para baixo, a atividade da amígdala quando em situações que não envolvem estresse (Arnsten, 2009).

Supôs-se, então, que pacientes com desordem de estresse pós-traumático (*post traumatic stress disorder*, PTSD) poderiam ter um prejuízo no vmPFC, aumentando a atividade amigdalár (Bremner, 1999; Shin *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2006; Liberzon *et al.*, 1999; Hendler *et al.*, 2003; Driessen *et al.*, 2006). Entretanto, foi observado que veteranos de

guerra com lesão no vmPFC apresentam menor tendência a desenvolver PTSD quando comparados a indivíduos normais (Koenigs *et al.*, 2008), o que foi verificado também em estudos de imageamento funcional envolvendo ansiedade em humanos (Simpson *et al.*, 2001), nos quais se observou um aumento da atividade do vmPFC em pacientes com elevados níveis de ansiedade.

Tomada de decisões e avaliação de risco

Conexões entre OFC, ACC e BLA vêm sendo discutidas na literatura como importantes para codificar informações sobre risco.

Tem havido tentativas de desenvolver modelos animais de tomada de decisões envolvendo primatas não-humanos e roedores.

Por exemplo, Pais-Vieira *et al.* (2007) mostraram que ratos com lesão no OFC apresentam comportamento similar ao de humanos lesados em tarefas análogas aos jogos-de-azar. Ratos treinados pré-cirurgicamente devem pressionar uma barra, dentre duas disponíveis, para receber um *pellet* de alimento; inicialmente, ambas levam ao reforço em 80% das tentativas. Após essa fase de treino, há uma fase de teste em que, em uma única sessão experimental, a pressão a uma barra leva à oferta de 3 *pellets* de ração, porém em apenas 30% das tentativas, enquanto pressão à outra barra leva a 1 *pellet* de ração em 80% das tentativas. Note que no primeiro

caso o animal recebe em média 0,9 *pellet* por tentativa, ao passo que no segundo caso, o animal recebe 0,8 *pellet* por tentativa. Animais com lesão no OFC optam pela barra que resulta em grande reforço imediato, porém menos frequente. Já os animais controle, optam pela barra que resulta em menor reforço imediato, porém com maior frequência. Os autores especularam que não houve tentativas suficientes para que os animais identificassem essa diferença mínima vantajosa, o que requereria uma avaliação a longo prazo dos ganhos em cada condição, assumindo que a baixa frequência de tentativas reforçadas possa ser insuficiente para que se haja uma avaliação eficiente do risco envolvido. Sendo assim, para se criar uma condição análoga à do IGT, seria preferível reforçar os animais com 2 *pellets* em 30% das tentativas, além da condição com 1 *pellet* em 80% das tentativas, pois assim a falta de avaliação de risco levaria também a uma perda a longo prazo, e não a um ganho, como é o caso no estudo de Pais-Vieira *et al.* (2007). Face aos resultados descritos por esses autores, pode-se especular que os animais lesados estariam menos presos ao esquema prévio de treinamento, extinguindo mais facilmente a resposta anteriormente treinada, com a vantagem de ganharem mais alimento.

Mobini *et al.* (2002) treinaram ratos a pressionar uma entre duas barras, sendo que uma delas resultava em 1 *pellet* de alimento imediatamente após a pressão, enquanto a outra resultava em 2 *pellets* de

alimento com atrasos variáveis entre 1 e 30 s. Enquanto ratos com danos no OFC optaram preferencialmente pela barra que oferece menos *pellets* imediatamente, ratos controle optaram preferencialmente pela barra que oferece mais *pellets*, ainda que com atraso. Esses autores avaliaram também as escolhas desses animais entre barras que levavam a 1 *pellet* de alimento em 100% das tentativas ou 2 *pellets* de alimento em 88%, 72%, 48%, 32%, 20%, 8% e, novamente, em 88% das tentativas, em 7 fases de treino consecutivas. Em todos os casos a liberação dos *pellets* de alimento ocorreu imediatamente após a pressão à barra. Ambos os grupos exibiram diminuição do número de escolhas pela barra que oferece maior reforço à medida que a probabilidade de oferta de alimento diminuía; assim, quando a probabilidade era 8%, ambos os grupos passaram a escolher a barra que oferecia 1 *pellet* em 100% das tentativas. Por outro lado, em fases envolvendo probabilidades altas, ambos os grupos se comportaram de forma semelhante, escolhendo a barra que oferecia 2 *pellets*. Os animais com danos no OFC optaram preferencialmente pela barra que oferecia 1 *pellet* de alimento, o que levou os autores à conclusão de que esses animais adotam um comportamento de aversão ao risco. No entanto, os dois grupos parecem ser capazes de lidar com a tarefa e de formular estratégias, já que são capazes de alterar seu comportamento de acordo com as contingências apresentadas. Os autores concluíram que os animais são influenciados por impulsividade associada ao dano no OFC.

Essas diferenças podem se dever aos diferentes protocolos experimentais utilizados. No estudo de Pais-Vieira *et al.* (2007) a etapa de teste contendo apenas uma única sessão pode gerar uma incerteza maior nos animais, o que os obriga a elaborar uma estratégia momentânea, que acaba sendo pouco eficiente, já que sua escolha é baseada puramente em incerteza. Já a tarefa proposta por Mobini *et al.* (2002) se baseia em uma tarefa de treino intenso, na qual os animais aprendem, anteriormente à sessão de teste, qual será o resultado associado a cada escolha em sessões consecutivas. Dessa forma, a escolha do rato não é baseada em incerteza, fator presente em protocolos comumente usados em estudos envolvendo humanos (Bechara *et al.*, 1997; Rogers *et al.*, 1999; Berns *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2005). Além disso, na tarefa de Pais-Vieira *et al.* (2007), a barra associada a 100% de chance de receber alimento é uma alternativa segura, i.e, não há risco. Assim, o animal não precisa criar uma estratégia diferente baseado na possibilidade de não receber reforço por escolher uma das barras.

Escolhas envolvendo baixa probabilidade de reforço podem ser resultado da integração de múltiplas regiões atuando simultaneamente no processo de tomada de decisões. Regiões como o BLA e ACC também estão envolvidas no processamento que envolve reforço e emoções (Kolb, 1984; McDonald, 1991; Morgane *et al.*, 2005).

Conexões envolvendo o OFC, BLA e ACC vêm recebendo maior atenção por codificar informações sobre o risco. Estudos de imageamento funcional em humanos mostraram alterações nos padrões de ativação eletrofisiológica no ACC em resposta a ganhos ou perdas de quantias em dinheiro (Fujiwara *et al.*, 2009), sendo a atividade elevada associada com escolhas de alto-risco (Rao *et al.*, 2008; Hewig *et al.*, 2009). McCoy e Platt (2005), em estudos envolvendo macacos, obtiveram resultados similares àqueles obtidos com humanos. Esses autores conseguiram prever a mudança no comportamento dos animais de alternativas arriscadas para seguras, de acordo com o padrão eletrofisiológico observado no ACC.

A amígdala também parece influenciar o comportamento do animal em escolhas envolvendo risco. Ghods-Sharifi *et al.* (2009) mostraram que a inativação do BLA em ratos leva a um comportamento de aversão ao risco em escolhas envolvendo grande incerteza. A conexão entre OFC e BLA é tida como crítica para que ratos sejam capazes de associar respostas comportamentais aos seus respectivos resultados.

Como explicitado acima, há controvérsias quanto às estruturas envolvidas em cada tipo de tarefa, bem como seu nível de envolvimento em cada uma delas. O OFC parece ter um papel determinante no controle da impulsividade e avaliação de risco, tanto em tarefas envolvendo atraso na liberação de reforço, quanto em tarefas na qual a probabilidade de ganho

é variável. A proximidade do OFC com estruturas do sistema límbico, como o BLA, indica que essa estrutura pode ter influência na tomada de decisões envolvendo emoções. Isso, somado ao grande número de projeções ao ACC e ao vmPFC, indica que o conjunto pode ser um dos principais responsáveis pela avaliação de risco em escolhas envolvendo esse tipo de contingência.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a contribuição específica dos córtices pré-frontal ventromedial e orbitofrontal em processos relacionados à tomada de decisões em ratos.

Visou-se avaliar a hipótese do envolvimento do córtex pré-frontal ventromedial, em especial a área pré-límbica, no controle de respostas emocionais e na persistência e flexibilidade comportamental. Para tanto, avaliou-se o efeito de lesões neurotóxicas e seletivas na área pré-límbica do córtex pré-frontal ventromedial de ratos (1) no labirinto em cruz elevado, uma tarefa de avaliação de ansiedade, medo condicionado e avaliação de risco e (2) no labirinto aquático de Morris, em tarefas de avaliação de memória espacial de referência e memória operacional.

Além disso, o presente trabalho se propôs a avaliar a atividade de neurônios do córtex orbitofrontal durante o desempenho de tarefa envolvendo tomada de decisões dependentes da elaboração de estratégias de curto e longo prazo, ou seja, tanto dentro de uma única sessão experimental quanto ao longo de várias sessões experimentais. Para tanto, utilizou-se registro multiunitário de neurônios concomitantemente ao desempenho em uma tarefa na qual o animal deve escolher entre ser reforçado em baixa quantidade, porém imediatamente ou em grande quantidade, porém com atrasos variáveis.

3. Experimento 1

3. Experimento 1

Efeito da lesão seletiva da área pré-límbica do córtex pré-frontal ventromedial em uma tarefa de avaliação de ansiedade, medo condicionado e avaliação de risco.

3.1 Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados 16 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos e ingênuos, oriundos do biotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, com aproximadamente 3 meses (300 ~ 350g) quando do início dos experimentos. Os animais eram acondicionados individualmente em caixas e colocados em um ambiente controlado com ciclo de claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00). Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo. Água e ração (Nuvilab) foram disponibilizados *ad libitum* durante todo o período de utilização dos animais. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Grupos

Os animais foram divididos em dois grupos, sendo que o grupo experimental (Exp; n=8) sofreu lesão seletiva da área pré-límbica do córtex

pré-frontal ventromedial. Esse grupo recebeu a infusão bilateral de ácido ibotênico dissolvido em solução salina (100mg/mL de solução de ácido ibotênico dissolvido em NaCl a 0,9% m/m). O grupo controle (Sham; n=8) sofreu o mesmo procedimento cirúrgico, porém com infusão de solução salina (NaCl a 0,9% m/m) nas mesmas coordenadas cirúrgicas do grupo experimental. Os testes foram iniciados 7 dias após o término das cirurgias.

Procedimento cirúrgico

As cirurgias foram realizadas através de procedimentos usuais de estereotaxia. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de Ketamina (50mg/mL) e Xilazina (20mg/mL), no volume de 0,3mL/100g de animal. Após realização da tricotomia (remoção dos pelos) da cabeça do rato, com o intuito de expor a pele e manter a higiene do local da incisão, os ratos foram posicionados em um aparelho estereotático (David Kopf Instruments), no qual foi realizado o procedimento cirúrgico. Após limpeza com iodo do local tricotomizado, foi feita uma incisão longitudinal na pele com bisturi, posteriormente rebatida com pinças, expondo o crânio. Após a remoção do periósteo com escariador dental, o crânio foi perfurado bilateralmente com broca odontológica na região sobreposta ao vmPFC, de forma a expor a superfície da dura-máter com o intuito de verificar a integridade do local após a perfuração. Para as infusões, utilizou-se uma micropipeta de vidro

estirado, de aproximadamente 150 μ m de diâmetro externo, colada à ponta de uma seringa Hamilton (10 μ L). Penetrou-se o encéfalo nas coordenadas anteroposterior (AP) e mesolateral (ML) bilaterais, a partir do bregma, AP +3,0mm, ML $\pm$ 0,8mm, DV -4,0mm; AP +3,2mm, ML $\pm$ 0,7mm, DV -4,2mm; AP +3,7mm, ML $\pm$ 0,5mm, DV -4,4mm, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005). As coordenadas dorsoventrais (DV), no entanto, foram tomadas a partir da superfície da dura-máter. Em cada coordenada foi infundido 0,5 μ L de ácido ibotênico (100mg/mL em solução salina de NaCl a 0,9% m/m) ou solução salina, de acordo com o grupo.

Para a determinação das coordenadas estereotáxicas foram utilizados 3 animais de mesma idade em relação aos animais utilizados no teste. Três dias após a cirurgia envolvendo a infusão de ácido ibotênico, os animais eram anestesiados profundamente com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral e perfundidos com solução de formalina/salina. Após o fim da perfusão, os encéfalos eram removidos e fixados em parafina para posterior corte em micrótomo. Após realizados os cortes transversais de 10 μ m de espessura, realizou-se coloração com violeta de cresila para a verificação dos locais atingidos pela lesão. As coordenadas estereotáxicas identificadas como mais adequadas foram utilizadas na neurocirurgia dos animais a serem expostos aos testes comportamentais (ver Apêndice I).

Aparelho experimental

Foi utilizado um labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação de ansiedade, aprendizagem aversiva e comportamento de avaliação de risco.

O aparelho é constituído de dois braços de mesmo tamanho, que se cruzam no meio, formando um ângulo reto, deixando o labirinto com o formato de “+”, delimitando um quadrado central de 10cm x 10cm na interseção entre os braços. Um par de braços opostos entre si apresenta paredes com 40cm de altura (braços fechados), enquanto o outro par apresenta as paredes com 1 cm de altura (braços abertos). O aparelho fica suspenso a 50 cm do assoalho, situando-se imediatamente abaixo de uma câmera presa ao teto da sala, por meio da qual grava-se a sessão. Dessa maneira, o experimentador pode, de fora da sala, registrar o tempo de permanência e frequência de entradas nos diferentes setores do labirinto com o auxílio de um computador e um software apropriado para o procedimento. Os dados foram registrados utilizando-se o programa X-Plo-Rat (disponível em: <http://scotty.ffclrp.usp.br/page.php?6>).

Cada animal é exposto a duas sessões de 5 minutos cada, com um intervalo de 5 minutos entre elas (Graeff *et al.*, 1998). Os níveis de ansiedade foram avaliados por meio da porcentagem de entradas e de tempo de permanência nos braços abertos em relação à somatória desses parâmetros nos braços abertos e fechados. A premissa por detrás deste teste seria o conflito entre o medo dos animais em relação aos ambientes abertos e elevados, e sua natureza exploratória. Essa tarefa permite avaliar um tipo

de ansiedade correspondente à resposta inata de medo ao local novo e a espaços abertos e altos (durante a sessão de teste). Outro tipo de ansiedade corresponderia à aversão gerada pelo conhecimento de que aquele ambiente é desagradável, pois há lugares altos e abertos, tornando a aversão pelos espaços abertos do labirinto ainda maior na sessão de re-teste. O número de entradas nos braços fechados é tomado como indicador dos níveis de atividade locomotora dos animais (File *et al.*, 2001). A atividade locomotora não é influenciada pelos níveis de ansiedade, o que é evidenciado por resultados que apontam que mesmo quando os níveis de ansiedade estão aumentados nos animais, a atividade motora permanece inalterada (File *et al.*, 2001). Por fim, o tempo de permanência no quadrado central é utilizado como índice do comportamento de avaliação de risco do animal (Wesierska e Turlejski, 2000). Ao término de cada exposição de qualquer animal ao labirinto, o aparelho era limpo com álcool a 70% m/m (77° GL) para evitar a utilização de qualquer tipo de pista olfativa pelos animais.

Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes descritos foram analisados utilizando-se o teste *General Linear Model* (GLM). O GLM é um modelo estatístico flexível, que incorpora variáveis dependentes de distribuição normal e variáveis independentes categóricas ou contínuas.

Foi utilizado “Grupo” como fator entre sujeitos e “Sessão de exposição” como fator intra-sujeitos como meio de se avaliar o efeito da experiência prévia ao labirinto na sessão de re-teste. Quando necessário, foi realizado o teste *post-hoc* de Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*).

Um GLM independente foi executado para cada parâmetro distinto. Para as análises foram utilizados o *software* Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) e SigmaPlot (Systat Software Inc.).

3.2 Resultados

Os resultados do teste no labirinto em cruz elevado são apresentados na Figura 3.1.

Para o parâmetro **número de entradas nos braços fechados**, o GLM mostrou que não houve diferença significativa nos fatores Grupo [$F(1,28) = 1,276$; $p = 0,268$], Tentativa [$F(1,28) = 0,216$; $p = 0,645$] e na interação entre Tentativa e Grupo [$F(1,28) = 0,044$; $p = 0,947$] (Figura 3.1A). Esses efeitos sugerem que os animais não apresentam prejuízo locomotor, já que ambos os grupos perambulam entre os braços fechados de maneira semelhante.

Em relação ao parâmetro **porcentagem de tempo despendido nos braços abertos**, o GLM revelou ausência de diferença significativa nos fatores Grupo [$F(1,28) = 1,056$; $p = 0,312$] e na interação entre Tentativa e

Grupo [$F(1,28) = 0,162$; $p = 0,69$]. No entanto, em relação ao fator Tentativa, o GLM revelou diferença próxima de significativa [$F(1,28) = 3,572$; $p = 0,0691$] (Figura 3.1B). No conjunto, esses resultados indicam que os animais aprenderam as características aversivas dos braços abertos do LCE em ambos os grupos. Quanto à **porcentagem de entrada nos braços abertos**, o GLM revelou que não há diferença significativa para os fatores Grupo [$F(1,28) = 0,387$; $p = 0,538$], Tentativa [$F(1,28) = 1,028$; $p = 0,319$] e na interação entre Tentativa e Grupo [$F(1,28) = 0,747$; $p = 0,394$] (Figura 3.1C). A porcentagem de entradas nos braços abertos, assim como

Figura 3.1 - Médias (A) do número de entradas nos braços fechados; (B) da porcentagem de tempo despendido nos braços abertos; (C) da porcentagem de entradas nos braços abertos; (D) do tempo despendido no quadrado central nas tentativas de teste e re-teste no labirinto em cruz elevado. Sham: grupo controle; vmPFC: grupo experimental; * $p < 0,05$ ou próximo de diferença significativa.

a porcentagem de tempo despendido nos braços abertos, são indicativos dos níveis de ansiedade. A ausência de diferenças significativas nos fatores Grupo e interação Tentativa e Grupo sugerem que a lesão no PL não causou qualquer alteração nos níveis de ansiedade, não interferiu na aprendizagem aversiva e não alterou a atividade locomotora dos animais.

