**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

Amyres Carvalho Ribeiro

**DANO SELETIVO NO CÓRTEX ORBITOFRONTAL EM RATOS NÃO INTERFERE NA
AQUISIÇÃO DE UMA TAREFA DE ESCOLHA INTERTEMPORAL NEM NO SEU
DESEMPENHO QUANDO ADQUIRIDA PREVIAMENTE A LESÃO**

**Selective damage in the orbitofrontal cortex in rats does not interfere either with the
acquisition of an intertemporal choice task or with its performance when the
lesion is previously acquired.**

**SÃO PAULO
2018**

AMYRES CARVALHO RIBEIRO

Dano seletivo no córtex orbitofrontal em ratos não interfere na aquisição de uma tarefa de escolha intertemporal nem no seu desempenho quando adquirida previamente a lesão

Selective damage in the orbitofrontal cortex in rats does not interfere either with the acquisition of an intertemporal choice task or with its performance when the lesion is previously acquired.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiologia Geral

Orientador: Dr. Gilberto Fernando Xavier – IB-USP

SÃO PAULO

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Ribeiro, Amyres Carvalho

Dano seletivo no córtex orbitofrontal em ratos não interfere na aquisição de uma tarefa de escolha intertemporal nem no seu desempenho quando adquirida previamente a lesão / Amyres Carvalho Ribeiro; orientador Gilberto Fernando Xavier. -- São Paulo, 2018.

80 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia.

1. Tomada de decisão. 2. Córtex orbitofrontal. 3. Córtex pré-frontal. 4. Escolha intertemporal. I. Xavier, Gilberto Fernando, orient. 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_____

Dissertação defendida e aprovada em:___/___/___

CERTIFICADO CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Avaliação comportamental dos efeitos da lesão do córtex orbitofrontal em ratos experientes e ingênuos**", protocolo nº 237/2015, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier (Colaborador: Amyres Carvalho Ribeiro), que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências, em reunião de 08 de dezembro de 2015.

Vigência de Projeto: 08/12/2015 a 31/01/2017

Espécie: Rato heterogênico – **Linhagem:** Wistar

Nº de animais: 39

Peso: 300g – **Idade:** 90 dias

Sexo: (M)

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia.

Prof.ª. Dra. Mariz Vainzof

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

À minha família, mestres e amigos

“Se você exige entender tudo na hora, nunca você vai entender coisa nenhuma.”

- Olavo de Carvalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido o dom da vida e por ter me iluminado com o Espírito Santo todos esses anos, sem o qual eu não teria obtido coragem e força para finalizar este trabalho.

Agradeço a minha família pela criação cristã que me deram, tão fundamental para o desenvolvimento de minhas virtudes e caráter, sem os quais não seria possível a conclusão deste trabalho.

Agradeço ao Professor Gilberto, por ter me aceitado no laboratório e ter fornecido tudo aquilo de que eu precisei para cumprir esta missão. Agradeço, principalmente, por ter me ensinado o que livros, artigos, dissertações e teses não ensinam, como ser perseverante, resiliente e buscar a simplicidade em tudo aquilo que se faz!

Agradeço a minha tão amada namorada (e futura esposa) Allyne Fernandes, por todo o amor, companheirismo e entrega. Obrigado por todos os avisos que você incansavelmente me deu ao longo desta jornada, sem os quais dificilmente estaria no caminho certo, como estou agora.

Ao Professor Luiz Britto, meu eterno obrigado por ter aberto as portas da USP para mim e por ter sido uma das pessoas que me incentivou a seguir a carreira que se iniciou com este trabalho.

Agradeço aos mestres e amigos José Vitor da Silva, Rogério Lima e Luciano Vitorino que me acompanharam ao longo de toda esta longa jornada, desde meu início como acadêmico de Enfermagem, até o momento da conclusão deste trabalho. Sempre me incentivaram e me ajudaram em tudo aquilo de que precisei.

Ao Professor Olavo de Carvalho e ao Padre Paulo Ricardo, o meu mais sincero obrigado. Sem os seus ensinamentos eu jamais teria me tornado quem eu sou e jamais teria determinado meus objetivos de vida! Obrigado por terem me tirado deste estado de letargia e me mostrado o caminho dos estudos e da busca pela verdade!

Aos meus velhos e novos amigos, muito obrigado pela cachaça, prosa e moda de viola (poderia incluir o truco, mas paulista, gaúcho e colombiano não sabem jogar!), que

são, para mim, os pilares fundamentais de toda amizade verdadeira e sincera! Sem isso, certamente eu não teria conseguido manter a minha sanidade por muito tempo!