Em relação ao **tempo de permanência no quadrado central**, o GLM revelou efeito significativo para o fator Grupo [$F(1,28) = 7,731$; $p < 0,05$] e para o fator Tentativa [$F(1,28) = 4,185$; $p = 0,05$], mas ausência de diferença significativa na interação entre Tentativa e Grupo [$F(1,28) = 2,538$; $p = 0,122$] (Figura 3.1D). Porém, no teste “*post-hoc*” para esse parâmetro, encontrou-se que as sessões de teste e re-teste do grupo experimental não diferem ($p = 0,988$), enquanto que para o grupo controle a diferença entre as duas sessões é próxima de significativa ($p = 0,070$).

3.3. Discussão

Os resultados do teste no labirinto em cruz elevado mostram que danos no PL do vmPFC não alteram a ansiedade dos animais, haja visto que os animais do grupo experimental se comportam como os animais do grupo controle, tanto no parâmetro que afere a atividade locomotora (número de entradas nos braços fechados) quanto no que avalia o aprendizado das características aversivas do labirinto (porcentagem de tempo despendido nos braços abertos).

A medida de tempo de permanência no quadrado central levanta uma questão interessante acerca da função do vmPFC na ansiedade. Uma vez que essa medida afere a tomada de decisões e avaliação de risco na exploração de ambientes novos e desconhecidos, esses resultados indicam que os animais controle, após aprenderem as características do aparelho, fazem uma análise de risco particularmente no re-teste, permanecendo mais tempo no quadrado central. Já os animais lesados parecem não avaliar o risco, ou seja, mesmo aprendendo as características aversivas dos braços abertos (já que exibem redução da permanência nestes braços no re-teste), esse grupo despende menos tempo no quadrado central em ambas as sessões em relação ao grupo controle.

Esses resultados são condizentes com os modelos de que o PL do vmPFC não exerceria um controle “de cima para baixo” sobre a amígdala, suprimindo o medo condicionado. Aparentemente, essas estruturas não são as únicas responsáveis pela modulação da ansiedade (Simpson *et al.*, 2001, Koenigs *et al.*, 2008), haja visto a complexa circuitaria que compõe o sistema de recompensa. Evidências experimentais indicam que o hipocampo é uma estrutura importante na gênese da ansiedade (Gray, 1982). Assim, parece que o vmPFC é funcionalmente heterogêneo no que diz respeito à sua influência sobre a amígdala. Mais ainda, de acordo com os resultados deste experimento, podemos inferir que o PL do vmPFC atue

em conjunto com o córtex orbitofrontal em tarefas de tomada de decisões.

É possível que o PL do vmPFC tenha um papel auxiliar, porém não menos importante, nesse processo. Os resultados mostram que é necessário ter cautela em avaliar o papel do córtex orbitofrontal como único responsável pela tomada de decisões.

4. Experimento 2

4. Experimento 2

Efeito da lesão seletiva do PL do córtex pré-frontal ventromedial em uma tarefa de memória espacial de referência e memória operacional.

4.1. Materiais e métodos

Animais

Foi utilizado um novo lote de 16 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos e ingênuos, oriundos do biotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, com aproximadamente 3 meses (300 ~ 350g) quando do início dos experimentos. Os animais eram acondicionados individualmente em caixas e colocados em um ambiente controlado com ciclo de claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00). Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo. Água e ração (Nuvilab) foram disponibilizados *ad libitum* durante todo o período de utilização dos animais. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Grupos

Os animais foram divididos em dois grupos, sendo que o grupo experimental (Exp; n=8) sofreu lesão seletiva da área pré-límbica do córtex pré-frontal ventromedial. Esse grupo recebeu a infusão bilateral 0,5µL de

ácido ibotênico (100mg/mL de solução de ácido ibotênico dissolvido em solução salina de NaCl a 0,9% m/m) em cada coordenada. O grupo controle (Sham; n=8) sofreu o mesmo procedimento cirúrgico, porém com infusão de solução salina (NaCl a 0,9% m/m) nas mesmas coordenadas cirúrgicas do grupo experimental. Os testes foram iniciados 7 dias após o término das cirurgias.

Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi igual ao utilizado no Experimento 1. Uma vez que este experimento utilizava lesões seletivas na mesma região do Experimento 1, as coordenadas utilizadas também foram as mesmas.

Aparelho experimental

Nesta tarefa foi utilizado o labirinto aquático de Morris (1981). Trata-se de uma piscina circular de 200 cm de diâmetro e 50 cm de altura, cujas paredes foram pintadas com tinta preta. Na sala onde se encontrava a piscina, encontravam-se pendurados nas paredes painéis de acrílico colorido com formatos diferentes (um triângulo, uma árvore e um círculo), além de um quadro colorido, de maneira a servirem como pistas distais para os animais durante a tarefa de localização.

Diariamente, a piscina era preenchida até 35cm de altura com água a 26°C. Uma plataforma móvel de acrílico transparente de 9cm de diâmetro,

colocada a 2cm abaixo da superfície da água, possibilitava ao animal sair da água, servindo de escape. A posição da plataforma variava de acordo com o teste efetuado (ver adiante). Todo o experimento foi registrado por uma câmera de vídeo (VP112, HVS Image Ltd, Hampton, UK) conectada a um computador programado para analisar pares de coordenadas, que definem a posição do animal na piscina, coletados a cada 0,1 s.

Para fins de análise a piscina foi dividida ao meio por duas linhas imaginárias perpendiculares, formando quatro quadrantes de mesmo tamanho. O quadrante que continha a plataforma foi denominado quadrante crítico. Além disso, havia uma área (imaginária), concêntrica à plataforma e de três vezes seu diâmetro, denominada contador crítico. A maior presença dos animais dentro destas áreas críticas é informativa da precisão da busca pela plataforma.

O primeiro teste realizado, envolvendo memória de referência espacial, iniciou-se 7 dias após a neurocirurgia. A plataforma foi mantida sempre na mesma posição e o animal era solto a cada tentativa de um ponto diferente da borda da piscina. Se o animal não encontrasse a plataforma dentro dos dois minutos da tentativa, era então levado até a mesma pelo experimentador. Uma vez sobre a plataforma, os animais dispunham de 15 segundos para investigar o ambiente. Cada sessão envolveu 3 tentativas, com intervalo de 10 minutos entre elas (ITI - intervalo entre tentativas, do inglês, “*intertrial interval*”). Esta etapa envolveu 8 sessões consecutivas.

Os parâmetros analisados em cada tentativa deste teste incluíram latência e comprimento do trajeto.

A latência, i.e., o tempo que o animal despende do início da tentativa até alcançar a plataforma, juntamente com o comprimento do trajeto que o animal percorre até o escape, são medidas que comumente diminuem rapidamente ao longo das sessões de teste, na medida em que o animal aprende, gradualmente, acerca da localização da plataforma.

A seguir, durante um “*probe test*”, avaliou-se a lembrança sobre a localização da plataforma e a extinção da resposta adquirida no teste de memória de referência. A plataforma foi retirada da piscina e os animais tinham uma única tentativa de 3 minutos de duração para nadar livremente. Os dados foram analisados minuto a minuto (“*time bins*”) avaliando o tempo despendido na região onde se encontrava a plataforma anteriormente e a velocidade de natação de modo a se avaliar eventuais prejuízos motores. Os parâmetros mensurados neste teste incluíram comprimento do trajeto, porcentagem de tempo em que o animal permanece no quadrante crítico, porcentagem de tempo de permanência nos anéis externo, intermediário e central da piscina, velocidade média de natação e tempo despendido no contador.

A porcentagem de tempo em que o animal permanece no quadrante crítico permite a inferência de quanto o animal se lembra da localização da plataforma no teste de memória de referência e como ele extingue essa

busca ao longo das janelas de tempo (“*time bins*”) do “*probe test*”.

A velocidade média de natação, calculada com base no trajeto total do animal dividido pelo tempo de permanência na piscina, foi avaliada neste teste, pois todos os animais permanecem na piscina por igual quantidade de tempo, diferindo, por exemplo, do tempo de permanência na piscina durante o teste de memória de referência, que variou em função do desempenho dos animais em encontrarem a plataforma. Este parâmetro permite avaliar se os animais possuem algum comprometimento motor relacionado à execução da tarefa bem como reflete a motivação dos animais.

O teste de memória operacional iniciou-se 3 dias após o *probe test*, com duração de 4 dias. A cada dia de teste a localização da plataforma era alterada. Cada animal realizou também 3 tentativas por dia, com ITI de 10 minutos. Neste teste foram analisados, para cada tentativa, os parâmetros latência, comprimento do trajeto, porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior e frequência no contador do dia anterior.

Os parâmetros que refletem o tempo de permanência nos locais onde se achava a plataforma no dia anterior são medidas para avaliação da lembrança do animal sobre a localização da plataforma 24 horas antes do teste corrente.

Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes descritos foram analisados utilizando-se o teste “*General Linear Model*” (GLM).

No labirinto aquático de Morris, o parâmetro “Grupo” foi analisado como fator entre-sujeitos e os parâmetros “Sessão”, “Tentativa”, no teste de memória espacial de referência, como fatores intra-sujeitos. O fator “Sessão” afere a melhora do desempenho do animal dia a dia, ou seja, admite-se que ao longo das sessões o animal carrega consigo informações a respeito das sessões anteriores, indicado pela melhora de desempenho no teste de memória de referência. O fator “Tentativa” indica o desempenho do animal ao longo das tentativas dentro de uma mesma sessão.

No *probe test*, no qual o animal era exposto a apenas uma sessão de 3 minutos de duração, o parâmetro “Tentativa” foi substituído por janelas de tempo de 1 minuto cada (*time bins*), fazendo uma avaliação do desempenho minuto a minuto.

No teste de memória operacional, o fator entre-sujeitos se manteve. Porém, aos fatores intra-sujeitos, foi analisado também o ITI, uma vez que é requerido que o animal aprenda as contingências diárias de cada sessão.

Quando necessário, foi realizado o teste *post-hoc* de Tukey HSD.

4.2. Resultados

Os resultados do teste de memória de referência espacial estão apresentados na Figura 4.1.

O GLM mostrou que houve diferença significativa em relação ao fator Grupo nos parâmetros **latência** [$F(1,339) = 4,481$; $p = 0,035$] (Figura 4.1A) e **comprimento do trajeto** [$F(1,339) = 4,407$; $p = 0,036$] (Figura 4.1B), mas não em relação ao parâmetro **velocidade de natação** [$F(1,339) = 0,650$; $p = 0,420$] (Figura 4.1C). Em relação ao fator Sessão, observou-se diferença significativa nos parâmetros **latência** [$F(7,339) = 39,515$; $p < 0,0001$], **comprimento do trajeto** [$F(7,339) = 29,931$; $p < 0,0001$] e **velocidade de natação** [$F(7,339) = 2,787$; $p < 0,01$], mostrando que os animais se beneficiam das sessões anteriores para o aprendizado da tarefa. Esses resultados mostram que os animais dos dois grupos são beneficiados pelas sessões anteriores de forma semelhante. Ademais, não se observou diferença significativa na interação Grupo e Sessão nos mesmos parâmetros: **latência** [$F(7,339) = 0,959$; $p = 0,460$]; **comprimento do trajeto** [$F(7,339) = 0,648$; $p = 0,715$]; **velocidade de natação** [$F(7,339) = 0,114$; $p = 0,997$]. Isso mostra que os animais do grupo experimental, embora façam trajetos mais longos e demorem mais tempo para encontrar a plataforma, exibem taxa de aquisição da tarefa que não difere daquela exibida pelo grupo controle, ou seja, são capazes adquirir a tarefa encontrando a plataforma, comportamento que melhora ao longo das

sessões de treino.

O GLM mostrou que houve diferença significativa em relação ao fator Tentativa nos parâmetros **latência** [$F(2,339) = 11,818$; $p < 0,001$] e **comprimento do trajeto** [$F(2,339) = 11,200$; $p < 0,0001$], mas não no parâmetro **velocidade de natação** [$F(2,339) = 2,591$; $p = 0,076$], mostrando que os animais são capazes de se beneficiar das exposições anteriores dentro de uma mesma sessão para encontrar a plataforma. Não foram observadas diferenças significativas na interação entre Grupo e Tentativa nos mesmos parâmetros: **latência** [$F(2,339) = 0,430$; $p = 0,650$]; **comprimento do trajeto** [$F(2,339) = 0,427$; $p = 0,652$]; **velocidade de natação** [$F(2,339) = 0,608$; $p = 0,544$]. Esses resultados indicam que os grupos experimental e controle são beneficiados igualmente pelas exposições prévias dentro de uma mesma sessão.

Figura 4.1 - (A) Latência (em segundos); (B) Distância percorrida (em centímetros); (C) Velocidade de natação (em centímetros por segundo). Resultados em relação à localização da plataforma em função das 8 sessões de teste no labirinto aquático de Morris. Para efeitos de representação, calculou-se as médias (- SEM) das tentativas de cada sessão para os diferentes parâmetros.

Avaliação de memória de referência e extinção de resposta - “Probe Test”

Os resultados do *probe test* estão apresentados na Figura 4.2.

O GLM revelou ausência de efeitos significativos em relação ao fator Grupo nos parâmetros **comprimento do trajeto** [$F(1,84) = 2,855$; $p = 0,094$] (Figura 4.2A), **velocidade de natação** [$F(1,84) = 2,981$; $p = 0,087$] (Figura 4.2B) e **frequência de entradas no quadrante crítico** [$F(1,84) = 2,197$; $p = 0,141$] (Figura 4.2C). Foi encontrado efeito significativo para o parâmetro **porcentagem de tempo no quadrante crítico** [$F(1,84) = 6,283$; $p = 0,014$] (Figura 4.2D), mostrando que os animais do grupo experimental retornam mais vezes em relação ao grupo controle ao quadrante onde a plataforma se encontrava nas sessões anteriores, ao mesmo tempo em que apresenta os demais comportamentos semelhantes aos animais controle. Em relação ao fator Time Bin, o GLM revelou efeitos significativos nos parâmetros **comprimento do trajeto** [$F(2,84)=10,697$; $p<0,001$], **velocidade de natação** [$F(2,84)=9,916$; $p<0,001$], **frequência de entradas no quadrante crítico** [$F(2,84)=10,321$; $p<0,001$] e **porcentagem de tempo no quadrante crítico** [$F(2,84)=6,626$; $p<0,01$]. Com relação à interação entre Grupo e Time Bin, o GLM mostrou que não há diferença significativa nos parâmetros **comprimento do trajeto** [$F(2,84)=0,025$; $p=0,975$], **velocidade de natação** [$F(2,84)=0,024$; $p=0,976$] e **frequência de entradas no quadrante crítico** [$F(2,84)=2,112$; $p=0,127$].

Entretanto, observou-se diferença significativa para o parâmetro **porcentagem de tempo no quadrante crítico** [$F(2,84)=5,664$; $p<0,01$].

Figura 4.2 - (A) Comprimento do trajeto, expresso em centímetros; (B) Velocidade de natação, expresso em centímetros por segundo; (C) Frequência de entradas no quadrante crítico; (D) Porcentagem de tempo despendido no quadrante crítico. * $p=0,060$ no teste post-hoc.

Esses resultados indicam que os animais do grupo experimental apresentam diferença em relação ao controle em abandonar sua busca no local onde a plataforma se encontrava durante o treino, permanecendo maior porcentagem de tempo nesse quadrante. Note que o comprimento do trajeto e a velocidade não apresentam diferenças significativas, mostrando que a diferença observada não se deve a prejuízos motores associados à lesão no PL do vmPFC.

Memória operacional espacial

Os resultados do teste de memória operacional são apresentados na Figura 4.3.

No teste de memória operacional, o GLM não revelou efeito significativo para o fator Grupo nos parâmetros **latência** [$F(1,186)=0,011$; $p=0,914$] (Figura 4.3A), **velocidade de natação** [$F(1,186)=0,057$; $p=0,810$] (Figura 4.3B), **frequência de entradas no quadrante do dia anterior** [$F(1,186)=0,340$; $p=0,560$] (Figura 4.3C) e **tempo no quadrante do dia anterior** [$F(1,186)=0,003$; $p=0,950$] (Figura 4.3D), o que indica que nesta nova etapa de testes os animais exploraram o ambiente de forma não direcionada no labirinto, i.e., não orientaram sua busca por qualquer dos quadrantes da piscina, indicando que foram capazes de lidar com as novas contingências da tarefa, envolvendo nova localização da plataforma a cada dia.

Como esperado, foram observados efeitos significativos em relação ao fator Tentativa nos parâmetros **latência** [$F(2,186)=46,498$; $p<0,0001$] e

Figura 4.3 - (A) Latência, expressa em segundos; (B) Velocidade, em centímetros por segundo; (C) Frequência no quadrante onde a plataforma se localizava no dia anterior; (D) Tempo despendido no quadrante onde a plataforma se localizava no dia anterior, em segundos.

frequência de entradas no quadrante do dia anterior [$F(2,186)=30,137$; $p<0,000001$]. Como ilustra a Figura 4.3, os animais inicialmente exploram o quadrante onde a plataforma se localizava no dia anterior. Ao detectarem a ausência da plataforma naquela localização mudam e passam a explorar novamente todo o labirinto até encontrá-la. O efeito de latência mostra que os animais são capazes de se utilizar das informações aprendidas na primeira tentativa e se beneficiam dela nas tentativas subsequentes, mostrando que não há prejuízo de memória operacional espacial.

Ao contrário do esperado frente aos resultados do *probe test*, o GLM não mostrou efeito significativo para a interação entre Grupo e Tentativa nos parâmetros **latência** [$F(2,186)=0,049$; $p=0,951$], **frequência de entradas no quadrante do dia anterior** [$F(2,186)=0,073$; $p=0,928$] e **tempo despendido no quadrante do dia anterior** [$F(2,186)=1,255$; $p=0,287$]. Esses resultados indicam que os animais do grupo controle são capazes de extinguir o comportamento do dia anterior tão bem quanto os do grupo experimental, diferentemente do esperado com base nos resultados do “*probe test*”. Deve-se ponderar, no entanto, que enquanto o “*probe test*” foi realizado depois de várias sessões com a plataforma numa mesma localização, tratando-se de aquisição por treinamento extensivo, no presente caso a busca pela plataforma no local do dia anterior envolveu reforçar este local em apenas uma sessão, portanto após 3 tentativas apenas.

4.3. Discussão

Embora a lesão do PL do vmPFC não tenha levado a diferenças dramáticas de desempenho na tarefa de memória de referência no labirinto aquático de Morris, animais com lesão exibiram algum prejuízo, possivelmente relacionado à aquisição ou desempenho da tarefa.

Os resultados do “*probe test*” permitem avaliar tanto a memória de referência em relação à localização anterior da plataforma quanto a extinção da busca pela plataforma ao longo dos 3 minutos de teste, divididos em *time bins* de 1 minuto. Esse teste revelou diferenças dramáticas entre sujeitos com lesão no PL do vmPFC e sujeitos controle. Ainda que ambos os grupos busquem a plataforma no local onde ela se encontrava anteriormente, indicando plena funcionalidade de sistemas envolvendo memória espacial, animais lesados não extinguem esse comportamento ao longo do “*probe test*” sem a plataforma. Em outras palavras, enquanto animais controle extinguem sua busca pela plataforma no local previamente reforçado, animais com lesão no PL do vmPFC persistem em sua busca no mesmo local (Figura 4.3). Esses resultados corroboram dados de outros estudos que mostram que o vmPFC é crucial para a extinção de comportamentos aprendidos previamente (Bechara et. al, 1994). Interessantemente, pacientes com lesão orbitofrontal exibem comportamentos perseverantes, possivelmente relacionados à ausência da

atividade conjunta envolvendo o OFC e o vmPFC.

Estudos anteriores (de Bruin *et al.*, 1994) defendem que lesões a regiões frontais desencadeiam comportamentos persistentes no labirinto aquático de Morris. Os autores, entretanto, discutem seus resultados em termos de flexibilidade comportamental após uma tarefa de reversão, na qual a plataforma é apresentada no quadrante oposto àquele do treino inicial. Nesse trabalho, após realizar lesão em todo o córtex pré-frontal medial, os animais apresentaram um prejuízo em localizar a plataforma em comparação aos animais controle. Já neste trabalho, os animais foram expostos a um treino repetitivo na tarefa de memória de referência espacial no labirinto aquático, sendo a plataforma apresentada no mesmo local ao longo de repetidas sessões de teste, o que pode ter contribuído para um aumento do comportamento persistente após lesão no PL do vmPFC. Os resultados do “*probe test*” confirmam a suposição de de Bruin *et al.* (1994) de que esse tipo de lesão causa aos animais uma incapacidade de rapidamente desengajar de um comportamento previamente aprendido.

Interessantemente, no entanto, os resultados do teste de memória operacional parecem apontar em outra direção, uma vez que não foram encontradas diferenças entre os animais lesados e os animais controle em quaisquer dos parâmetros analisados. Em conjunto, esses resultados indicam que pode haver uma distinção entre o processamento e gerenciamento de informações adquiridas com ou sem treinamento extenso,

sugerindo que o PL do vmPFC possa ter um papel importante no controle da extinção. O *probe test* foi executado após um treino extenso, no qual os animais deviam buscar a plataforma no mesmo local ao longo de dias consecutivos. Já na tarefa de memória operacional, na qual os animais deviam buscar a plataforma em diferentes locais a cada nova sessão, a breve informação acerca dos locais reforçados na sessão anterior não pareceu ser afetada pelo dano ao PL do vmPFC. Dessa maneira, o PL do vmPFC parece exercer influência sobre a extinção de informações treinadas extensivamente, porém não sobre informações pouco treinadas, uma vez que os animais lesados não diferiram dos animais controle na tarefa de memória operacional.

4.4. Conclusão dos Experimentos 1 e 2

Os resultados dos Experimentos 1 e 2 mostram que lesões seletivas do PL do vmPFC não alteram os níveis de ansiedade dos animais, o que corrobora estudos envolvendo pacientes humanos com lesões em regiões homólogas (Koenigs *et al.*, 2008; Simpson *et al.*, 2001). A influência do PL do vmPFC sobre a amígdala observada em estudos com seres humanos pode estar relacionada com a natureza das lesões, muito mais agressivas do que as lesões seletivas usadas no presente modelo animal. No caso das lesões seletivas utilizadas no presente estudo, não ocorre lesão das fibras

de passagem, ou seja, somente os corpos celulares de neurônios presentes no local da infusão da droga são afetados, mantendo as conexões entre outras estruturas nervosas cujas fibras passam por essa região. Já em estudos com pacientes neurológicos, não há como controlar a extensão da lesão, aumentando a possibilidade de que mais estruturas estejam lesadas, fazendo com que determinado comportamento seja um resultado da lesão em diversas regiões simultaneamente. No caso do presente estudo, apenas a região PL foi lesada.

Dado o grande número de conexões entre o PL do vmPFC e outras regiões, como o hipotálamo e o córtex cerebral, é possível que outros sistemas possam estar envolvidos no controle de cima para baixo sobre a amígdala, regulando respostas emocionais através de diferentes circuitos que possam envolver o PL do vmPFC, sem que esta seja, necessariamente, a estrutura central nesse controle. Os resultados do presente trabalho sugerem que o PL do vmPFC é crucial para o comportamento de avaliação de risco, como observado no LCE. Supõe-se que, sendo uma estrutura envolvida em avaliação de consequências, provavelmente há uma ação conjunta com o córtex orbitofrontal em um sistema complexo. Essas dificuldades de avaliação de risco podem ser responsáveis pelo comportamento persistente dos animais lesados durante o desempenho no “*probe test*” no labirinto aquático de Morris, levando assim mais tempo

para a extinção de um comportamento outrora efetivo, porém agora inefetivo.

5. Experimento 3

5. Experimento 3

Estabelecimento do protocolo para a tarefa comportamental envolvendo escolhas entre quantidades distintas de alimento em função da duração de atrasos na liberação de reforço e registro multiunitário de neurônios do córtex orbitofrontal concomitante à execução da tarefa.

5.1 Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados 8 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos e ingênuos, oriundos do biotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, com aproximadamente 3 meses (300 ~ 350g) quando do início dos experimentos. Os animais eram acondicionados individualmente em caixas e colocados em um ambiente controlado com ciclo de claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00). Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo. Os animais foram mantidos em restrição alimentar envolvendo a oferta de 18g de ração (Nuvilab) por dia por animal. Água foi disponibilizada *ad libitum* durante todo o período de utilização dos animais. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Aparelho experimental

O aparelho utilizado em nosso laboratório passou por extensiva fase de testes em experimentos similares e provou-se eficiente para o desenvolvimento da tarefa de tomada de decisões envolvendo escolhas de quantidades de alimento em função do atraso do reforço. Trata-se de uma caixa de acrílico de 26 x 26 x 26 cm que possui em uma de suas paredes um conjunto de 3 buracos dispostos lado a lado horizontalmente e um comedouro. Cada um dos buracos é confeccionado com um tubo quadrado de aço inoxidável medindo 2,5cm de lado x 4,5cm de comprimento. No fundo de cada buraco, há um LED (do inglês: Diodo Emissor de Luz) de cor branca que se acende e se apaga com precisão de milissegundos acionados por um microcontrolador. Os LEDs são usados para indicar ao animal o início de cada tentativa e as opções de buracos disponíveis para focinhar. Um LED posicionado no teto da caixa ilumina seu interior difusamente, com 15 Lux ao nível do assoalho sob o LED do teto. Uma câmera permite a transmissão da imagem para um monitor externo. Imediatamente abaixo dos buracos e 1 cm acima do assoalho está localizado o comedouro, onde o animal recebe reforço (*pellets* de chocolate com peso médio de 17mg). Fora da caixa de acrílico, encontra-se um dispensador de *pellets* de chocolate. A programação para controle da tarefa, dos LEDs, assim como do dispensador, é feita através da plataforma *open-source* Arduino (para figuras, ver Apêndice II).

O aparelho todo está contido dentro de uma caixa de madeira, preta,

com atenuação acústica através de vedação com borracha isolante. Fora da caixa encontra-se o monitor de vídeo, através do qual o experimentador monitora a atividade do animal, um exaustor que promove a circulação do ar no ambiente onde se encontra o aparelho e a plataforma Arduino, que controla as funções da caixa onde se dá o treinamento diário do animal.

Toda a montagem do aparelho experimental, inclusive a programação para controlar o equipamento, foi desenvolvida em nosso laboratório.

Protocolo de treino

O protocolo de treino envolve etapas sucessivas e graduais. Os focinhadores, quando tratados especificamente, serão doravante denominados buraco central (BC) e buracos laterais (BL), estes últimos podendo ser buraco esquerdo (BE) ou buraco direito (BD).

Etapa 1 - duração de 1 sessão

Inicialmente, 3 animais são colocados simultaneamente na caixa de condicionamento operante. Todos os LEDs encontram-se acesos. Os animais podem explorar livremente a caixa e, devido às dimensões exíguas para conter 3 animais, um deles inevitavelmente passa a explorar o comedouro e os focinhadores presentes, ganhando *pellets* de chocolate (Choco Power Ball, Mavalério) cuja liberação é acionada por meio de uma chave remota pelo experimentador. O desenvolvimento de interesse por

parte desse animal acaba por chamar a atenção dos demais, que passam também a explorar os focinhadores e o comedouro, sendo também reforçados. Nesta etapa, a liberação dos *pellets* de chocolate pode ser acionada de duas maneiras: quando o animal insere o focinho nos focinhadores ou quando se encontra próximo a eles, sendo reforçado remotamente pelo experimentador. Dessa forma, atrai-se a atenção dos animais quando encontram-se com a cabeça próxima aos focinhadores.

Etapa 2 - duração de 1 a 2 sessões

Nesta etapa, cada animal é colocado individualmente na caixa. Todos os LEDs são acesos. Os animais recebem reforço somente quando inserem o focinho em um dos focinhadores.

Etapa 3 - duração de 1 a 2 sessões

Nesta etapa apenas 1 dos 3 LEDs é aceso de maneira aleatória a cada tentativa, garantindo-se que cada LED seja aceso por igual quantidade de vezes em relação aos demais. A parte final da etapa se dá quando o animal é capaz de focinhar 10 vezes consecutivas o buraco cujo LED se encontra aceso, independentemente de qual seja.

Etapa 4 - duração de 5 a 6 sessões

Na etapa final de treino, o animal recebe reforço se focinhar o BC

seguido de um BL, quer seja BE ou BD, sendo as sequências apresentadas de forma aleatória. Esta etapa de treino tem fim quando o animal é capaz de focinhar 60 vezes, não necessariamente consecutivas, a sequência correta BC-BL.

Etapa 5 - Tarefa comportamental

O paradigma utilizado é baseado nos experimentos desenvolvidos por Mobini *et al.* (2002).

Na etapa 5 as fases do experimento são classificadas como se segue:

- **Sessão:** corresponde a cerca de 60min de treino (podendo se estender além disso) em um dia para cada animal. Cada sessão inclui 4 blocos;
- **Bloco:** cada bloco corresponde a um conjunto de 40 tentativas. Cada sessão possui 4 blocos (160 tentativas no total), os quais são apresentados com atrasos sucessivos de 0, 1, 3 e 5s em cada bloco;
- **Tentativa:** cada tentativa equivale a uma escolha em que o animal focinha um dos buracos do aparelho, sendo reforçado de acordo com o buraco que focinha.

Assim, em cada sessão de teste os animais são expostos a 4 blocos com 40 tentativas cada. Cada um dos blocos envolve um atraso diferente na liberação do reforço: 0, 1, 3 e 5s sucessivamente ao longo dos blocos.

As primeiras 16 tentativas de cada bloco são “tentativas forçadas”. O animal deve focinhar o BC ao seu acendimento e logo a seguir deve focinhar um dos BLs, o que for aceso. Ao executar essa sequência BC > BL (aceso), o animal é reforçado. Em outras palavras, nessas tentativas, o animal deve focinhar BC, seguido do BL que estiver aceso, que é apresentado aleatoriamente, mas garantindo que 50% das tentativas seja em BE e as outras 50%, em BD.

Os animais são divididos em dois grupos e, para cada grupo, um dos lados é fixado como lado com reforço maior, sendo o teste contrabalanceado entre os animais. Essas tentativas iniciais são inseridas com o intuito de mostrar para os animais a regra vigente em cada bloco para os animais, ou seja, para informar o lado que leva ao maior reforço,

Figura 3.1 – representação esquemática de uma tentativa de escolha, na qual o animal pode ser reforçado imediatamente com 1 *pellet* ou após intervalos variáveis com 4 *pellets*.

assim como o atraso na sua liberação a cada bloco. Seguidas essas

tentativas, o animal é exposto, dentro do mesmo bloco, a outras 16 tentativas forçadas que seguem o mesmo padrão de reforço mencionado acima; estas, porém, são entremeadas por 8 tentativas de escolha livre, nas quais ambos os BLs são acesos simultaneamente, permitindo ao animal que realize a escolha (Figura 3.1).

Essas 8 tentativas de escolha livre em cada bloco (portanto, um total de 32 tentativas de escolha livre em uma sessão de teste) são informativas da escolha dos animais referentes a cada lado. Ou seja, todas as demais tentativas na sessão ocorrem com o intuito de que o animal, além de não ser enviesado para um dos lados da caixa, possa compreender a regra vigente e tomar uma decisão (realizar uma escolha) baseado nas contingências da tarefa.

Grupos experimentais

Os animais (n=6) foram divididos em 2 grupos, ambos experimentais, porém contrabalanceados, ou seja, metade recebendo o reforço maior (4 *pellets* de chocolate) em BE e a outra metade, em BD. Esses grupos de animais foram testados na tarefa comportamental envolvendo atrasos crescentes na liberação de reforço ao longo dos blocos.

Com o intuito de verificar se os resultados experimentais não estariam enviesados devido a essa ordem crescente e fixa e para se avaliar

a flexibilidade comportamental na tarefa, decidiu-se expor um grupo separado de animais (n=2) à ordem decrescente de atraso na liberação de reforço ao longo dos blocos (5, 3, 1 e 0s sucessivamente) após serem treinados em ordem crescente de atrasos. Dessa maneira, pôde-se confrontar os resultados desses grupos, esperando-se obter resultados inversos entre deles.

Após o estabelecimento e análise dos dados da tarefa comportamental, 3 animais foram submetidos à cirurgia de implante crônico unilateral de matrizes 4 x 5 de eletrodos (20 eletrodos) duas semanas após atingirem a etapa 5 (teste) do protocolo de treino, sendo sua atividade eletrofisiológica registrada por 7 dias durante o desempenho da tarefa.

Eletrodos

Matrizes de 20 eletrodos (4 x 5) foram implantadas unilateralmente no córtex orbitofrontal esquerdo dos animais de acordo com metodologia estabelecida na literatura (Shin and Chapin, 1990; Nicolelis *et al.*, 1993; Nicolelis *et al.*, 1995; Chapin and Nicolelis, 1996; Nicolelis *et al.*, 1997a; Nicolelis *et al.*, 1997b; Chapin *et al.*, 1999; Chapin and Nicolelis, 1999; Nicolelis and Chapin, 2002). Para detalhes acerca da confecção, ver Apêndice III.

Cirurgia para implante crônico de matriz de eletrodos

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (50mg/mL) e Xilazina (20mg/mL), em volume de 0,3 mL/100g de peso animal. Após realizada a tricotomia (remoção dos pelos da cabeça do animal) com o intuito de expor o local da incisão, os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Alemanha), no qual foi realizado o procedimento cirúrgico. Após a incisão por bisturi, o crânio foi exposto e realizou-se a trepanação de maneira a conter a matriz de eletrodos. As coordenadas almejadas englobavam o intervalo entre as coordenadas AP +3,7 e AP +4,9 e entre ML +1,2 e ML +2,8 (delimitando um retângulo). A coordenada DV foi a mesma para toda a matriz de eletrodos, DV -5,0, inserindo os eletrodos no córtex orbitofrontal (Paxinos e Watson, 2005). Dessa maneira, a linha inicial de 4 eletrodos foi inserida na coordenada AP +4,9 (mais anterior), enquanto a quinta fileira com 4 eletrodos foi inserida na coordenada AP +3,7 (mais posterior). Da mesma forma, a coluna mais medial de 5 eletrodos foi direcionada para a coordenada ML +1,2 (mais medial), enquanto a coluna de 5 eletrodos mais lateral foi direcionada para a coordenada ML +2,8 (mais lateral). Com o intuito de fixar o implante no crânio, foram posicionados 3 parafusos de forma que não atrapalhassem a inserção da matriz ou do conector. No caso da cirurgia de implante de eletrodos, os parafusos devem tocar a dura-máter para que se feche o circuito e se promova o aterramento (referência) local. Dessa maneira, o soquete no

qual os eletrodos se encontram pode ser aterrado e o sinal captado pelos eletrodos é livre de ruído interno oriundo do animal (movimentação, fluxos iônicos em canais de membranas, entre outros). Uma matriz de 20 eletrodos (4 x 5), cada eletrodo com 50 μ m de diâmetro externo e distante 300 μ m dos eletrodos adjacentes, isolados com uma camada de material inerte (Teflon), cada um com impedância aproximada de 1M Ω , foi inserida unilateralmente na estrutura. A matriz de eletrodos e o conector eram inicialmente fixados ao crânio com cola de cianoacrilato (Permabond). Entretanto, uma vez que essa substância não é recomendada para uso em material orgânico, decidiu-se utilizar acrílico odontológico auto-polimerizante (Jet) nas cirurgias subsequentes. O local da trepanação foi vedado com esponja absorvível (Gelfoam) de maneira a impedir a entrada de acrílico auto-polimerizante no orifício.

Após a cirurgia, os animais passaram por um período de 10 dias de recuperação, quando se deu a retomada dos experimentos.