Agradeço a Cyrus e a Bárbara Onishi pelas recomendações de artigos e livros que foram fundamentais na elaboração da hipótese de pesquisa, bem como ao auxílio na confecção da linha temporal do experimento. Com a ajuda de vocês foi possível o andamento deste trabalho! Muito obrigado!

Agradeço a minha amiga Jéssica por ter me ajudado com as fotografias das lâminas e com a confecção das figuras das lesões! Sem você eu estaria até hoje tentando.

Agradeço a Livia Clemente, minha conterrânea, por ter me ensinado a fazer as cirurgias de lesão. Após seus ensinamentos, o que levaria 2 horas para ser concluído, pôde ser terminado em 30 minutos.

Agradeço ao meu amigo Daniel Giura por ter me ajudado com a histologia deste presente trabalho. Sem sua ajuda, as lâminas teriam ficado pior do que ficaram!

Agradeço ao Mateus por ter me auxiliado com as matrizes de treino. Sem isso, eu provavelmente não teria conseguido treinar os ratos tão rapidamente quanto treinei!

Não posso me esquecer de três figuras emblemáticas que conheci neste departamento de Fisiologia: Toninho, Eduardo (Popetar/Moral) e Leopoldera. Todos vocês, sendo meus veteranos, deram-me dicas e conselhos válidos, principalmente naqueles dias em que as coisas não estavam muito bem. Grande parte da motivação que eu tive em continuar, obtive de vocês e, por isso, meu muito obrigado!

Agradeço ao meu grande parceiro Manuel (Sô Manú) por todas as risadas, gralhadas e prosas. Claro, não poderia me esquecer também, de agradecer por todas as ajudas que o senhor me deu ao longo do desenvolvimento deste trabalho!

Agradeço ao CNPQ pelo apoio financeiro para a realização do presente estudo.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, apesar de não terem seus nomes citados aqui, me acompanharam desde o início de minha vida de estudos e que de uma forma ou de outra contribuíram para minha formação e consequente realização deste trabalho. A todos vocês, muito obrigado!

Sumário

RESUMO	12
ABSTRACT	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
1. Introdução	15
1.1. Tomada de Decisões	15
1.2. Córtex Pré-Frontal	17
1.3. Atividade de neurônios no OFC e possível significado funcional	23
1.4. Efeitos de danos no OFC	24
2. Objetivos	32
3. Materiais e Métodos	33
3.1. Animais	33
3.2. Aparelho Experimental	33
3.3. Protocolo de Treino	35
3.4. Grupos Experimentais	41
3.5. Procedimento Cirúrgico	41
3.6. Histologia	42
3.7. Análise Estatística	42
4. Resultados	44
4.1. Histológicos	44
4.2. Comportamentais	46
4.2.1. Fase 1. Efeito da lesão do OFC na aquisição da tarefa envolvendo escolhas e atrasos (ou espera) na liberação do reforço	46
4.2.2. Fase 2. Efeito da lesão do OFC no desempenho da tarefa envolvendo escolhas e atrasos (ou espera) na liberação do reforço	49

4.2.3.	Fase 1 <i>versus</i> Fase 2.....	52
4.2.4.	Fase 3. Teste de reversão do local que oferece maior quantidade de reforço 54	
4.2.5.	Fase 2 <i>versus</i> Fase 3.....	56
5.	Discussão	58
6.	Conclusão	72
7.	Referências Bibliográficas.....	73

RESUMO

O córtex orbitofrontal é apontado como uma estrutura fundamental para a tomada de decisão baseada em valor. Acredita-se que sua função envolva a valoração de recompensas a partir da integração de informações sensoriais e memória, a fim de comparar custos e benefícios. Resultados conflitantes sobre os efeitos da lesão do córtex orbitofrontal em tarefas de escolha intertemporal geram questionamentos sobre o nível de especialização de sua função. O presente estudo almeja testar a hipótese de que a participação do córtex orbitofrontal no desempenho de tarefa de escolha intertemporal depende da experiência dos animais com a tarefa em relação ao momento da lesão. Para isto foi utilizada uma tarefa de escolha intertemporal em que os animais deveriam escolher entre dois reforços distintos, um deles menor e entregue imediatamente após a resposta, e o outro maior porém entregue após um determinado tempo de espera após a resposta. Foram incluídos quatro grupos, dois experimentais envolvendo lesão neurotóxica do córtex orbitofrontal e dois controle-operados submetidos a procedimentos idênticos, exceto pela indução de lesão (os grupos controle foram, posteriormente a análises dos resultados comportamentais e constatada ausência de diferença, fundidos num único grupo controle). Um grupo experimental e um correspondente grupo controle foram submetidos a neurocirurgia antes da exposição a 15 sessões de treino na tarefa. Um outro grupo experimental e seu correspondente controle foram submetidos a treinamento similar, porém, depois da neurocirurgia. Posteriormente, todos os animais foram submetidos a 10 sessões adicionais de treino na mesma tarefa e, a seguir, a outras 10 sessões de treino de reversão, em que os locais previamente associados aos esquemas de reforço foram invertidos. Os resultados revelaram que todos os grupos se comportaram de maneira semelhante nas diferentes fases experimentais, independente do momento de realização da lesão ou mesmo da própria lesão, indicando que o córtex orbitofrontal intacto não é necessário para a aquisição e o desempenho da tarefa de escolha intertemporal. Esses resultados levam a conclusão de que danos seletivos do córtex orbitofrontal não geram prejuízos no desempenho de escolhas intertemporais.