Identificação e separação das unidades registradas

Os formatos de onda obtidos são sobrepostos, de maneira a se verificar a consistência do sinal ao longo da aquisição. Além disso, uma análise de clusters é feita através de uma análise do tipo PCA (análise de componentes principais), capaz de comparar ondas através de uma análise da variância de cada ponto da curva em relação aos pontos de outra onda,

plotando em um gráfico bi ou tridimensional de posições clusters que correspondem a cada unidade neuronal captada por cada eletrodo presente na matriz. As ferramentas presentes nesse *software* incluem outros diversos tipos de análise, todas com o intuito de separar sinais correspondentes a neurônios diferentes, bem como separar sinais neuronais de ruídos captados pelos eletrodos. Essa separação preliminar é confirmada ou descartada através da função autocorrelação. Essa função pode ser entendida como o disparo neuronal em um tempo $t + \Delta t$ dada a ocorrência de um disparo no tempo t , correlacionando um disparo àquele que o precede (Rieke *et al.*, 1999). O intuito dessa análise é verificar a probabilidade de ocorrência de potenciais de ação no tempo de registro referente à unidade avaliada. Dessa forma, divide-se o tempo de coleta de dados em bins de 1ms para se avaliar se há uma probabilidade maior do que 0 de ocorrer mais de um potencial de ação em menos de 1ms. Caso haja, pode-se garantir que não se trata de uma unidade isolada de ruído, uma vez que o período refratário de um neurônio impede que haja mais de um disparo em um tempo inferior a 2~3ms.

Terminada a filtragem do sinal, os dados de tempo e disparos neuronais foram obtidos através de *software* apropriado (Neuro Explorer - NEX Technologies, MA, EUA). Por meio desse *software*, pode-se obter os valores temporais nos quais houve cada disparo neuronal e cada evento

dentro da tarefa comportamental. O processo de filtragem, limpeza e avaliação do sinal é feito individualmente para cada eletrodo da matriz. Para sinais mais ruidosos, utilizou-se uma rotina em Matlab (MathWorks) disponível *online* (Quiroga *et al.*, 2004).

Esse processo de filtragem, limpeza e avaliação do sinal é feito individualmente para cada eletrodo da matriz.

Análise estatística

Os resultados comportamentais foram analisados utilizando-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) após transformação arcosseno. Dados desse tipo formam uma binomial ao invés de uma distribuição normal. Portanto, foi utilizada a transformação arcosseno para aproximar esses dados de uma curva normal. Entretanto, utilizou-se uma variação da transformação de Freeman e Tukey (1950 *apud* Zar, 2010), mais apropriado para proporções grandes ou pequenas, próximas de 0 e 1 (Zar, 2010).

Efeitos de “Bloco” e “Sessão” foram analisados para verificar a influência desses fatores no tipo de escolha dos animais. O fator “Bloco” afere a diferença entre a porcentagem de escolhas feitas no lado com maior reforço envolvendo diferentes atrasos na liberação. Já o fator “Sessão” afere a melhora do desempenho do animal dia a dia, ou seja, traça a curva

de aprendizado de acordo com o treinamento prévio naquela tarefa. Para as análises foram utilizados os pacotes estatísticos *Statistica 10* (StatSoft, Tulsa, OK, USA) e *SigmaPlot* (Systat Software Inc.).

A análise das taxas de disparos neuronais relacionadas a cada contingência em cada bloco dentro de uma sessão foi feita comparando-se as taxas de disparos médias para cada neurônio avaliado através de uma análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e teste *post hoc* de Tukey HSD com nível de significância para $p < 0,05$.

5.2. Resultados

Os resultados que se seguem são oriundos de 17 sessões experimentais. Os gráficos apresentados referem-se à porcentagem de escolhas no lado com maior reforço em função dos diferentes atrasos na liberação.

Em relação ao experimento envolvendo o grupo de ratos exposto a blocos de tentativas com atrasos crescentes, a ANOVA revelou efeitos significativos para o fator Sessão [$F(16,320) = 10,357$; $p < 0,00001$], mostrando que os animais são capazes de se beneficiar das sessões de treino anteriores para melhorar seu desempenho (conseguir mais *pellets* de chocolate) nas sessões posteriores (Figura 3.2). A ANOVA também revelou efeito significativo para o fator Bloco [$F(3,20) = 26,730$; $p <$

0,000001] (Figura 3.3). O efeito indica que os animais apresentam diferenças de escolha em função do atraso na liberação do reforço em cada bloco, indicando que são capazes de aprender acerca das contingências apresentadas, beneficiando-se das tentativas forçadas para depreender a regra da tarefa naquele determinado bloco. Com isso, são capazes de alterar de forma quase instantânea sua estratégia de escolha, passando a preferir um reforço menor, porém imediato, quando os atrasos na liberação são maiores. Para a interação Sessão x Bloco, a ANOVA não mostrou efeitos significativos [$F(48,320) = 0,97538$; $p = 0,52363$], indicando que o desempenho dos animais em cada bloco dentro de cada sessão não varia. A análise *post-hoc* revelou diferenças significativas entre os blocos 1 e 3 (atraso de zero versus atraso de 3s; $p < 0,01$), 1 e 4 (atraso de zero versus atraso de 5s; $p < 0,001$). O *post-hoc* revelou também diferenças significativas entre as sessões 5 e 15 ($p < 0,05$) e 5 e 16 ($p < 0,01$). Isso indica que os animais se utilizaram de informações de sessões prévias para elaborar uma estratégia a longo prazo.

Os dados do experimento envolvendo o grupo exposto a atrasos decrescentes foram analisados da mesma maneira. Foram analisadas 6 sessões no total. Entretanto, a sessão inicial envolvendo a nova regra foi analisada separadamente, uma vez que se apresenta como uma fase de transição (Figura. 3.3). Na primeira sessão não se observou diferença

significativa em relação ao fator Bloco [$F(3,4) = 0,385$; $p = 0,77$], mostrando que a alteração da regra causou uma desestruturação na estratégia de escolhas adotada pelos animais até aquele momento. Nas 5 sessões subsequentes, observou-se um aumento significativo do número de escolhas no lado com maior reforço ao longo dos blocos [$F(3,4) = 8,935$; $p < 0,05$], indicando que os animais de fato se utilizam dos atrasos para elaborar uma estratégia comportamental, não sendo enviesados por cansaço ou saciedade (Figura. 3.3).

Figura. 3.2 – médias ($\pm$ SEM) da porcentagem de escolhas do lado B (maior reforço) ao longo das sessões experimentais.

Figura. 3.3 – médias ($\pm$ SEM) da porcentagem de escolhas do lado B (maior reforço) analisadas por bloco. S 1-17: sessões 1-17 do grupo exposto a atrasos crescentes; S 1i: primeira sessão do grupo exposto a atrasos decrescentes; S 2-6i: sessões 2 a 6 do grupo exposto a atrasos decrescentes.

A análise dos dados eletrofisiológicos foi feita calculando-se a taxa média de disparos (em *spikes/s*) de 65 neurônios registrados durante a execução da tarefa comportamental. A ANOVA mostrou que houve diferença significativa entre os blocos [$F(3,256) = 25,918$; $p < 0,00001$], sugerindo uma relação entre a diminuição da taxa de disparos dessa região e a escolha do lado envolvendo o reforço menor, porém imediato (Figura 3.4).

Figura 3.4 – médias ($\pm$ SEM) da taxa de disparos (*spikes/s*) de 65 neurônios registrados durante a execução da tarefa comportamental.

5.3. Discussão

Os resultados mostram que a tarefa comportamental é eficiente para a avaliação da tomada de decisões envolvendo atraso na liberação do reforço. Os animais parecem ser capazes de se utilizar das regras vigentes em cada bloco para alterar sua estratégia de ganho. Além disso, a tarefa envolvendo a maioria de escolhas de maneira forçada parece ser eficiente em prevenir uma lateralização preferencial por parte dos animais.

A Figura 3.3 mostra que os animais apresentam comportamento

mais impulsivo conforme o atraso na liberação do reforço aumenta, ou seja, preferem um reforço menor, porém imediato em detrimento de um maior, porém com atraso.

Este experimento foi capaz de replicar, nas nossas condições experimentais, os dados descritos por Mobini *et al.* (2002), porém mostrando que o mesmo efeito obtido por aquele grupo ocorre em atrasos menores do que os apresentados por eles, que chegam a até 30s. Aqui, mostramos que com apenas 5s de atraso, os animais já passam a apresentar uma diferença significativa na escolha do reforço com atraso, passando de um valor próximo de 80% para aproximadamente 50%. Essas diferenças podem se dever ao fato de o trabalho de Mobini *et al.* (2002) ter sido realizado com ratos Wistar fêmeas, ao contrário do presente trabalho, no qual foram utilizados ratos Wistar machos. Além disso, esses autores utilizaram *pellets* de ração, enquanto no presente trabalho foram utilizados *pellets* de chocolate que, possivelmente, apresentam um valor reforçador maior, gerando assim maiores efeitos de contraste de incentivo.

Esse paradigma foi adotado com o intuito de evitar que o animal desenvolva algum tipo de preferência por um dos buracos laterais, comportamento comumente observado nesse tipo de tarefa comportamental. Dessa forma, a tentativa de escolha livre torna-se imprevisível para o animal, evitando o desenvolvimento de algum tipo de

preferência por um dos BLs. Além disso, essas tentativas funcionam como uma quebra na expectativa por uma tentativa forçada, colocando o animal frente a uma situação inesperada, na qual deve realizar uma escolha imediatamente, sem planejamento prévio. A apresentação de grande quantidade de tentativas forçadas somada ao treinamento ao longo de várias sessões, parece fazer com que os animais possam se beneficiar do conhecimento prévio adquirido sobre a regra vigente, aumentando sua escolha pelo lado com maior reforço em atrasos baixos.

De acordo com os resultados, observa-se na sessão 5 que os animais atingem uma média de escolhas próxima de 75% de reforço maior, enquanto nas sessões 15 e 16 essa percentagem se aproxima de 50%. Ao confrontar esses resultados com aqueles obtidos na análise por bloco, depreende-se que os animais passam a escolher cada vez menos o lado mais reforçador ao longo dos blocos, ou seja, a escolha pelo lado mais reforçador nas sessões 15 e 16, embora próxima de 50%, concentra-se nos blocos iniciais (atrasos de 0 e 1s) e não nos blocos finais. Aparentemente, os animais avaliam as várias possibilidades de ganho na tarefa ao longo das sessões e são capazes de ajustar seu comportamento em prol de maximizar os benefícios e minimizar os custos. Ainda que sejam menos reforçados ao escolher apenas 50% das tentativas com reforço maior, despendem menos tempo na tarefa, o que, dada a curva de aprendizado da Figura 3.2, parece

ser uma estratégia mais vantajosa.

Os resultados obtidos através do registro eletrofisiológico mostram que há neurônios no córtex orbitofrontal que codificam informações acerca de contingentes e características de circunstâncias vigentes em determinado contexto. A ativação desses neurônios de maneira diferencial em cada bloco dentro de uma mesma sessão sugere que possa haver uma participação crucial do OFC na elaboração de estratégias tanto a curto quanto a longo prazo. Uma participação do OFC na elaboração de estratégia e análise de contingentes vai de acordo com referências da literatura que apontam para uma função de avaliação de recompensa e prejuízos na obtenção de resultados mais vantajosos em animais e pacientes com lesão nessas regiões (Bechara *et al.*, 1994; Bechara *et al.*, 2000; Berns *et al.*, 2001; Hikosaka *et al.*, 2000; Kennerley *et al.*, 2009, Kennerley e Wallis, 2009; Pais-Vieira *et al.*, 2007). Além disso, os resultados apontam que um comportamento impulsivo parece estar relacionado com uma diminuição da atividade do OFC, como observado em pacientes com lesões nessa região. Entretanto, os resultados obtidos no teste comportamental (Figura 3.2) sugerem que a impulsividade pode ser compreendida de duas maneiras: (1) como uma incapacidade de se avaliar as condições vigentes em determinadas situações, como é o caso de pacientes com lesão, ou (2) como uma estratégia comportamental baseada

na retenção de informações prévias, avaliação refinada dessas informações e avaliação de balanços e probabilidades em termos de perdas, ganhos, esforço despendido e balanço energético para, a longo prazo, emitir um comportamento que seja vantajoso em relação a todos esses fatores. Dessa forma, o pico na percentagem de escolhas a partir da quinta sessão experimental (Figura 3.2) e seu gradual decréscimo poderiam sugerir que o animal testou uma estratégia na qual recebe benefícios muito altos (sessão 5), mas que apresenta um custo igualmente elevado (quanto maior o número de escolhas no lado com atraso, maior o tempo de duração da tarefa comportamental), passando a alterar seu comportamento a fim de trazer o balanço entre custo e benefício a níveis aceitáveis. Nesse sentido, a atividade neuronal do OFC ao longo dos blocos das sessões experimentais podem sugerir a participação dessa estrutura no controle refinado da elaboração de estratégias tanto a curto quanto a longo prazo.

6. Experimento 4

6. Experimento 4

Registro eletrofisiológico de neurônios do córtex orbitofrontal na tarefa de tomada de decisões e análise de correlatos eletrofisiológicos ao comportamento em cada evento da tarefa.

6.1. Materiais e Métodos

Animais

Foi utilizado um outro grupo de animais, 6 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos e ingênuos, oriundos do biotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, com aproximadamente 3 meses (300 ~ 350g) quando do início dos experimentos. Os animais eram acondicionados individualmente em caixas e colocados em um ambiente controlado com ciclo de claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00). Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo. Os animais foram mantidos em restrição alimentar de 18g de ração (Nuvilab) por dia por animal. Água foi disponibilizada *ad libitum* durante todo o período de utilização no experimento.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Teste comportamental

Foi utilizado o mesmo teste descrito no Experimento 3. Entretanto, neste experimento todos os animais tiveram a atividade eletrofisiológica do OFC registrada com o intuito específico de se correlacionar a atividade neuronal com as tentativas de escolha na tarefa comportamental. Embora a sessão toda tenha sido registrada, a análise foi focada nos momentos em que o animal deve, de fato, efetuar a escolha, ou seja, nas tentativas em que ambos os BL são apresentados (Figura 4.1). Neste experimento não foram apresentadas sessões com atrasos decrescentes na liberação do reforço, ao contrário do Experimento 3. Somente atrasos crescentes na liberação do reforço foram utilizados.

Figura 4.1 – representação esquemática de uma tentativa de escolha na tarefa comportamental, semelhante à descrita anteriormente. Aqui, o sinal neuronal foi obtido com o intuito de se avaliar as etapas mostradas na figura com ondas representativas de potenciais de ação.

Grupos experimentais

Um total de 6 animais foi utilizado neste experimento. Os animais foram separados em dois grupos com 3 animais cada, de maneira a se contrabalancear as condições de apresentação de atraso e reforço, conforme descrito no Experimento 3.

Eletrodos

Todos os animais receberam implante unilateral de matriz de 20 eletrodos (4 x 5) no córtex orbitofrontal esquerdo, nas mesmas coordenadas utilizadas no Experimento 3.

Cirurgia para implante crônico de matriz de eletrodos

As cirurgias foram executadas da mesma maneira como descrito no Experimento 3.

Análise dos correlatos eletrofisiológicos dos comportamentos

O intuito da análise de dados deste experimento é refinar os resultados encontrados no Experimento 3. Para se avaliar os correlatos neuronais ao comportamento, utiliza-se sinais digitais do tipo TTL para enviar ao sistema de registro Plexon um pulso de 5V em alta frequência, identificando cada evento relevante da tarefa comportamental. Dada a capacidade de aquisição do equipamento de 40kHz, podemos enviar pulsos

de alta frequência para serem detectados pelo sistema de registro, identificando cada um dos momentos críticos de uma tentativa, incluindo (1) início de uma tentativa com o acendimento do LED da caixa de condicionamento operante e seu desligamento (*house light*); (2) acendimento e apagamento do LED do buraco central; (3) acendimento e apagamento dos BLs; (4) acionamento do motor responsável pela liberação do reforço; (5) resposta do rato aos buracos central, direito e esquerdo (um TTL é gerado quando da interrupção do feixe infravermelho gerado pelas fotocélulas presentes nos focinheiros), sendo cada pulso enviado em um canal diferente. Cada TTL funciona como um marcador temporal, sendo enviado em um canal dedicado entre os 16 disponíveis pelo equipamento de aquisição, permitindo que se identifique o lado atendido pelo animal em cada tentativa. Dessa maneira, a atividade neuronal pode ser analisada em termos da taxa de disparos de determinado neurônio em relação ao evento, marcado através da aquisição desse pelo sistema. A altíssima resolução temporal garante que o evento seja detectado com um atraso pequeno a ponto de não se perder sequer um potencial de ação, uma vez que o evento se dá com duração de 1ms, enquanto o curso temporal de um potencial de ação ultrapassa 3ms. Com esses eventos devidamente sincronizados com os dados de registro de disparos neuronais, pode-se relacionar os potenciais de ação obtidos com cada um dos eventos de qualquer momento do experimento, em cada um dos tipos de tentativa. Neste experimento, os

marcadores temporais foram utilizados para avaliar a atividade neuronal do OFC durante as tentativas de escolha.

Todos os eventos são gerados a partir da ativação de uma porta de saída digital presente no sistema Arduino (que controla a tarefa experimental) através de programação apropriada.

Para tanto, foi analisada a alteração da frequência de disparos (*spikes/s*) durante as tentativas de escolha em cada bloco. Dessa maneira, uma vez que foi verificado que o córtex orbitofrontal apresenta uma diferença de frequência de disparos de acordo com o atraso na liberação do reforço, decidiu-se avaliar se há uma contribuição mais específica desses neurônios na elaboração do comportamento. Para tanto, comparou-se a taxa de disparos antes da escolha com a taxa de disparos que a sucede, buscando encontrar uma ativação diferencial quando o animal se encontra frente ao dilema da escolha.