Palavras-chave: 1. Tomada de Decisão 2. Córtex Orbitofrontal 3. Escolha Intertemporal.

ABSTRACT

The orbitofrontal cortex is pointed out as a fundamental structure for value-based decision making. It is believed that its function involves the valuation of rewards from the integration of sensory information and memory in order to compare costs and benefits. Conflicting results on the effects of the orbitofrontal cortex lesion on tasks of intertemporal choice bring about questions on the level of specialization of its function. The purpose of the present study is to test the hypothesis that the participation of the orbitofrontal cortex in the task performance of intertemporal choice depends on the experience of the animal with the task in relation to the moment of injury. For this, an intertemporal choice task was used in which the animals had to choose between two distinct reinforcements, one smaller and delivered immediately after the response and the other larger but delivered after a certain waiting time after the response. Four groups were included, two experimental groups involving neurotoxic injury and two control groups, submitted to identical procedures, except for the induction of lesion (the control groups were, after an analysis of behavioral results and found no difference, merged into a single group control) an experimental group and a corresponding control group underwent neurosurgery before being exposed to 15 training tasks sessions. Another experimental group and its corresponding control underwent similar training, yet, after neurosurgery. Afterward, all the animals were submitted to 10 additional training sessions on the same task and later to another 10 reversal sessions, in which the sites previously associated to the reinforcement schemes were inverted. The results revealed that all groups behaved similarly in the different experimental phases regardless the time of injury or even the lesion itself, showing that the intact orbitofrontal cortex is not necessary for the acquisition and performance of the task of intertemporal choice. These results lead to the conclusion that selective orbitofrontal cortex damages do not generate losses in the performance of intertemporal choices.

Key words: 1. Decision making 2. Orbitofrontal cortex 3. Intertemporal choice

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PFC – Córtex pré-frontal
OFC – Córtex orbitofrontal
dIPFC – Córtex pré-frontal dorso lateral
mPFC – Córtex pré-frontal medial
vmPFC – Córtex pré-frontal ventro medial
LED – Diodo Emissor de Luz
BC – Buraco central
BL – Buraco lateral
BE – Buraco esquerdo
BD – Buraco direito
CE – Controle experiente
LE – Lesado experiente
LI – Lesado ingênuo
CI – Controle ingênuo
GLM – *General linear model*
AP – Ântero-posteior
ML – Médio-lateral
DV – Dorso-ventral

1. Introdução

1.1. Tomada de Decisões

Tomada de Decisão é conceitualizada como um processo no qual o organismo faz a escolha de uma entre várias possibilidades de comportamentos em uma determinada circunstância, sendo que escolhas são flexíveis e modificáveis com a experiência de vida (GOLD; SHADLEN, 2007; LEE; SEO; JUNG, 2012; PEARSON; WATSON; PLATT, 2014).

Esse processo é fundamental para o gerenciamento da vida. É por meio dele que animais identificam soluções para problemas e definem comportamentos, engendram formas de alcançar seus objetivos, decidindo quais ações são potencialmente favoráveis, para assim obter a recompensa desejada ou necessária, minimizando as perdas e maximizando os ganhos (LEE; SEO; JUNG, 2012; PEARSON; WATSON; PLATT, 2014).

A tomada de decisão vem sendo classificada em 3 tipos: Perceptual, Baseada em Valores e Contexto Social. Cada um deles depende de integração com os demais.(HEEKEREN et al., 2005; HEEKEREN; MARRETT; UNGERLEIDER, 2008; PEARSON; WATSON; PLATT, 2014; RANGEL; CAMERER; MONTAGUE, 2008; WALLIS, 2003)

A tomada de decisão perceptual diz respeito às informações sensoriais que alteram a atividade do sistema nervoso central e é composta por um sistema de recepção e interpretação dessas informações, sendo essencial para os demais tipos de tomada de decisão (HEEKEREN; MARRETT; UNGERLEIDER, 2008; MAZUREK et al., 2003).