Análise da atividade neuronal (frequência da taxa de disparos)

A análise da frequência de taxas de disparos em relação aos eventos foi feita deslocando-se a janela temporal dos registros da atividade neuronal para diferentes intervalos de tempo antes e depois da ocorrência dos eventos. Para cada neurônio, tomou-se como frequência de base a média de disparos registrados 100ms antes da apresentação das luzes

laterais (BE e BD simultaneamente, indicando uma tentativa de escolha livre) na tentativa. Essa média foi comparada com a média de disparos do mesmo neurônio nos 500ms que sucederam a apresentação das luzes laterais, ou seja, incluindo o tempo de processamento da informação e da resposta motora.

As respostas dos neurônios aos estímulos foram definidas como (1) excitatórias (doravante denominado “grupo excitatório”), quando taxa de disparos nos 500ms que sucedem a apresentação do estímulo aumenta em relação aos primeiros 100ms que o precedem (frequência de base) ou (2) inibitórias (doravante denominado “grupo inibitório”), quando a taxa de disparos nos 500ms que sucedem a apresentação do estímulo diminui em relação aos 100ms que o precedem. O teste utilizado foi o teste T de Wilcoxon (*Wilcoxon signed rank test*- WSR) com nível de significância para $p < 0,05$ entre os 100ms anteriores e os 500ms posteriores.

Identificação e separação das unidades registradas

As unidades registradas foram identificadas e separadas da mesma forma como descrito no Experimento 3.

Análise estatística da tarefa comportamental

A tarefa comportamental foi analisada da mesma forma como descrito no Experimento 3.

Comparação das médias de disparos ao longo do experimento

As unidades registradas que apresentaram significância estatística em relação à taxa de disparos antes e depois da apresentação simultânea dos BLs (doravante denominado estímulo) foram separadas em dois grupos distintos: excitatórios ou inibitórios. O grupo excitatório inclui os neurônios que tiveram sua taxa de disparos aumentada após a apresentação do estímulo, enquanto o grupo inibitório inclui os neurônios que tiveram sua taxa de disparos diminuída após a apresentação do estímulo. Para a análise das taxas de disparos relacionadas a cada contingência em cada bloco dentro de uma sessão, as taxas de disparos médias desses neurônios foram comparadas entre os neurônios registrados através de uma análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e teste *post hoc* de Tukey HSD com nível de significância para $p < 0,05$.

6.2. Resultados

Teste comportamental

A análise dos resultados comportamentais se refere a 9 sessões experimentais, iniciando-se a análise a partir da oitava sessão de teste. As 7 primeiras sessões não foram registradas, uma vez alterações prévias no sistema Arduino acarretaram mudanças na maneira como o programa registrava os dados. Portanto, os resultados do presente experimento

podem ser comparados somente com os resultados do Experimento 3 a partir da oitava sessão.

A ANOVA revelou efeitos significativos para o fator Sessão [$F(8,96) = 4,03$; $p < 0,001$], mostrando novamente que os animais passam

Figura 4.2 – médias ($\pm$ SEM) da porcentagem de escolhas no lado B (maior reforço). Novamente foi observada diferença significativa para o fator Sessão.

de uma estratégia na qual escolhem muito o lado com maior reforço, para uma a longo prazo que diminua os tempos de espera e mantenha a quantidade de reforço a níveis aceitáveis (Figura 4.2). O teste *post-hoc* mostra que a diferença significativa se dá entre as sessões 8 e 14, 8 e 15 e 8 e 16 ($p < 0,01$).

A ANOVA também revelou efeitos significativos para o fator Bloco [$F(3,12) = 74,676$; $p < 0,0001$], mostrando novamente que os animais passam a escolher cada vez menos o lado com maior reforço conforme se aumenta o tempo de espera (Figura 4.3). A análise *post-hoc* para esse parâmetro revela que a diferença significativa se dá já entre o 1º e o 2º bloco ($p < 0,01$). Não se observou diferença significativa para a interação Bloco x Sessão [$F(24,96) = 0,8006$; $p = 0,7275$].

Figura 4.3 - médias ($\pm$ SEM) da porcentagem de escolhas do lado B (maior reforço) ao longo dos blocos das sessões. Novamente houve diminuição significativa ao longo dos blocos.

Note que a ausência dos dados relacionados às sessões iniciais parece ter exacerbado os efeitos de bloco e sessão, uma vez que não se encontram presentes sessões iniciais nas quais os animais escolhem pouco o lado com maior reforço, de acordo com o Experimento 3 (Figura 3.2).

Análise dos dados eletrofisiológicos

Um total de 119 neurônios foram registrados e analisados com o teste T de Wilcoxon. Desses, 81 neurônios apresentaram alteração significativa da taxa de disparos nos 500ms subsequentes à apresentação do estímulo (BE e BD apresentados simultaneamente) em relação aos 100ms precedentes. Desses 81 neurônios, 50 foram inseridos no grupo inibitório e 28 no grupo excitatório, de acordo com a classificação dos grupos descrita anteriormente. Apenas 3 neurônios apresentaram tanto aumento quanto diminuição significativa da taxa de disparos, porém em sessões diferentes de experimento, não tendo sido incluídos na análise. Esses resultados indicam que o OFC parece, de fato, estar envolvido com o processo de escolha, uma vez que esses neurônios não apresentaram diferença significativa na taxa média de disparos em relação a outros eventos dentro da tarefa comportamental.

A Figura 4.4 mostra autocorrelogramas divididos em *bins* de 1ms para análise de ruído. A probabilidade de ocorrência de potenciais de ação, sendo de 0 ao redor do tempo 0, indica que não há mais de um disparo

nesse intervalo de tempo, o que condiz com o período refratário neuronal, de aproximadamente 3ms, que impede que haja outro disparo em uma mesma célula dentro de um intervalo inferior a esse.

Figura 4.4 – Histogramas com médias de disparos 100ms antes do evento e 500ms após de um neurônio inibitório (A) e de um neurônio excitatório (C) e autocorrelogramas correspondentes (B e D respectivamente) divididos em *bins* de 1ms. O tempo 0 indica o momento de apresentação do estímulo.

Na análise da média da taxa de disparos desses neurônios por bloco, inicialmente utilizou-se os resultados de todos os neurônios responsivos ao estímulo ($n = 81$ neurônios). A ANOVA não revelou efeito significativo na taxa de disparos desses neurônios no fator Bloco [$F(3,20) = 2,031$; $p < 0,05$] (Figura 4.5). Posteriormente, avaliou-se separadamente a taxa de disparos dos grupos de neurônios responsivos, ou seja, dos neurônios

excitatórios e inibitórios. A ANOVA de uma via não revelou efeitos significativos para a taxa média de disparos por Bloco no grupo dos neurônios excitatórios [$F(3,20) = 0,19$; $p = 0,901$] e nem para o grupo de neurônios inibitórios [$F(3,20) = 0,221$; $p = 0,88$] (Figura 4.5). O teste *post-hoc* de Tukey (HSD), embora tenha apresentado um valor baixo entre o bloco 1 e o bloco 3 ($p=0,1$), não apresenta diferença significativa. Entretanto, é possível que um aumento da amostra seja capaz de evidenciar efeitos nesse sentido.

Ao se comparar a média de disparos do grupo excitatório com a do grupo inibitório, a ANOVA não revelou efeitos significativos para o fator Bloco [$F(3,20) = 0,52$; $p = 0,673$] e para a interação Grupo e Bloco [$F(3,20)$

Figura 4.5 - frequência média de disparos dos neurônios responsivos. A. Total ($n = 81$); B. grupo excitatório ($n=28$); C. grupo inibitório ($n=50$).

= 0,066; $p = 0,977$]. Interessantemente, entretanto, a ANOVA revelou efeitos próximos de significativos para o fator Grupo [$F(1,20) = 4,045$; $p = 0,057$] (Figura 4.6), mostrando que neurônios que apresentam aumento da taxa de disparos em associação com a apresentação do estímulo apresentam a tendência de terem uma frequência de disparos média maior do que neurônios que diminuem sua ativação quando da apresentação do mesmo estímulo.

Figura 4.6 - Frequência média de disparos dos neurônios excitatórios e inibitórios dentro das sessões.

6.3. Discussão

O resultado obtido no teste comportamental mostrou, mais uma vez, que a tarefa é consistente para a avaliação do comportamento de escolha, uma vez que os resultados obtidos neste experimento foram muito similares àqueles obtidos no experimento anterior, aumentando também a credibilidade da comparação da atividade neuronal entre os experimentos 3 e 4.

Os resultados mostram que a atividade eletrofisiológica de neurônios do OFC se altera quando o animal se engaja em uma condição na qual uma decisão deve ser tomada, conforme observado pela comparação das taxas médias de disparos antes e depois da apresentação do estímulo. Entretanto, ao se avaliar somente as células responsivas, observa-se diferença tanto no tipo de resposta quanto na taxa basal de disparos ao longo do experimento, observado pela diferença significativa na frequência média de disparos entre os grupos excitatório e inibitório (Figura 4.6). Além disso, os resultados mostram que há populações de neurônios que se ativam de maneira diferente (grupos excitatório e inibitório), porém com certa coerência entre si, como se observa na taxa média de disparos nos dois grupos de neurônios registrados.

Curiosamente, embora não tenha havido diferença significativa entre as taxas de disparos nos blocos no teste *post-hoc*, observa-se uma

tendência nos gráficos que indicam que possa haver um processamento em um sentido entre o primeiro e o terceiro bloco, sendo esse último um ponto de virada. Parece haver uma tendência de aumento da taxa de disparos até o terceiro bloco. Porém, essa tendência é quebrada no quarto bloco, quando se observa uma diminuição da taxa de disparos, tanto para neurônios do grupo excitatório quanto para neurônios do grupo inibitório. Ao que parece, o processamento até o terceiro bloco parece atingir seu ponto máximo, alterando o padrão no quarto bloco. Esse processamento máximo no terceiro bloco pode estar relacionado aos resultados comportamentais observados no Experimento 3, quando a diferença significativa de escolhas pelo lado mais reforçador se dá a partir do terceiro bloco (também se observou diferença significativa no Experimento 4, porém somente o Experimento 3 levou em conta os dados de todas as sessões experimentais).

Além disso, esses resultados sugerem que a atividade neuronal mais baixa nos blocos 1 e 4 pode ser interpretada de duas maneiras distintas: (1) como um processamento inicial no desenvolvimento de uma estratégia, ou seja, a atividade neuronal é baixa no primeiro bloco, no qual o animal é exposto inicialmente à condição de escolha, devendo iniciar a interpretação dos contingentes apresentados; (2) como uma atividade neuronal baixa após já terem sido avaliados os contingentes da tarefa, sendo, possivelmente, influenciada pela experiência prévia adquirida nos blocos

anteriores. Assim, a atividade neuronal mais baixa (blocos 1 e 4) dessas células parece estar relacionada a momentos da tarefa nos quais o comportamento mais vantajoso parece ser mais evidente. No primeiro bloco, uma vez que não há atraso na liberação do reforço maior, faz sentido que o processamento neuronal requerido seja menor, uma vez que a estratégia mais vantajosa é óbvia. Já no quarto bloco o animal já obteve informações acerca do padrão de aumento do tempo de espera tanto de blocos anteriores, quanto de sessões anteriores de teste. Dessa forma, dado o grande tempo de espera no lado mais reforçador nesse bloco, faz sentido que o processamento também seja menor, já que, possivelmente, haja uma diferença grande entre o custo e o benefício, tornando mais evidente a estratégia mais favorável, possivelmente requerendo menor processamento neuronal.

O bloco 3, no entanto, impõe dificuldades maiores ao animal, uma vez que, possivelmente, o balanço entre o tempo de espera e o ganho ainda não parecem ser tão evidentes a ponto de o animal passar a tomar decisões sempre no mesmo sentido. É possível que esse balanço seja o responsável pela característica da curva: a avaliação dos custos e benefícios vai se tornando mais complexa até o bloco 3, quando volta a se tornar simples no bloco 4 devido ao grande tempo de espera pelo reforço. Nesse sentido, o bloco 3 seria o mais complexo da tarefa, no qual o conflito imposto ao

animal requer maior processamento. Essa interpretação reforça a hipótese discutida no experimento anterior de que uma diminuição da taxa de disparos poderia ser observada em respostas tidas como mais impulsivas, trazendo nova complexidade à discussão acerca da impulsividade. Isso também poderia explicar a diferença observada entre a média da taxa de disparos dos neurônios registrados nos Experimentos 3 e 4. É possível que haja uma diminuição geral da taxa de disparos quando se observa todas as células registradas, conforme observado no Experimento 3, havendo, entretanto, células que respondem aumentando sua atividade de acordo com as contingências envolvendo cada tipo de reforço. A avaliação geral das contingências pode se dar através da atividade conjunta tanto de neurônios responsivos ao estímulo (acendimento dos BLs simultaneamente) quanto de neurônios não responsivos ao estímulo, podendo ser a atuação sinérgica dessa rede a responsável pela elaboração da tomada de decisão.

7 – Discussão Geral

7. Discussão Geral

Os resultados descritos no presente conjunto de experimentos sugerem que há envolvimento do córtex pré-frontal no processo de tomada de decisões. Isso é observado devido aos seguintes resultados descritos anteriormente: (1) animais com lesão no PL do vmPFC mostram prejuízo no comportamento de avaliação de risco no LCE; (2) a lesão nessa região causa prejuízo na tarefa de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris sem causar alteração no desempenho em uma tarefa de memória operacional, indicando um problema de flexibilidade comportamental sobre comportamentos treinados extensivamente; (3) a atividade neuronal do OFC, medida através de registro eletrofisiológico em uma tarefa envolvendo tomada de decisões, é alterada conforme são alterados os contingentes envolvidos no desempenho da tarefa.

Os resultados do experimento envolvendo lesão no vmPFC vão em direção a experimentos descritos na literatura sugestivos da inexistência de um controle de cima para baixo do vmPFC sobre a amígdala envolvendo lesões em pacientes (Simpson *et al.*, 2001, Koenigs *et al.*, 2008). Embora estudos mostrem que há um controle do vmPFC sobre a amígdala em situações que não envolvem estresse (Arnsten, 2009), nossos resultados

sugerem que não há uma alteração nos níveis de ansiedade de animais com lesão nessa região.

A redução de comportamentos de avaliação de risco no LCE e o prejuízo de extinção em uma tarefa de busca pela plataforma no labirinto aquático de Morris levam à especulação de que o vmPFC é parte de um sistema que, embora receba conexões e se projete para a amígdala, não apresenta a função de controlar a atividade dela em um experimento envolvendo ansiedade e medo condicionado, como é o caso do LCE.

Hipoteticamente, as alterações de desempenho observadas tanto no LCE quanto no teste de memória de referência no labirinto aquático podem ser interpretadas sob um mesmo prisma, qual seja, a dificuldade do animal em fazer uma avaliação adequada do ambiente. Embora os dados referentes ao tempo despendido nos braços abertos do LCE descartem problemas de memória, o tempo baixo despendido no quadrado central sugere que haja uma dissociação entre a função representacional do ambiente e suas características e a função de codificação e planejamento dentro do mesmo ambiente.

Nesse sentido, a persistência no quadrante crítico no labirinto aquático de Morris na tarefa de memória espacial de referência (*probe test*) mas não na tarefa de memória operacional indica que o vmPFC é importante no desengajamento em caso de comportamentos treinados repetidamente. De fato, esses resultados vão de encontro à teoria proposta

por Damasio (1991, 1994) de que o vmPFC é o local onde são armazenados marcadores somáticos. Esses marcadores são memórias acerca de estados somáticos associados a eventos e recompensas determinados, que direcionariam a atenção para opções mais vantajosas baseado em experiências prévias, simplificando o processo de decisão. Essas experiências seriam geradas pela amígdala e recebidas pelo vmPFC através das projeções neuronais para essa estrutura. Essa hipótese sugere que lesões ao vmPFC resultariam em impossibilidade de utilização dos marcadores somáticos, uma vez que essa estrutura seria crucial para a conexão e contextualização entre os marcadores somáticos e o comportamento (Wood e Grafman, 2003). Uma vez que não há prejuízo de memória operacional no labirinto aquático, pode-se dissociar as funções cognitivas envolvidas na tarefa de memória operacional e as requeridas para a execução do LCE e de memória de referência espacial.

Os resultados descritos também podem ser confrontados com o modelo de controle atencional de Norman e Shallice (1986). Esse modelo, que propõe a existência de dois sistemas atencionais agindo hierarquicamente (um sistema automático e o SAS – Sistema Atencional Supervisor), é interpretado por alguns autores como um sistema atencional de processamento de informações, mais do que por um sistema atencional representacional e de seleção de informações a serem priorizadas (Wood e Grafman, 2003). Essa interpretação se dá devido ao fato de o modelo se

pautar em procedimentos de avaliação dos esquemas de representação, sequências de passos treinados extensivamente e, portanto, transformados em rotinas a serem seguidas quando se deseja emitir aquele comportamento (Allain *et al.*, 1999), requerendo inclusive menor quantidade de recursos atencionais. O SAS estaria localizado no PFC e conseguiria atuar sobre o sistema automático bloqueando-o quando a emissão de um comportamento a um estímulo deve ser evitada ou priorizada. De acordo com esse modelo, danos ao SAS deveriam resultar em distrações e prejuízos de concentração, o que é corroborado por estudos na literatura (Masterman e Cummings, 1997; Fuster, 1997; Dimitrov *et al.*, 1999). Entretanto, esse modelo propõe que o SAS está vinculado majoritariamente a informações novas, sobre as quais ainda não foram elaborados esquemas, sugerindo que comportamentos sobre os quais foram feitas rotinas não sejam afetados por lesões frontais. Entretanto, estudos mostram que nem sempre isso ocorre. Estudos de imageamento mostram que o PFC apresenta envolvimento acerca do conhecimento a respeito de eventos (Crozier *et al.*, 1999; Partiot *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2003) e estudos neuropsicológicos mostram que pacientes com lesões frontais não conseguem aprender sequências de comportamentos, que fariam parte de um esquema complexo (Allain *et al.*, 1999; Sirigu *et al.*, 1996).