A tomada de decisão baseada em valores, abordada neste estudo, depende de um sistema de memória e comparação de eventos passados com eventos presentes, para a elaboração de ações futuras que visam a direcionar o comportamento para as escolhas mais vantajosas. Nesse tipo de tomada de decisão duas variáveis distintas são utilizadas para se determinar qual escolha é mais vantajosa em determinado momento: (1) o custo e (2) o benefício. O “custo” pode ser descrito como a medida do desconto aplicado ao valor da opção de escolha. Em outras palavras, representaria os aspectos negativos de uma dada escolha, sendo representado por tempo de espera, esforço energético e probabilidade de obtenção. O “benefício” descreve o quanto algo é desejado

pelo organismo, refletindo os aspectos positivos de uma dada escolha, como qualidade e quantidade (FUSTER, 2015; LEE; SEO; JUNG, 2012; RUDEBECK et al., 2006; SCHOENBAUM; ROESCH, 2005; WALLIS, 2007).

Inicialmente ocorre o acúmulo e interpretação de informações sensoriais acerca das variáveis que então são analisadas individualmente e comparadas entre si, havendo sobreposição entre tomada de decisão perceptual para a baseada em valores. Dessa forma o processo de valoração primeiramente envolve a determinação do quanto algo é desejado pelo organismo (benefício) e o quanto isso vai custar para ser obtido. Posteriormente, custos e benefícios são integrados para que a comparação “custo x benefício” seja realizada, para assim ser emitido um sinal referente ao valor de determinada opção de escolha. A partir da emissão do valor, o indivíduo opta por uma escolha supostamente mais vantajosa e, assim, direciona suas ações com base no princípio de que deve-se maximizar a obtenção de benefícios. As escolhas vantajosas são as que atenderiam aos requisitos de menor esforço, menor tempo de espera, maior qualidade ou quantidade, ao contrário das que possuam maior esforço, maior tempo de espera e menor quantidade e qualidade (BASTEN et al., 2010; FLORESCO; TSE; GHODS-SHARIFI, 2008; KABLE; GLIMCHER, 2009; LUCANTONIO et al., 2015; RUSHWORTH et al., 2011).

Como descrito acima, as variáveis envolvidas na tomada de decisão baseada em valores são confrontadas entre si. Acredita-se que uma das estruturas nervosas envolvidas neste processo seja o córtex orbitofrontal (ver adiante) devido a sua conectividade. Assim, esta estrutura nervosa desempenharia a função de centro integrador (BASTEN et al., 2010; RANGEL; CAMERER; MONTAGUE, 2008; WALLIS, 2007) no processo de tomada de decisão.

Diferentes contextos demandam diferentes estratégias de curto e longo prazo, em que o indivíduo pode optar por esperar mais e ganhar algo com melhor qualidade ou esperar menos e ganhar uma maior quantidade com pior qualidade, desde que esta seja, para ele, a estratégia mais vantajosa (HO et al., 1999; WINSTANLEY et al., 2006).

Por fim, a tomada de decisão baseada em contexto social depende dos anteriores para arquitetar representações de interações sociais complexas e integrar estímulos para

compreender ou gerar expectativas acerca de outros indivíduos. Este tipo de processo estaria presente principalmente em animais sociais com o córtex pré-frontal desenvolvido (HEEKEREN et al., 2005; PEARSON; WATSON; PLATT, 2014).

O córtex pré-frontal é usualmente apresentado como uma estrutura associativa e de integração de informações. Proposto como a principal região subjacente ao processo deliberativo que leva a uma decisão, já que este processo requer uma avaliação do ambiente comparando situações novas com outras já experimentadas, assim como o balanço entre diferentes parâmetros de custo e benefício (FUSTER, 2015; GOLD; SHADLEN, 2007; MOBINI et al., 2002; PAIS-VIEIRA; LIMA; GALHARDO, 2007; ROITMAN; ROITMAN, 2010)

1.2. Córtex Pré-Frontal

Nesta seção descrevemos, resumidamente, o córtex pré-frontal, uma das estruturas envolvidas no processo de tomada de decisão, no que diz respeito a suas características básicas.

Tomada de decisão é um processo cognitivo que depende da atividade de grupos de neurônios, muitos deles localizados no Córtex Pré-Frontal (PFC). Área anatomicamente definida como localizada no polo frontal do encéfalo, possui conexões recíprocas com o núcleo médio-dorsal do tálamo (cerca de 80% dos neurônios que se projetam para o PFC são provenientes deste núcleo talâmico), sendo considerado um tipo de córtex predominantemente associativo e voltado para ações. Atua como um regulador do sistema nervoso, incluindo entre suas funções o planejamento e execução de ações orientadas a objetivos específicos. Ao participar do planejamento e execução de ações, o PFC contribui para a organização destas ações no tempo, para que assim exista coerência e coordenação. Isso depende de (1) redes de neurônios que representam informações já vivenciadas, sob a forma de conhecimento (memória semântica), além de memória episódica, prospectiva e de procedimentos, (2) funções executivas e integrativas, para planejamento, envolvendo configurações de memórias para atender necessidades de curto e longo prazo, memória operacional, memória de curto prazo que visa a manter representações a serem utilizadas por ações futuras em

tempo real, decisões, controle inibitório de comportamentos inadequados para o presente momento e controle atencional, que tem por função selecionar eventos relevantes e inibir os irrelevantes na sequência de movimentos, bem como priorizar a distribuição de recursos no processamento de estímulos relevantes, para assim, favorecer a preparação motora e sensorial do organismo para um evento próximo. Todas essas funções operam em sinergia e possuem o propósito de alcançar os objetivos estabelecidos (ARNSTEN, 2009; FUSTER, 2015).

O desempenho dessas funções integrativas e executivas pelo PFC depende, como é de se esperar, de sua conectividade (Fig. 1)

O PFC é formado por quatro regiões principais: Córtex Orbitofrontal (OFC) localizado posteriormente ao osso frontal e acima das órbitas oculares, Córtex Pré Frontal Medial (mPFC), Córtex Pré Frontal Ventro Medial (vmPFC) e Córtex Pré-Frontal Dorso Lateral (dlPFC). Seus neurônios possuem como característica a polimodalidade, i.e., atividade neurofisiológica a estímulos de diferentes modalidades sensoriais, denotando sua capacidade integrativa e associativa e atividade durante o direcionamento da atenção seletiva para estímulos que contenham relevância relacionada a motivação e comportamentos do organismo (FUSTER, 2015; MEDALLA; BARBAS, 2012; MILLER; COHEN, 2001; WALLIS, 2007; WOOD; GRAFMAN, 2003).

Do córtex orbitofrontal (Fig. 2) partem projeções para a amígdala, aparentemente relacionando-se a funções executivas, principalmente memória operacional, e córtex do lobo temporal, sendo atribuída a esta conexão participação na evocação e formação de memórias, bem como projeções para o hipotálamo, ligadas ao controle do comportamento alimentar. Devido a essas conexões é atribuído ao OFC a função de integrar e comparar informações sensoriais com memórias e fornecê-las a outras regiões do PFC, de modo que as escolhas sejam analisadas a partir de seus custos e benefícios (CATANI et al., 2012; FUSTER, 2015, 1998; ZHOU; ARDESTANI; FUSTER, 2007).

Do dlPFC existem projeções para o córtex motor primário e córtex somatosensorial. As células que fazem estas projeções parecem monitorar células preparatórias para ação, atribuindo-se ao dlPFC a função de engendrar o “como” uma ação será executada em prol de alcançar os objetivos estabelecidos (WALLIS, 2007).

O vmPFC projeta-se principalmente para as estruturas que compõem o sistema límbico, incluindo córtex cingulado, córtex entorrinal, córtex piriforme, complexo amigdalóide, formação hipocampal, núcleos septais, núcleo accumbens, hipotálamo e tálamo. Dadas essas conexões, o vmPFC encontra-se em posição de influenciar o processo de tomada de decisão, pois disponibilizaria marcadores emocionais para esse processo. Esses marcadores emocionais, descritos por Bechara e seus colaboradores (BECHARA; DAMASIO; DAMASIO, 2000) em sua hipótese do marcador somático, corresponderiam a componentes que possuem valor por serem importantes para a sobrevivência, destacadas por fatores emocionais. Assim, quando o animal está em uma

situação em que deve escolher entre diferentes opções, o vmPFC disponibiliza o marcador emocional que funciona como um sinal de incentivo ou alarme, marcando as opções como “boas ou ruins”, que se expressam emocionalmente. Esse fator possui importância quantitativa para a gestão da vida, já que simplificando as opções de escolha, temos um número de opções administrável pelo córtex pré-frontal (BECHARA et al., 1997; BECHARA; DAMASIO; DAMASIO, 2000; DAMASIO, 2011; MOBINI et al., 2002).

Essas sub-regiões se conectam por meio de projeções intrínsecas. De acordo com o modelo proposto por Wallis (2007) (Fig. 2), cada subregião acessaria e seria acessada pelas outras, de forma que a decisão fosse tomada e adquirisse forma com a execução do comportamento de escolha, i.e., o mPFC acessaria informações no OFC e no dlPFC para avaliar a viabilidade da realização de uma ação direcionada a alcançar determinado objetivo, sendo este, um possível indicativo da função integrativa do PFC (FUSTER, 2015).