Nossos resultados também sugerem um distanciamento do modelo de Norman e Shallice (1986) no sentido em que, embora animais com lesão

não apresentem prejuízo na aquisição da tarefa de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris, os animais com lesão no vmPFC são incapazes de lidar com essa informação, adquirida através de treino extenso, e alterá-la para emitir um comportamento mais vantajoso. De fato, observa-se que informações treinadas repetidamente apresentam correlatos neuronais em regiões mais mediais do PFC, enquanto informações novas apresentam ativação relacionada na parte mais anterior do PFC (Koechlin *et al.*, 2000).

Nesse sentido, pode-se atribuir ao vmPFC um papel de avaliação de experiências prévias, de geração de expectativas e de desengajamento atencional em caso de não reforçamento (Fougnie, 2008), podendo ser parte do SAS sem, entretanto, agir exclusivamente em função da memória operacional. Essas hipóteses são levantadas baseadas nos seguintes resultados: (1) a diminuição de tempo no quadrado central no LCE, indicando uma deficiência na avaliação de risco, pode sugerir um prejuízo na capacidade de se comparar a segunda exposição ao LCE à primeira exposição, porém em termos de processamento do ambiente, e não em termos representacionais de memória. Dessa maneira, poder-se-ia supor que, uma vez que não há prejuízo em termos de memória operacional no LCE, o vmPFC exerceria um papel importante em sistemas de atenção endógena, que seriam responsáveis pela avaliação de risco na segunda exposição ao aparelho experimental. Entretanto, embora seja um dos

centros armazenadores de informações relacionadas à memória operacional, como os esquemas, fica evidente que a lesão a nessa estrutura não atrapalha o desempenho na segunda exposição ao LCE, uma vez que os esquemas ainda, possivelmente, não tenham sido criados. Parece haver uma influência direta no processamento de informações que dependem de mecanismos atencionais, como avaliação de risco e tomada de decisões.

(2) A persistência no quadrante crítico no labirinto aquático na tarefa de memória espacial de referência (*probe test*) mas não na tarefa de memória operacional indica que, mesmo que estabelecido e armazenado o conhecimento acerca de determinado contingente fixo, o PL do vmPFC é capaz de acessar esses esquemas e alterá-los, possivelmente efetuando comparações acerca das características novas apresentadas. Dessa forma, permite que se altere a estratégia para uma mais vantajosa, no caso, o desengajamento do local previamente atendido. Possivelmente, uma vez que um comportamento é treinado extensivamente e se torna um esquema, dependendo de menos recursos atencionais, o papel do vmPFC torna-se mais importante para o desengajamento. Isso pode sugerir um papel importante do vmPFC em sistemas atencionais. Como os esquemas são armazenados nessa estrutura (Koechlin *et al.*, 2000), uma vez que a alteração de uma estratégia comportamental bem definida depende de mecanismos atencionais, há um prejuízo na flexibilidade comportamental.

Na tarefa de memória operacional, no entanto, uma vez que os esquemas ainda não foram criados, o PL do vmPFC parece não exercer influência.

Dessa maneira, nossos resultados sugerem que o PL do vmPFC pode estar envolvido em sistemas atencionais, tanto de codificação do ambiente quanto de manipulação de esquemas bem estabelecidos através de treinamento extenso. Embora o LCE pode ser considerado também como um teste envolvendo memória operacional, já que o intervalo de tempo entre as exposições é de apenas 5 minutos, caso a lesão ao PL do vmPFC se tratasse de um prejuízo de memória operacional, seria esperado haver prejuízo também no teste de memória operacional do labirinto aquático, o que não ocorre. Essa interpretação vai de acordo com estudos que sugerem que o sistema de memória operacional é pouco influenciado por sistemas atencionais visuo-espaciais, embora seja fortemente influenciado por sistemas atencionais de codificação do ambiente (Jolicoueur e Dell'Acqua, 1998; Fournie, 2008).

Essa interpretação permitiria explicar a ausência de avaliação de risco no LCE no grupo lesado, uma vez que requereria uma ação de caráter cognitivo, que exigiria uma avaliação, interpretação e modificação da informação armazenada no sistema de memória operacional. Ao mesmo tempo, a hipótese também permitiria explicar a ausência de efeito significativo nos resultados do teste de memória operacional espacial no

labirinto aquático em comparação aos resultados do teste de memória de referência no mesmo aparelho experimental, ou seja, no caso envolvendo localização espacial, sistemas envolvidos na atenção visuo espacial não interfeririam na memória operacional dos animais.

Assim, embora o sistema de memória operacional dependa de funções atencionais, é possível que esse sistema seja mais amplo e envolva mais elementos do que discutem alguns autores atualmente ao tratar todo o sistema atencional como uma rede indissociável do sistema de memória operacional (Cowan, 1995; Duncan, 1996; Rensink, 2002).

É possível que o papel do vmPFC na flexibilidade comportamental seja crucial para a exibição de comportamentos cognitivos mais complexos, como o processo de tomada de decisões e de elaboração de estratégias a curto e longo prazo. Nossos resultados indicam uma clara capacidade dos animais de alterar sua estratégia comportamental de acordo com os contingentes da tarefa de escolha. Possivelmente a lesão no vmPFC em ratos treinados extensivamente na tarefa tomada de decisões envolvendo atrasos crescentes ao longo dos blocos impedisse a alteração da estratégia comportamental ao se apresentar atrasos decrescentes (animais controle na Figura 3.3).

Nesse sentido, uma vez que se observa uma atividade diferencial de neurônios do OFC no processamento das escolhas, pode-se supor que o vmPFC e o OFC atuem em um sistema conjunto, que envolveria a

codificação das informações do ambiente e a comparação desses ganhos com os ganhos obtidos em situações prévias, permitindo a elaboração da estratégia. A atividade dessas regiões refletiria não só o valor do reforço esperado (Rushworth *et al.*, 2011; Lebreton *et al.*, 2009; Schoenbaum, 2003), mas também das várias possibilidades que estão sendo consideradas (Boorman *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2011; Wunderlich *et al.*, 2010), uma vez que não há resposta certa ou errada nesse tipo de tomada de decisões. Essa interpretação é discutida hoje na literatura como sendo um sistema formado pelo vmPFC e o OFC, crucial para a tomada de decisões baseada em valores (Rushworth *et al.*, 2012).

Além disso, esse sistema seria contraposto ao sistema envolvendo o córtex pré-frontal dorsomedial e o córtex cingulado anterior, que também agiria na valoração das respostas, porém sua atividade seria antagônica, ou seja, quanto menor a diferença entre os valores envolvidos nas diferentes escolhas, maior a atividade desse sistema (Rushworth *et al.*, 2012). Esses dois sistemas atuando em conjunto poderiam ser capazes de causar um refinamento na escolha, dado que codificam a mesma informação, porém sob aspectos diferentes dentro de um mesmo contexto.

Sob esse ponto de vista, também é aceito que esse sistema é envolvido não só na tomada de decisões (Noonan *et al.*, 2010; Boorman *et al.*, 2009) mas também em sistemas atencionais (Lim *et al.*, 2011), já que é responsável por determinar o foco da decisão, ou seja, para qual

recompensa o comportamento será voltado, especialmente quando várias alternativas estão presentes e comparações complexas entre os possíveis resultados devem ser feitas. Essa hipótese recebe suporte de estudos envolvendo lesões nessas áreas que mostram que há um prejuízo na comparação entre os valores de possíveis reforços conforme o número de distratores aumenta em uma tarefa atencional (Noonan *et al.*, 2010).

Na presente tarefa, observa-se não só uma estratégia momentânea, voltada para a resolução de uma tentativa dentro da sessão, mas sim uma estratégia a médio (ao longo da sessão experimental) e a longo prazo (ao longo de todas as sessões de treino). Uma vez que a tarefa, executada como descrito nos nossos experimentos, requer uma elevada atividade cognitiva em prol de se buscar variações comportamentais que levem a resultados vantajosos, pode-se inferir que o OFC tenha sua atividade de maneira a se atribuir valores em termos econômicos ao reforço (quando um indivíduo escolhe uma entre várias alternativas disponíveis, sem que haja uma alternativa correta, mas sim mais ou menos vantajosa, baseada em valores subjetivos), comparando-o ao esforço despendido para a execução da tarefa. De fato, nossos dados sugerem que a alteração na taxa de disparos do OFC, tanto ao longo dos blocos do experimento quanto em referência às tentativas de escolha nos blocos da tarefa, pode sugerir uma influência instantânea dessa região no cálculo do balanço entre o tempo de espera, a quantidade de reforço e a memória acerca do significado das tentativas

forçadas para a elaboração do comportamento de escolha. Essa hipótese vai de encontro a estudos que sugerem que o OFC pode estar envolvido, ou mesmo ser um centro importante, na valoração (Padoa-Schioppa e Assad, 2006). Dadas essas funções tanto representacionais quanto operacionais do OFC, pode-se supor que essa estrutura seja um dos componentes envolvidos no sistema de memória operacional.

8. Conclusão

8. Conclusão

Atualmente, há a discussão na literatura acerca de um sistema que envolva especificamente o vmPFC e o OFC na tomada de decisões baseada em valores (Rushworth *et al.*, 2012). Embora os experimentos apresentados não tenham incluído o registro da atividade neuronal do vmPFC durante a tarefa de escolha, os resultados sugerem que as duas estruturas atuem em conjunto, dadas as funções que cada um desempenha, bem como as conexões intrínsecas dessas estruturas no córtex pré-frontal.

Os resultados do presente estudo vão de encontro a essa hipótese e sugerem que novas abordagens sejam feitas a fim de se avaliar sob escrutínio esse sistema, como a avaliação da atividade neuronal do vmPFC na tarefa de tomada de decisões e a avaliação conjunto do sistema vmPFC/OFC. Além disso, uma vez que se atribuem funções atencionais a esse sistema (Lim *et al.*, 2011), uma tarefa atencional poderia ser utilizada para se medir tanto a atividade eletrofisiológica desse sistema quanto o prejuízo observado com a lesão dessas estruturas.

Uma análise mais cautelosa poderia sugerir um envolvimento dessas estruturas em avaliações probabilísticas de eventos envolvendo risco e incerteza. Entretanto, novos estudos são necessários para se tentar elucidar essas questões, uma vez que, devido à complexidade funcional do córtex pré-frontal dadas suas funções integrativas, ainda há grande desconhecimento acerca do funcionamento das suas estruturas.

Referências Bibliográficas

- Allain, P., Le Gall, D., Etcharry-Bouyx, F., Aubin, G., & Emile, J. (1999). Mental representation of knowledge following frontal-lobe lesion: dissociations on tasks using scripts. *J Clin Exp Neuropsychol*, 21(5), 643-665. doi: 10.1076/jcen.21.5.643.871
- Amaral, D. G., & Price, J. L. (1984). Amygdalo-cortical projections in the monkey (*Macaca fascicularis*). *J Comp Neurol*, 230(4), 465-496. doi: 10.1002/cne.902300402
- Amiez, C., Joseph, J. P., & Procyk, E. (2006). Reward encoding in the monkey anterior cingulate cortex. *Cereb Cortex*, 16(7), 1040-1055. doi: bhj046 [pii] 10.1093/cercor/bhj046
- Arnsten, A. F. (2009). Ameliorating prefrontal cortical dysfunction in mental illness: inhibition of phosphatidylinositol-protein kinase C signaling. *Psychopharmacology (Berl)*, 202(1-3), 445-455. doi: 10.1007/s00213-008-1274-9
- Aston-Jones, G., & Cohen, J. D. (2005). An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci*, 28, 403-450. doi: 10.1146/annurev.neuro.28.061604.135709
- Baddeley, A. (2000). The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends Cogn Sci*, 4(11), 417-423.
- Barbas, H. (1988). Anatomic organization of basoventral and mediodorsal visual recipient prefrontal regions in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*, 276(3), 313-342. doi: 10.1002/cne.902760302
- Barbas, H., & Blatt, G. J. (1995). Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus*, 5(6), 511-533. doi: 10.1002/hipo.450050604
- Barbas, H., & Pandya, D. N. (1989). Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*, 286(3), 353-375. doi: 10.1002/cne.902860306
- Bautista, L. M., Tinbergen, J., & Kacelnik, A. (2001). To walk or to fly? How birds choose among foraging modes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(3), 1089-1094. doi: 10.1073/pnas.98.3.1089 98/3/1089 [pii]

- Bechara, A., Damasio, A. R., Damasio, H., & Anderson, S. W. (1994). Insensitivity to future consequences following damage to human prefrontal cortex. *Cognition*, 50(1-3), 7-15.
- Bechara, A., Damasio, H., & Damasio, A. R. (2000). Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex*, 10(3), 295-307.
- Bechara, A., Damasio, H., Tranel, D., & Damasio, A. R. (1997). Deciding advantageously before knowing the advantageous strategy. *Science*, 275(5304), 1293-1295.
- Bechara, A., Tranel, D., & Damasio, H. (2000). Characterization of the decision-making deficit of patients with ventromedial prefrontal cortex lesions. *Brain*, 123 (Pt 11), 2189-2202.
- Behrmann, M., Geng, J. J., & Shomstein, S. (2004). Parietal cortex and attention. *Curr Opin Neurobiol*, 14(2), 212-217. doi: 10.1016/j.conb.2004.03.012
- Berns, G. S., McClure, S. M., Pagnoni, G., & Montague, P. R. (2001). Predictability modulates human brain response to reward. *J Neurosci*, 21(8), 2793-2798. doi: 21/8/2793 [pii]
- Boorman, E. D., Behrens, T. E., Woolrich, M. W., & Rushworth, M. F. (2009). How green is the grass on the other side? Frontopolar cortex and the evidence in favor of alternative courses of action. *Neuron*, 62(5), 733-743. doi: 10.1016/j.neuron.2009.05.014
- Breiter, H. C., Aharon, I., Kahneman, D., Dale, A., & Shizgal, P. (2001). Functional imaging of neural responses to expectancy and experience of monetary gains and losses. *Neuron*, 30(2), 619-639.
- Bremner, J. D. (1999). Alterations in brain structure and function associated with post-traumatic stress disorder. *Semin Clin Neuropsychiatry*, 4(4), 249-255. doi: 10.153/SCNP00400249
- Buschman, T. J., & Miller, E. K. (2007). Top-down versus bottom-up control of attention in the prefrontal and posterior parietal cortices. *Science*, 315(5820), 1860-1862. doi: 10.1126/science.1138071
- Cai, X., & Padoa-Schioppa, C. (2012). Neuronal encoding of subjective value in dorsal and ventral anterior cingulate cortex. *J Neurosci*, 32(11), 3791-3808. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3864-11.2012
- Camille, N., Tsuchida, A., & Fellows, L. K. (2011). Double dissociation of stimulus-value and action-value learning in humans with orbitofrontal or anterior cingulate

- cortex damage. J Neurosci, 31(42), 15048-15052. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3164-11.2011
- Carmichael, S. T., & Price, J. L. (1995). Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. J Comp Neurol, 363(4), 615-641. doi: 10.1002/cne.903630408
- Cavada, C., Company, T., Tejedor, J., Cruz-Rizzolo, R. J., & Reinoso-Suarez, F. (2000). The anatomical connections of the macaque monkey orbitofrontal cortex. A review. Cereb Cortex, 10(3), 220-242.
- Chapin JK, Moxon KA, Markowitz RS, Nicolelis MA (Real-time control of a robot arm using simultaneously recorded neurons in the motor cortex. Nat Neurosci 2:664-670.1999).
- Chapin JK, Nicolelis MA (Neural network mechanisms of oscillatory brain states: characterization using simultaneous multi-single neuron recordings. Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl 45:113-122.1996).
- Chapin JK, Nicolelis MA (Principal component analysis of neuronal ensemble activity reveals multidimensional somatosensory representations. J Neurosci Methods 94:121-140.1999).
- Convit, A. (2007). Dissociation of cognitive and emotional empathy in adults with Asperger syndrome using the Multifaceted Empathy Test (MET). *Journal of Autism and Developmental Disorders*.
- Corbetta, M., Akbudak, E., Conturo, T. E., Snyder, A. Z., Ollinger, J. M., Drury, H. A. Shulman, G. L. (1998). A common network of functional areas for attention and eye movements. Neuron, 21(4), 761-773.
- Cowan, N. (1995). Sensory memory and its role in information processing. Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl, 44, 21-31.
- Crozier, S., Sirigu, A., Lehericy, S., van de Moortele, P. F., Pillon, B., Grafman, J., LeBihan, D. (1999). Distinct prefrontal activations in processing sequence at the sentence and script level: an fMRI study. Neuropsychologia, 37(13), 1469-1476.
- de Bruin, J. P., Sanchez-Santed, F., Heinsbroek, R. P., Donker, A., & Postmes, P. (1994). A behavioural analysis of rats with damage to the medial prefrontal cortex using the Morris water maze: evidence for behavioural flexibility, but not for

- impaired spatial navigation. *Brain Res*, 652(2), 323-333. doi: 0006-8993(94)90243-7 [pii]
- Damasio, A.R.; Everitt, B. J.; Bishop, D. (1996). "The Somatic marker hypothesis and the possible functions of the prefrontal cortex". *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **351** (1346): 1413–20. doi:10.1098/rstb.1996.0125. PMID 8941953.
- Damasio H, Grabowski T, Frank R, Galaburda AM, Damasio AR (The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science* 264:1102-1105.1994).
- Damasio, A.R.; Tranel, D.; Damasio, H.C. (1991). "Ch. 11: Somatic markers and the guidance of behaviour: theory and preliminary testing". In Levin, Harvey S.; Eisenberg, Howard M.; Benton, Arthur Lester. *Frontal Lobe Function and Dysfunction*. Oxford University Press. pp. 217–229
- Desimone, R., & Duncan, J. (1995). Neural mechanisms of selective visual attention. *Annu Rev Neurosci*, 18, 193-222. doi: 10.1146/annurev.ne.18.030195.001205
- Dimitrov, M., Granetz, J., Peterson, M., Hollnagel, C., Alexander, G., & Grafman, J. (1999). Associative learning impairments in patients with frontal lobe damage. *Brain Cogn*, 41(2), 213-230. doi: 10.1006/brcg.1999.1121
- Driessen, M., Schroeder, T., Widmann, B., von Schonfeld, C. E., & Schneider, F. (2006). Childhood trauma, psychiatric disorders, and criminal behavior in prisoners in Germany: a comparative study in incarcerated women and men. *J Clin Psychiatry*, 67(10), 1486-1492.
- Duncan, J. (1996). Cooperating brain systems in selective perception and action. In T. Inuiand J. L. McClelland (Eds.), *Attention and performance 16: Information integration in perception and communication* (pp. 549-578). Cambridge, MA: MIT Press.
- Dziobek, I., Rogers, K., Fleck, S., Bahnemann, M., Heekeren, H. R., Wolf, O. T., & Convit, A. (2008). Dissociation of cognitive and emotional empathy in adults with Asperger syndrome using the Multifaceted Empathy Test (MET). *J Autism Dev Disord*, 38(3), 464-473. doi: 10.1007/s10803-007-0486-x
- Eblen, F., & Graybiel, A. M. (1995). Highly restricted origin of prefrontal cortical inputs to striosomes in the macaque monkey. *J Neurosci*, 15(9), 5999-6013.
- Elston, G. N. (2000). Pyramidal cells of the frontal lobe: all the more spinous to think with. *J Neurosci*, 20(18), RC95.