1.3. Atividade de neurônios no OFC e possível significado funcional

O córtex pré-frontal não somente possui funções associativas, mas também funções executivas, estando voltado para o planejamento e execução de ações. Para direcionar o comportamento, faz-se necessária a sinergia entre as funções integrativas e executivas. Das funções integrativas, a valoração das variáveis de uma escolha consiste na atribuição de um valor que, em termos de sistema nervoso, seria a frequência de disparos de potências de ação dos neurônios do PFC, principalmente daqueles localizados no córtex orbitofrontal (OFC). Estes neurônios conhecidos como células de recompensa, aumentam ou diminuem sua frequência de disparos dependendo da quantidade, qualidade, probabilidade e tempo de espera de uma recompensa (WALLIS, 2003). Acredita-se que o tempo de espera seja o principal influenciador da atividade neuronal do OFC, onde uma maior frequência de disparos é observada em recompensas que possuem pequeno tempo de espera, provavelmente refletindo o maior valor percebido (FUSTER, 2015; MONTAGUE; BERNIS, 2002).

Presente nas diversas situações do cotidiano, escolhas envolvem probabilidades, quantidades de reforço e tempo de espera. Aparentemente, a atribuição de valor associada à passagem de tempo depende do funcionamento do OFC, que possui neurônios que operam durante períodos de atraso e, assim, armazenam temporariamente informações sobre itens relevantes a serem lembrados durante a tomada de decisão. Segundo FUSTER, 2015, isso é fundamental para processos de aprendizagem, já que a presença de distratores dificultaria o aprendizado. Quanto mais experiente o organismo em uma determinada tarefa, melhor a consolidação das informações pertinentes ao seu desempenho em um sistema de memória duradoura. Assim, em situações subsequentes que requerem o desempenho da tarefa, menor sua dependência do OFC para guiar o comportamento (FUSTER, 2015; MARIANO et al., 2009; RUDEBECK et al., 2006; SCHOENBAUM; ROESCH, 2005; STALNAKER; COOCH; SCHOENBAUM, 2015; WINSTANLEY et al., 2005).

A valoração de tempo de espera é denominada de *Delay Discount*, termo que significa uma tendência natural de desvalorizar recompensas cuja obtenção depende de

espera. Assim, quando há uma escolha binária com a existência de diferença de tempo de espera entre as opções (tempo de espera seria um custo) uma redução no *Delay Discount* reflete um maior valor percebido e uma acentuação do *Delay Discount* reflete um menor valor percebido, ocasionando assim a provável escolha da opção com menor tempo de espera, por possuir maior valor conforme a percepção do organismo (FUSTER, 2015).

Uma das formas de se estudar a valoração de tempo pelo córtex orbitofrontal é por meio do comportamento de escolha intertemporal. O parâmetro de tempo tem sido estudado extensivamente, bem como a participação do OFC no processamento deste (FUSTER, 2015; HAMILTON et al., 2015).

1.4. Efeitos de danos no OFC

A lesão do OFC em ratos tem gerado resultados conflitantes, isto é, em alguns estudos a análise dos resultados comportamentais mostra que os animais lesados possuem preferência pelo reforço imediato, sendo considerados impulsivos; em contrapartida existem estudos que revelam resultados distintos, ou seja, o comportamento de escolha não se altera ou os animais escolhem mais o maior reforço embora com atraso. Um aspecto que chama a atenção em relação a esses estudos é que parece haver um padrão envolvendo o momento de treinamento na tarefa, que pode ser realizado na presença (lesão pré-treino) ou ausência (lesão pós-treino) da intervenção no OFC.

Por exemplo, no estudo de MOBINI et al., 2002, o OFC foi lesado utilizando de 0,5 µL de ácido quinolínico na concentração de 0,1 M, sendo realizadas duas injeções por hemisfério cerebral. A lesão promoveu morte celular nas subdivisões mediais, ventrais e laterais do OFC, poupando a subdivisão dorso-lateral. O córtex pré-límbico também apresentou morte celular extensa, indicando que a lesão não foi seletiva ao OFC. O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, porém, foi injetada solução tampão fosfato 0,1 M. Após a lesão os animais foram treinados a escolher entre dois reforços distintos, menor imediato e maior com atraso. Essa **lesão pré-treino** causou uma redução nas escolhas do maior reforço com atraso ao comparar o desempenho com

o grupo controle. O experimento foi organizado em fases (9 no total), cada fase composta por um determinado número de sessões (em média 20 por fase) e o atraso foi manipulado de uma fase para a outra, i.e., fase 1, 1000 ms, fase 2, 2000 ms. Os autores interpretam a redução na escolha do maior reforço com atraso por parte do grupo lesado como sendo uma intolerância à espera e que possivelmente este efeito esteja relacionado a um aumento na função de *delay discounting*.

Em contraste, KHERAMIN et al., 2002 mostraram que a **lesão pré-treino** do OFC não afeta o desempenho. Os resultados revelam que esses animais, como os animais controle, escolhiam em função do atraso, não sendo evidenciadas diferenças significativas entre eles. O OFC do grupo experimental foi lesionado utilizando-se de injeções de 0,5 µL de ácido quinolínico a 0,1 M, sendo realizadas 2 aplicações de mesmo volume para cada hemisfério cerebral; os animais controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém foi infundida solução tampão fosfato 0,1 M. A análise da lesão realizada pelos autores aponta morte celular extensa em toda a subdivisão ventral e lateral do OFC, sendo poupadas parcialmente a subdivisão medial e completamente a dorso-lateral; também foi evidenciada pequena lesão na região pré-límbica em alguns animais (não sendo especificado em quantos). O experimento apresentado por KHERAMIN et al., 2002 é muito semelhante ao de MOBINI et al., 2002, com diferenças no número de fases (5 e não 9) e o modo como o atraso foi manipulado. Primeiramente, o menor reforço possui atraso, mas este aumenta de uma fase para a outra, o atraso do maior reforço além de sofrer aumento de uma fase para a outra, também é manipulado em blocos, ou seja, dentro de uma fase se tem 6 blocos de sessões e ao término de cada bloco o atraso do maior reforço é aumentado. Os autores sugerem que não foi observado efeito de intolerância a espera pois, a lesão do OFC no experimento se restringe ao OFC na maioria dos animais e atinge o córtex pré-límbico em poucos animais e em menor extensão, diferentemente da lesão provocada no experimento de MOBINI et al, 2002, no qual a lesão do córtex pré-límbico foi muito extensa e na maioria dos animais (segundo os autores).

WINSTANLEY et al., 2004 mostraram que os animais **lesados posteriormente ao treino** escolhem o reforço maior e com atraso em uma maior proporção do que os

animais controle. A lesão foi promovida utilizando-se de ácido quinolínico a 0,09 M, sendo aplicados os volumes de 0,2 µL no sítio 1 de inserção da agulha, 0,3 µL nos sítios 2 e 3. Para cada sítio foram feitas duas aplicações; os animais controle foram submetidos ao mesmo procedimento, porém, foi injetada solução tampão fosfato 0,1 M. A análise da lesão revelou que a morte celular foi seletiva às subdivisões do OFC; os autores relatam a exclusão de 5 animais do grupo experimental, pois apresentaram lesões no córtex pré-límbico. A tarefa realizada em seus experimentos assemelha-se ao paradigma utilizado por MOBINI et.al, 2002. Os autores sugerem que o treinamento anterior à lesão molda o recrutamento do OFC, de forma que após os grupos adquirirem um desempenho com alta performance o seu recrutamento aconteceria com a finalidade de revisar o valor das recompensas obtido com cada ação realizada. A lesão prejudicaria a atualização do valor da maior recompensa em função do aumento de seu atraso. Dessa forma, o atraso não promoveria a desvalorização do maior reforço e, assim, o grupo lesado manteria escolhendo esta opção mesmo quando não sendo a mais vantajosa. Para os autores, essa seria uma possível explicação para os resultados conflitantes em relação aos estudos que, apesar de utilizarem o mesmo paradigma, lesionaram o OFC anteriormente ao treino.

RUDEBECK et al., 2006 relataram que a **lesão pós-treino** do OFC fez com que o grupo experimental escolhesse o menor reforço imediato com maior frequência quando comparado ao grupo controle. A lesão foi realizada com ácido quinolínico 0,09 M, sendo aplicadas 3 injeções bilaterais nos seguintes volumes: 0,15 µL para os sítios 1 e 3, 0,2 µL para o sítio 2. O grupo controle foi submetido a procedimento semelhante, porém sendo injetada solução tampão fosfato. A lesão do OFC foi satisfatória em toda sua extensão, não sendo relatada pelos autores morte celular em regiões adjacentes ao OFC. Foi sugerido que a lesão do OFC incapacitou a representação do maior reforço com atraso e, assim, sua devida valoração. Outros resultados obtidos no mesmo estudo reforçaram a sugestão dos autores. **Posteriormente à lesão e ao teste**, os mesmos grupos foram submetidos à tarefa, porém o atraso do maior reforço foi aplicado ao menor reforço, de forma que os dois tivessem o mesmo custo. Os autores observaram que tanto o grupo experimental quanto o grupo controle escolhiam o maior reforço sem diferenças

significativas entre eles e que, após o retorno da condição inicial, i.e., maior reforço com atraso e menor reforço imediato, o grupo experimental manteve suas escolhas no maior reforço, semelhantemente ao grupo controle. Dessa forma, os autores interpretam os resultados da seguinte forma: ao eliminar a necessidade de se integrar e comparar custo e benefício o grupo experimental pode representar efetivamente o maior reforço e assim valorizá-lo adequadamente de forma que o prejuízo ocorrido após a lesão fosse corrigido.