- File, S. E. (2001). Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res*, 125(1-2), 151-157. doi: S0166-4328(01)00292-3 [pii]
- File, S. E., Cheeta, S., & Akanezi, C. (2001). Diazepam and nicotine increase social interaction in gerbils: a test for anxiolytic action. *Brain Res*, 888(2), 311-313.
- Fougnie, D. (2008) In: *New Research on Short-Term Memory*, Nova Science Publishers
- Freedman, D. J., Riesenhuber, M., Poggio, T., & Miller, E. K. (2002). Visual categorization and the primate prefrontal cortex: neurophysiology and behavior. *J Neurophysiol*, 88(2), 929-941.
- Fujiwara, J., Tobler, P. N., Taira, M., Iijima, T., & Tsutsui, K. (2009). Segregated and integrated coding of reward and punishment in the cingulate cortex. *J Neurophysiol*, 101(6), 3284-3293. doi: 90909.2008 [pii] 10.1152/jn.90909.2008
- Fuster, J. M. (1991). The prefrontal cortex and its relation to behavior. *Prog Brain Res*, 87, 201-211.
- Fuster, J. M. (1997). Network memory. *Trends Neurosci*, 20(10), 451-459.
- Fuster, J. M. *The Prefrontal Cortex: Anatomy, Physiology, and Neuropsychology of the Frontal Lobe* (Raven, New York, 1997).
- Fuster, J. M. (2001). The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. *Neuron*, 30(2), 319-333. doi: S0896-6273(01)00285-9 [pii]
- Gazzaley, A., & D'Esposito, M. (2007). Top-down modulation and normal aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1097, 67-83. doi: 10.1196/annals.1379.010
- Gazzaniga, MS (Ed.) (*The New Cognitive Neurosciences*, 2nd edition, MIT.
- Ghods-Sharifi, S., St Onge, J. R., & Floresco, S. B. (2009). Fundamental contribution by the basolateral amygdala to different forms of decision making. *J Neurosci*, 29(16), 5251-5259. doi: 29/16/5251 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.0315-09.2009
- Glimcher, P.W., Camerer, C.F., Fehr, E., Poldrack, R.A. (2009) *Neuroeconomics – Decision making and the brain*. Academic Press.
- Glimcher, Paul W, Ernst Fehr, Colin F Camerer, and Russell Poldrack. (2009). *Annu. Rev. Psychol. Neuroeconomics*.
<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123741769>.

- Goldman-Rakic, P. S. (1996). The prefrontal landscape: implications of functional architecture for understanding human mentation and the central executive. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 351(1346), 1445-1453. doi: 10.1098/rstb.1996.0129
- Graeff, F. G., Netto, C. F., & Zangrossi, H., Jr. (1998). The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 23(2), 237-246. doi: S0149763498000244 [pii].
- Gray, J.A. (1982) *The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septohippocampal system*. Oxford University Press.
- Harlow, J. M. (1848) Passage of an iron rod through the head. *Boston Medical and Surgical Journal*, 39:389.
- Harlow, J. M (1868). Recovery from the passage of an iron bar through the head. *Publications of the Massachusetts Society*. 2:327-47.
- Heekeren, H. R., Marrett, S., Bandettini, P. A., & Ungerleider, L. G. (2004). A general mechanism for perceptual decision-making in the human brain. *Nature*, 431(7010), 859-862. doi: 10.1038/nature02966
- Heekeren, H. R., Marrett, S., & Ungerleider, L. G. (2008). The neural systems that mediate human perceptual decision making. *Nat Rev Neurosci*, 9(6), 467-479. doi: 10.1038/nrn2374
- Heekeren, H. R., Wartenburger, I., Schmidt, H., Prehn, K., Schwintowski, H. P., & Villringer, A. (2005). Influence of bodily harm on neural correlates of semantic and moral decision-making. *Neuroimage*, 24(3), 887-897. doi: 10.1016/j.neuroimage.2004.09.026
- Helene, A. F., & Xavier, G. F. (2003). [Building attention from memory]. *Rev Bras Psiquiatr*, 25 Suppl 2, 12-20.
- Hendler, T., Rotshtein, P., Yeshurun, Y., Weizmann, T., Kahn, I., Ben-Bashat, D., . . . Bleich, A. (2003). Sensing the invisible: differential sensitivity of visual cortex and amygdala to traumatic context. *Neuroimage*, 19(3), 587-600.
- Hewig, J., Straube, T., Trippe, R. H., Kretschmer, N., Hecht, H., Coles, M. G., & Miltner, W. H. (2009). Decision-making under risk: an fMRI study. *J Cogn Neurosci*, 21(8), 1642-1652. doi: 10.1162/jocn.2009.21112

- Hikosaka, K., & Watanabe, M. (2000). Delay activity of orbital and lateral prefrontal neurons of the monkey varying with different rewards. *Cereb Cortex*, 10(3), 263-271.
- Hopfinger, J. B., Buonocore, M. H., & Mangun, G. R. (2000). The neural mechanisms of top-down attentional control. *Nat Neurosci*, 3(3), 284-291. doi: 10.1038/72999
- Hornak, J., Bramham, J., Rolls, E. T., Morris, R. G., O'Doherty, J., Bullock, P. R., & Polkey, C. E. (2003). Changes in emotion after circumscribed surgical lesions of the orbitofrontal and cingulate cortices. *Brain*, 126(Pt 7), 1691-1712. doi: 10.1093/brain/awg168
- Hornak, J., Rolls, E. T., & Wade, D. (1996). Face and voice expression identification in patients with emotional and behavioural changes following ventral frontal lobe damage. *Neuropsychologia*, 34(4), 247-261.
- Hsu, M., Bhatt, M., Adolphs, R., Tranel, D., & Camerer, C. F. (2005). Neural systems responding to degrees of uncertainty in human decision-making. *Science*, 310(5754), 1680-1683. doi: 310/5754/1680 [pii] 10.1126/science.1115327
- Ishai, A., Ungerleider, L. G., Martin, A., Schouten, J. L., & Haxby, J. V. (1999). Distributed representation of objects in the human ventral visual pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16), 9379-9384.
- Jolicoeur, P., & Dell'Acqua, R. (1998). The demonstration of short-term consolidation. *Cogn Psychol*, 36(2), 138-202. doi: 10.1006/cogp.1998.0684
- Kahneman D, Tversky A (1979) Prospect theory: an analysis of decision under risk. *Econometrica*, 47, 263–291.
- Kaping, D., Vinck, M., Hutchison, R. M., Everling, S., & Womelsdorf, T. (2011). Specific contributions of ventromedial, anterior cingulate, and lateral prefrontal cortex for attentional selection and stimulus valuation. *PLoS Biol*, 9(12), e1001224. doi: 10.1371/journal.pbio.1001224
- Kennerley, S. W., Dahmubed, A. F., Lara, A. H., & Wallis, J. D. (2009). Neurons in the frontal lobe encode the value of multiple decision variables. *J Cogn Neurosci*, 21(6), 1162-1178. doi: 10.1162/jocn.2009.21100
- Kennerley, S. W., & Wallis, J. D. (2009). Evaluating choices by single neurons in the frontal lobe: outcome value encoded across multiple decision variables. *Eur J Neurosci*, 29(10), 2061-2073. doi: EJN6743 [pii] 10.1111/j.1460-9568.2009.06743.x

- Kennerley, S. W., Walton, M. E., Behrens, T. E., Buckley, M. J., & Rushworth, M. F. (2006). Optimal decision making and the anterior cingulate cortex. *Nat Neurosci*, 9(7), 940-947. doi: nn1724 [pii] 10.1038/nn1724
- Koechlin, E., Corrado, G., Pietrini, P., & Grafman, J. (2000). Dissociating the role of the medial and lateral anterior prefrontal cortex in human planning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(13), 7651-7656. doi: 10.1073/pnas.130177397
- Koenigs, M., Huey, E. D., Raymont, V., Cheon, B., Solomon, J., Wassermann, E. M., & Grafman, J. (2008). Focal brain damage protects against post-traumatic stress disorder in combat veterans. *Nat Neurosci*, 11(2), 232-237. doi: nn2032 [pii] 10.1038/nn2032
- Kolb, B. (1984). Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Res*, 320(1), 65-98.
- Kringelbach, M. L. (2005). The human orbitofrontal cortex: linking reward to hedonic experience. *Nat Rev Neurosci*, 6(9), 691-702. doi: 10.1038/nrn1747
- Lau, B., & Glimcher, P. W. (2007). Action and outcome encoding in the primate caudate nucleus. *J Neurosci*, 27(52), 14502-14514. doi: 27/52/14502 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.3060-07.2007
- Lebreton, M., Jorge, S., Michel, V., Thirion, B., & Pessiglione, M. (2009). An automatic valuation system in the human brain: evidence from functional neuroimaging. *Neuron*, 64(3), 431-439. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.040
- Levy, R., & Goldman-Rakic, P. S. (2000). Segregation of working memory functions within the dorsolateral prefrontal cortex. *Exp Brain Res*, 133(1), 23-32.
- Liberzon, I., Taylor, S. F., Amdur, R., Jung, T. D., Chamberlain, K. R., Minoshima, S., Fig, L. M. (1999). Brain activation in PTSD in response to trauma-related stimuli. *Biol Psychiatry*, 45(7), 817-826.
- Lim, S. L., O'Doherty, J. P., & Rangel, A. (2011). The decision value computations in the vmPFC and striatum use a relative value code that is guided by visual attention. *J Neurosci*, 31(37), 13214-13223. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1246-11.2011
- Masterman, D. L., & Cummings, J. L. (1997). Frontal-subcortical circuits: the anatomic basis of executive, social and motivated behaviors. *J Psychopharmacol*, 11(2), 107-114.
- Mayberg, H. S. (2003). Positron emission tomography imaging in depression: a neural systems perspective. *Neuroimaging Clin N Am*, 13(4), 805-815.

- Mazurek, M. E., Roitman, J. D., Ditterich, J., & Shadlen, M. N. (2003). A role for neural integrators in perceptual decision making. *Cereb Cortex*, 13(11), 1257-1269.
- McCoy, A. N., & Platt, M. L. (2005). Risk-sensitive neurons in macaque posterior cingulate cortex. *Nat Neurosci*, 8(9), 1220-1227. doi: 10.1038/nn1523
- McDonald, A. J. (1991). Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience*, 44(1), 15-33.
- Mesulam, M. M., & Mufson, E. J. (1982). Insula of the old world monkey. I. Architectonics in the insulo-orbito-temporal component of the paralimbic brain. *J Comp Neurol*, 212(1), 1-22. doi: 10.1002/cne.902120102
- Milad MR, Quirk GJ (2002) (Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420:70-74.
- Milad, M. R., Wright, C. I., Orr, S. P., Pitman, R. K., Quirk, G. J., & Rauch, S. L. (2007). Recall of fear extinction in humans activates the ventromedial prefrontal cortex and hippocampus in concert. *Biol Psychiatry*, 62(5), 446-454. doi: S0006-3223(06)01298-4 [pii] 10.1016/j.biopsych.2006.10.011
- Miller, E. K., & Cohen, J. D. (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci*, 24, 167-202. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.167
- Mobini, S., Body, S., Ho, M. Y., Bradshaw, C. M., Szabadi, E., Deakin, J. F., & Anderson, I. M. (2002). Effects of lesions of the orbitofrontal cortex on sensitivity to delayed and probabilistic reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)*, 160(3), 290-298. doi: 10.1007/s00213-001-0983-0
- Morgane, P. J., Galler, J. R., & Mokler, D. J. (2005). A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol*, 75(2), 143-160. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.01.001
- Morris, R.G.M. (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12, 239-260.
- Morrison, J. H., & Foote, S. L. (1986). Noradrenergic and serotonergic innervation of cortical, thalamic, and tectal visual structures in Old and New World monkeys. *J Comp Neurol*, 243(1), 117-138. doi: 10.1002/cne.902430110
- Murray, E. A., O'Doherty, J. P., & Schoenbaum, G. (2007). What we know and do not know about the functions of the orbitofrontal cortex after 20 years of cross-

- species studies. *J Neurosci*, 27(31), 8166-8169. doi: 27/31/8166 [pii]
10.1523/JNEUROSCI.1556-07.2007
- Nicolelis MA, Baccala LA, Lin RC, Chapin JK (Sensorimotor encoding by synchronous neural ensemble activity at multiple levels of the somatosensory system. *Science* 268:1353-1358.1995).
- Nicolelis MA, Chapin JK (Controlling robots with the mind. *Sci Am* 287:46-53.2002).
- Nicolelis MA, Fanselow EE, Ghazanfar AA (Hebb's dream: the resurgence of cell assemblies. *Neuron* 19:219-221.1997a).
- Nicolelis MA, Ghazanfar AA, Faggin BM, Votaw S, Oliveira LM (Reconstructing the engram: simultaneous, multisite, many single neuron recordings. *Neuron* 18:529-537.1997b).
- Nicolelis MA, Lin RC, Woodward DJ, Chapin JK (Dynamic and distributed properties of many-neuron ensembles in the ventral posterior medial thalamus of awake rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2212-2216.1993).
- Niki, H., & Watanabe, M. (1979). Prefrontal and cingulate unit activity during timing behavior in the monkey. *Brain Res*, 171(2), 213-224. doi: 0006-8993(79)90328-7 [pii]
- Noonan, M. P., Kolling, N., Walton, M. E., & Rushworth, M. F. (2012). Re-evaluating the role of the orbitofrontal cortex in reward and reinforcement. *Eur J Neurosci*, 35(7), 997-1010. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08023.x
- Noonan, M. P., Mars, R. B., & Rushworth, M. F. (2011). Distinct roles of three frontal cortical areas in reward-guided behavior. *J Neurosci*, 31(40), 14399-14412. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6456-10.2011
- Noonan, M. P., Walton, M. E., Behrens, T. E., Sallet, J., Buckley, M. J., & Rushworth, M. F. (2010). Separate value comparison and learning mechanisms in macaque medial and lateral orbitofrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(47), 20547-20552. doi: 10.1073/pnas.1012246107
- O'Doherty, J., Kringelbach, M. L., Rolls, E. T., Hornak, J., & Andrews, C. (2001). Abstract reward and punishment representations in the human orbitofrontal cortex. *Nat Neurosci*, 4(1), 95-102. doi: 10.1038/82959

- Ongur, D., & Price, J. L. (2000). The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex*, 10(3), 206-219.
- Padoa-Schioppa, C., & Assad, J. A. (2006). Neurons in the orbitofrontal cortex encode economic value. *Nature*, 441(7090), 223-226. doi: 10.1038/nature04676
- Pais-Vieira, M., Lima, D., & Galhardo, V. (2007). Orbitofrontal cortex lesions disrupt risk assessment in a novel serial decision-making task for rats. *Neuroscience*, 145(1), 225-231. doi: S0306-4522(06)01662-9 [pii] 10.1016/j.neuroscience.2006.11.058
- Partiot, A., Grafman, J., Sadato, N., Flitman, S., & Wild, K. (1996). Brain activation during script event processing. *Neuroreport*, 7(3), 761-766.
- Paus, T. (2001). Primate anterior cingulate cortex: where motor control, drive and cognition interface. *Nat Rev Neurosci*, 2(6), 417-424. doi: 10.1038/35077500 35077500 [pii]
- Paxinos GW, Watson C (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: Oxford, UK.
- Posner, M. I. (1980). Orienting of attention. *Q J Exp Psychol*, 32(1), 3-25.
- Prehn, K., Wartenburger, I., Meriau, K., Scheibe, C., Goodenough, O. R., Villringer, A., Heekeren, H. R. (2008). Individual differences in moral judgment competence influence neural correlates of socio-normative judgments. *Soc Cogn Affect Neurosci*, 3(1), 33-46. doi: 10.1093/scan/nsm037
- Quiroga, R. Q., Nadasdy, Z., & Ben-Shaul, Y. (2004). Unsupervised spike detection and sorting with wavelets and superparamagnetic clustering. *Neural Comput*, 16(8), 1661-1687. doi: 10.1162/089976604774201631
- Rangel, A., Camerer, C., & Montague, P. R. (2008). A framework for studying the neurobiology of value-based decision making. *Nat Rev Neurosci*, 9(7), 545-556. doi: nrn2357 [pii] 10.1038/nrn2357
- Rao, H., Kordzykowski, M., Pluta, J., Hoang, A., & Detre, J. A. (2008). Neural correlates of voluntary and involuntary risk taking in the human brain: an fMRI Study of the Balloon Analog Risk Task (BART). *Neuroimage*, 42(2), 902-910. doi: 10.1016/j.neuroimage.2008.05.046
- Rempel-Clower, N. L., & Barbas, H. (1998). Topographic organization of connections between the hypothalamus and prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*, 398(3), 393-419.

- Rensink, R. A. (2002). Change detection. *Annu Rev Psychol*, 53, 245-277. doi: 10.1146/annurev.psych.53.100901.135125
- Ridderinkhof, K. R., Ullsperger, M., Crone, E. A. & Nieuwenhuis, S. (2004). The role of the medial frontal cortex in cognitive control. *Science* **306**, 443–447.
- Roesch, M. R., Taylor, A. R., & Schoenbaum, G. (2006). Encoding of time-discounted rewards in orbitofrontal cortex is independent of value representation. *Neuron*, 51(4), 509-520. doi: S0896-6273(06)00507-1 [pii] 10.1016/j.neuron.2006.06.027
- Rogers, R. D., Owen, A. M., Middleton, H. C., Williams, E. J., Pickard, J. D., Sahakian, B. J., & Robbins, T. W. (1999). Choosing between small, likely rewards and large, unlikely rewards activates inferior and orbital prefrontal cortex. *J Neurosci*, 19(20), 9029-9038.
- Rolls, E. T. (2000). The orbitofrontal cortex and reward. *Cereb Cortex*, 10(3), 284-294.
- Rudebeck, P. H., Bannerman, D. M., & Rushworth, M. F. (2008). The contribution of distinct subregions of the ventromedial frontal cortex to emotion, social behavior, and decision making. *Cogn Affect Behav Neurosci*, 8(4), 485-497. doi: 10.3758/CABN.8.4.485
- Rushworth, M. F., Kolling, N., Sallet, J., & Mars, R. B. (2012). Valuation and decision-making in frontal cortex: one or many serial or parallel systems? *Curr Opin Neurobiol*, 22(6), 946-955. doi: 10.1016/j.conb.2012.04.011
- Rushworth, M. F., Noonan, M. P., Boorman, E. D., Walton, M. E., & Behrens, T. E. (2011). Frontal cortex and reward-guided learning and decision-making. *Neuron*, 70(6), 1054-1069. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.014
- Sallet, J., Quilodran, R., Rothe, M., Vezoli, J., Joseph, J. P., & Procyk, E. (2007). Expectations, gains, and losses in the anterior cingulate cortex. *Cogn Affect Behav Neurosci*, 7(4), 327-336.
- Sarter, M., Givens, B., & Bruno, J. P. (2001). The cognitive neuroscience of sustained attention: where top-down meets bottom-up. *Brain Res Brain Res Rev*, 35(2), 146-160.
- Schoenbaum, G., Setlow, B., & Ramus, S. J. (2003). A systems approach to orbitofrontal cortex function: recordings in rat orbitofrontal cortex reveal interactions with different learning systems. *Behav Brain Res*, 146(1-2), 19-29.
- Schultz, W. (2007). Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci*, 30(5), 203-210. doi: 10.1016/j.tins.2007.03.007

- Shima, K., & Tanji, J. (1998). Role for cingulate motor area cells in voluntary movement selection based on reward. *Science*, 282(5392), 1335-1338.
- Shin HC, Chapin JK (Mapping the effects of SI cortex stimulation on somatosensory relay neurons in the rat thalamus: direct responses and afferent modulation. *Somatosens Mot Res* 7:421-434.1990).
- Shin, L. M., Orr, S. P., Carson, M. A., Rauch, S. L., Macklin, M. L., Lasko, N. B., . . . Pitman, R. K. (2004). Regional cerebral blood flow in the amygdala and medial prefrontal cortex during traumatic imagery in male and female Vietnam veterans with PTSD. *Arch Gen Psychiatry*, 61(2), 168-176. doi: 10.1001/archpsyc.61.2.168
- Shin, L. M., Rauch, S. L., & Pitman, R. K. (2006). Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Ann N Y Acad Sci*, 1071, 67-79. doi: 10.1196/annals.1364.007
- Simpson, J. R., Jr., Drevets, W. C., Snyder, A. Z., Gusnard, D. A., & Raichle, M. E. (2001). Emotion-induced changes in human medial prefrontal cortex: II. During anticipatory anxiety. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(2), 688-693. doi: 10.1073/pnas.98.2.688 98/2/688 [pii]
- Sirigu, A., Zalla, T., Pillon, B., Grafman, J., Agid, Y., & Dubois, B. (1996). Encoding of sequence and boundaries of scripts following prefrontal lesions. *Cortex*, 32(2), 297-310.
- Stephens DW, Krebs JR (1986) (Foraging Theory. Princeton University Press, Princeton.
- Studer, B., Manes, F., Humphreys, G., Robbins, T. W., & Clark, L. (2013). Risk-Sensitive Decision-Making in Patients with Posterior Parietal and Ventromedial Prefrontal Cortex Injury. *Cereb Cortex*. doi: 10.1093/cercor/bht197
- Swanson, L.W. (1992) Brain maps: structure of the rat brain. 1a. edição. Amsterdam: ElsevierScience Publishers B.V.
- Thompson, K. G., Biscoe, K. L., & Sato, T. R. (2005). Neuronal basis of covert spatial attention in the frontal eye field. *J Neurosci*, 25(41), 9479-9487. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0741-05.2005
- Tobler, P. N., Christopoulos, G. I., O'Doherty, J. P., Dolan, R. J., & Schultz, W. (2009). Risk-dependent reward value signal in human prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(17), 7185-7190. doi: 0809599106 [pii] 10.1073/pnas.0809599106

- Tremblay, L., & Schultz, W. (2000). Reward-related neuronal activity during go-nogo task performance in primate orbitofrontal cortex. *J Neurophysiol*, 83(4), 1864-1876.
- Ullsperger, M., & von Cramon, D. Y. (2004). Decision making, performance and outcome monitoring in frontal cortical areas. *Nat Neurosci*, 7(11), 1173-1174. doi: 10.1038/nn1104-1173
- Van Hoesen, G. W. (1993). The modern concept of association cortex. *Curr Opin Neurobiol*, 3(2), 150-154.
- Villas-Boas, C. A., Carvalho, D., Xavier, G. F. (em preparação) Pre-limbic cortex excitotoxic-induced damage disrupts risk-assessment and extinction but not anxiety and spatial working and reference memory, in rats
- Vogt, B. A., Vogt, L., Farber, N. B., & Bush, G. (2005). Architecture and neurocytology of monkey cingulate gyrus. *J Comp Neurol*, 485(3), 218-239. doi: 10.1002/cne.20512
- Wallis, J. D. (2007). Orbitofrontal cortex and its contribution to decision-making. *Annu Rev Neurosci*, 30, 31-56. doi: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094334
- Walton, M. E., Bannerman, D. M., & Rushworth, M. F. (2002). The role of rat medial frontal cortex in effort-based decision making. *J Neurosci*, 22(24), 10996-11003. doi: 22/24/10996 [pii]
- Walton, M. E., Devlin, J. T., & Rushworth, M. F. (2004). Interactions between decision making and performance monitoring within prefrontal cortex. *Nat Neurosci*, 7(11), 1259-1265. doi: nn1339 [pii] 10.1038/nn1339
- Wesierska, M., & Turlejski, K. (2000). Spontaneous behavior of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*) in the elevated plus-maze: comparison with Long-Evans rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 60(4), 479-487.
- Wood, J. N., & Grafman, J. (2003). Human prefrontal cortex: processing and representational perspectives. *Nat Rev Neurosci*, 4(2), 139-147. doi: 10.1038/nrn1033
- Wood, J. N., Romero, S. G., Makale, M., & Grafman, J. (2003). Category-specific representations of social and nonsocial knowledge in the human prefrontal cortex. *J Cogn Neurosci*, 15(2), 236-248. doi: 10.1162/089892903321208178
- Wunderlich, K., Rangel, A., & O'Doherty, J. P. (2010). Economic choices can be made using only stimulus values. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(34), 15005-15010. doi: 10.1073/pnas.1002258107

Zar, J. H. (2010). Biostatistical Analysis. Prentice Hall.

Apêndice I

Processamento histológico

O processamento histológico do encéfalo dos ratos usados nos Experimentos 1 e 2 foram feitos conforme descrito anteriormente. A Figura I.1 mostra a lesão sofrida pelos animais. As coordenadas almeçadas foram AP +3,0mm, ML $\pm$ 0,8mm, DV -4,0mm; AP +3,2mm, ML $\pm$ 0,7mm, DV -4,2mm; AP +3,7mm, ML $\pm$ 0,5mm, DV -4,4mm.

A Figura I.2 mostra as estruturas registradas nos Experimentos 3 e 4 por 12 dos 20 eletrodos de registro de acordo com as coordenadas entre AP +3,7 e AP +4,9; entre ML +1,2 e ML +2,8; DV -5,0. As estruturas registradas pelos 8 eletrodos restantes encontram-se nos intervalos entre as 3 imagens apresentadas na Figura I.2.

Todas as coordenadas histológicas foram obtidas a partir do atlas de Paxinos e Watson (2005) e confrontadas com lesões feitas em animais piloto. As imagens mostradas nas figuras foram modificadas de Swanson (1992).

Figura I.1 - Análise histológica dos animais dos Experimentos 1 e 2. A. Esquema ilustrando o local da lesão na coordenada AP +3,0. B – animal controle infundido com solução salina. C – animal do grupo experimental com lesão no PL do vmPFC.

Figura I.2 – Análise histológica dos animais utilizados nos Experimentos 3 e 4. A Figura mostra 3 cortes histológicos. Os asteriscos representam os locais de registro de 12 eletrodos.

Apêndice II

Aparelho experimental para o teste de tomada de decisões

O aparelho experimental utilizado nos Experimentos 3 e 4 é descrito a seguir.

Trata-se de uma caixa de acrílico de 26 x 26 x 26 cm que possui em uma de suas paredes um conjunto de 3 buracos dispostos lado a lado horizontalmente e um comedouro. Cada um dos buracos é confeccionado com um tubo quadrado de aço inoxidável medindo 2,5cm de lado x 4,5cm de comprimento. No fundo de cada buraco, há um LED (do inglês: Diodo Emissor de Luz) de cor branca que se acende e se apaga com precisão de milissegundos acionados por um microcontrolador Arduino. Imediatamente abaixo dos buracos e 1 cm acima do assoalho está localizado o comedouro, onde o animal recebe *pellets* de chocolate. Fora da caixa de acrílico, encontra-se um dispensador de *pellets* de chocolate, que regula a liberação do reforço individualmente.

Todo o equipamento descrito fica contido em uma caixa de madeira, preta, com atenuação acústica para evitar distrações durante a execução da tarefa comportamental pelo animal.

A Figura II.1 mostra um detalhe do dispensador de *pellets* de chocolate, que fica localizado fora da caixa de condicionamento. Esse

sistema é responsável por liberar 1 *pellet* de chocolate por vez. Também pode-se observar os LEDs, localizados atrás dos focinhadores.

Figura II.1 – Detalhe do dispensador de *pellets* de chocolate e dos LEDs, localizados fora da caixa de condicionamento.

A Figura II.2 mostra um detalhe dos focinhadores e do comedouro, localizado abaixo. Os LEDs mostrados na figura anterior encontram-se posicionados no fundo desses focinhadores, permitindo que seja sinalizada a tentativa para o animal.

A Figura II.3 mostra um detalhe da localização do microcontrolador Arduino dentro da caixa de madeira, porém fora da caixa de condicionamento. Toda a adequação a este experimento e a programação foram desenvolvidos em nosso laboratório.

Figura II.2 – Detalhe dos três focinhadores e do comedouro contendo os *pellets* de chocolate. Essas estruturas se localizam no interior da caixa de condicionamento.

Figura II.3 – detalhe do microcontrolador Arduino preso no teto da caixa de madeira.

Figura II.4 – monitor localizado fora da caixa de madeira.

A Figura II.4 mostra o monitor para verificação pelo experimentador do comportamento do animal na tarefa. O monitor fica localizado fora da caixa de madeira.

A Figura II.5 mostra a caixa de madeira que contém o material descrito, exceto o monitor. Borrachas são colocadas nos batentes para que se obtenha atenuação acústica. A porta da caixa fica fechada durante a execução da tarefa comportamental pelo animal.

Finalmente, a Figura II.6 mostra um detalhe da caixa de condicionamento e a localização do dispensador de *pellets*, todos localizados dentro da caixa de madeira para atenuação acústica.

Figura II.5 – caixa de madeira que contém a caixa de condicionamento operante.

Figura II.6 – caixa de condicionamento operante com o dispensador de pellets no lado de fora.

Apêndice III

Confecção de matrizes de multi eletrodos

Eletrodos

As matrizes de eletrodos devem passar por diversas etapas até que atinjam sua configuração final.

Para a confecção das matrizes utiliza-se fios de tungstênio de 50 μ m de diâmetro (California Fine Wire Co., CFW) revestidos com Teflon®. Inicialmente, os fios têm suas pontas cortadas em bisel e o Teflon® é cuidadosamente removido de forma que apenas a ponta cortada do fio seja exposta (Figuras III.1 e III.2).

Figura III.1 - Detalhe das pontas dos fios cortadas em bisel e descascadas, de forma a expor somente a parte da ponta do fio.

Figura III.2 - Foto em microscopia eletrônica de varredura da ponta em bisel cortada a mão de um dos fios que compõem a matriz de eletrodos.

Os fios cortados são passados por uma matriz de pequenos orifícios, da ordem de 70 μ m de diâmetro, em folhas de papel do tipo Post-it®, feitos

com uma furadeira de mesa de alta precisão (Servo Products Co., Model 7000) com broca de cobalto de 0,7mm de diâmetro na ponta (Titex Plus, Alemanha), na qual acoplou-se uma base fixa transladável, com dois eixos de precisão micrométrica (XY Translations Stage, Model 401, Newport, Irvine, CA, EUA) (Figura III.3).

Figura III.3 - Broca de precisão e base fixa transladável durante a perfuração de papéis Post-it

Figura III.4 - Fios passando através dos orifícios em duas folhas paralelas de papéis Post-it

Dois moldes de papel Post-it são posicionados paralelamente entre si, ambos fixos e perpendiculares a uma base metálica com ranhuras, sobre as quais é possível aumentar ou diminuir o espaçamento entre eles. Atrás de um dos moldes, coloca-se um anteparo rígido. Dessa maneira, passa-se os fios de tungstênio um a um, no orifício do primeiro molde, de maneira que encontrem o orifício correspondente no molde colocado paralelamente ao primeiro (Figura III.4). O anteparo rígido serve de apoio para os fios, garantindo que todos fiquem com o mesmo comprimento.

Na parte dos fios que se encontra entre as duas folhas de papel, aplica-se cola epóxi de aero-modelismo (5 Minute Epoxi, Devcon). Por ser flexível, a cola penetra por entre os fios e, devido a um tempo de secagem rápido, forma uma esfera rígida que envolve a matriz e a mantém com a estrutura definida (Figura III.5). Apesar de a cola epóxi enrijecer em 5 minutos, sua secagem total se dá somente em algumas horas.

Figura III.5 - Gota de cola epóxi ao redor dos fios. Após a secagem, uma esfera rígida mantém a matriz segura, impossibilitada de qualquer movimentação

Concomitantemente, pode-se passar para outra etapa da confecção de eletrodos.

O conector que servirá de interface entre os fios e o equipamento de registro (Omnetics Co., modelos 0718 e 0726) é soldado manualmente a um circuito impresso feito sob medida (Figuras III.7 e III.8). O tamanho diminuto requer uma estação de solda de precisão (Weller Soldering Station, WESD51, diâmetro da ponta de 1/64”), cuja temperatura pode ser

controlada para que não queime o circuito impresso ou a parte de plástico que compõe o conector.

Figura III.7 - Conector Omnetics 0718 a ser soldado a mão no circuito impresso feito sob medida.

Figura III.8 - Conector Omnetics 0726 soldado no circuito impresso. Note a solda nos terminais do conector.

Terminada a etapa de soldagem, pode-se passar os fios pelos contatos do circuito impresso. A parte traseira do fio é descascada e uma tinta contendo prata (*Silver Paint*) é utilizada para conectar o fio ao circuito. Pode-se também optar pela solda dos fios aos conectores que, embora extremamente diminutos, podem ser alcançados caso se possua uma ponta de solda ultra fina de aproximadamente 1/64 de polegada na ponta.

Feita a conexão dos fios ao circuito impresso, o eletrodo é testado para que se garanta a qualidade do sinal. Para tanto, prende-se o eletrodo a uma torre estereotática e insere-se as pontas dos fios em solução saturada de NaCl. Com um fio acoplado a 2 baterias de 1,5V ligadas em série. Insere-se o polo positivo na solução salina e o polo negativo em cada orifício do conector. Com isso, promove-se uma eletrólise na ponta dos

fios, evidenciada pela formação de bolhas, indicando que a conexão foi bem feita. Caso não sejam observadas bolhas, deve-se refazer o contato dos fios ao conector.

Após os testes, cola epóxi líquida é espalhada por cima dos fios, novamente de forma a penetrar nos espaços entre eles, garantindo que a matriz de eletrodos não se mova durante a penetração no encéfalo dos animais (Figuras III.9, III.10 e III.11)

Figura III.9 - Frente da matriz finalizada com cola epóxi espalhada sobre os fios. Expostas, à esquerda na foto, permanecem somente as partes do fio que penetrarão o encéfalo do animal.

Figura III.10 - Parte de trás da matriz finalizada com cola epóxi espalhada sobre os fios. Expostas, à direita na foto, permanecem somente as partes do fio que penetrarão o encéfalo do animal.

Figura III.11 - Detalhe das pontas dos fios de tungstênio que serão penetradas no encéfalo do animal.

Figura III.12 - Conector com 3 matrizes independentes a serem penetradas em 3 diferentes regiões do encéfalo.

Diversos modelos de matrizes diferentes podem ser montados, de acordo com a região encefálica onde se deseja fazer o registro. Na Figura III.12 há um exemplo de um conector contendo 3 matrizes independentes e de tamanhos diferentes para serem inseridos em 3 regiões diferentes simultaneamente.

Após o término da montagem, pode-se fazer o implante no animal através de métodos usuais de estereotaxia (Figura III.13). A Figura III.14 mostra um animal piloto com implante de uma matriz de eletrodos.

Figura III.13 - Rato em cirurgia de lesão para verificação de coordenadas seguida de implante de matriz de eletrodos através de métodos usuais de estereotaxia.

Figura III.14 - Detalhe do implante no córtex motor de um animal piloto. Apenas o conector fica exposto. Os fios expostos penetram o encéfalo e os demais, cobertos com epóxi, são cobertos com cola de cianoacrilato.