MARIANO et al., 2009 relatam que a **lesão pós-treino** do OFC não alterou o comportamento, pois o grupo experimental obteve resultados indistinguíveis do grupo controle. O procedimento adotado para a realização da lesão é idêntico ao utilizado por RUDEBECK et al, 2006. A análise histológica revela lesão de toda a extensão do OFC, não sendo observada morte celular em regiões adjacentes. Os grupos foram treinados utilizando um labirinto em T, onde as paredes do braço contendo o maior reforço foram pintadas de cinza e as do braço contendo o menor reforço listradas de preto e branco. Segundo os autores, é possível que, mediante a associação de uma dica visual com os diferentes reforços, tanto a representação quanto a devida valoração do maior reforço com atraso tenham ocorrido de forma que a lesão não tenha afetado a capacidade dos animais de decidir qual era o reforço mais vantajoso. Dessa forma, foi sugerido que a participação do OFC no processo de tomada de decisão seja restrito, pois quando associaram uma dica visual as escolhas não foram prejudicadas pela lesão. Assim, é possível que o OFC não seja sempre necessário.

Os resultados do estudo de ZEEB; FLORESCO; WINSTANLEY, 2010 mostraram que o comportamento de escolha variou conforme os níveis de impulsividade basal e apresentação de uma dica visual. Inicialmente os animais foram separados em dois grupos distintos, i.e., grupo com dica visual e grupo sem dica visual. Ao escolher a alavanca que correspondia ao maior reforço, uma lâmpada de LED era acesa acima da alavanca durante a duração do atraso e era apagada ao fim deste. Este processo de sinalizar a duração do atraso não ocorria para o grupo sem dica, que deveria se basear em experiência prévia para determinar o atraso vigente. Além da divisão “com dica” e “sem dica”, os animais foram separados em subgrupos mediante avaliação do seu nível de impulsividade basal, i.e., animais que escolhiam com maior frequência a maior

recompensa durante os atrasos de 0 ms e 15000 ms eram designados como “baixa impulsividade” e os que escolhiam com maior frequência a menor recompensa como “alta impulsividade”. **Após o treino** os grupos foram submetidos à cirurgia de inserção bilateral de cânulas no OFC para infusão de um coquetel composto por muscimol e baclofen, sendo injetado 0,5 µL em cada cânula o que leva a inativação transitória da estrutura. Os resultados revelaram que a inativação transitória do OFC em animais com “baixa impulsividade” e que recebiam a dica visual promoveu o aumento das escolhas do menor reforço imediato e que efeito contrário, i.e., escolher menos o menor reforço imediato foi observado nos animais com “alta impulsividade” e que não receberam dica visual. Ao infundirem antagonistas dopaminérgicos foi observado que o grupo com dica visual escolheu com maior frequência o menor reforço imediato, independente de seu nível de impulsividade basal. Os autores sugerem que os níveis individuais de impulsividade podem exercer influência sobre o recrutamento do OFC durante a valoração, de forma que indivíduos que não demonstraram mudanças em seu comportamento de escolha mediante inativação do OFC (i.e., “alta impulsividade com dica” e “baixa impulsividade sem dica”) eram menos sensíveis à dica e ao atraso apresentados. Sobre o uso de antagonistas dopaminérgicos, os autores sugerem que o efeito observado, i.e., escolher o menor reforço imediato, ocorre pela melhora da transmissão dopaminérgica no OFC devido ao fornecimento de uma dica (visual) que sinaliza o custo de uma recompensa. Dessa forma, a inativação dessas projeções dopaminérgicas privaria o OFC deste importante sinal que contribuiria para a decisão.

Possivelmente o resultado deste estudo demonstra que o recrutamento do OFC para o processo de tomada de decisão pode variar conforme o córtex pré-frontal faz uso de informações sensoriais, bem como a sensibilidade do próprio organismo em relação às variáveis de decisão (ZEEB; FLORESCO; WINSTANLEY, 2010).

MAR et al., 2011, treinaram os animais **anteriormente à lesão** do OFC. A lesão foi induzida utilizando-se de ácido quinolínico a 0,09 M sendo injetado 0,2 µL no sítio 1 e 0,3 µL nos sítios 2 e 3; o grupo controle foi submetido a procedimento semelhante, porém foi injetada solução tampão fosfato 0,1 M. A lesão foi seletiva, porém apresentou diferentes graus de extensão nas subdivisões dorsolateral, medial e ventral do OFC, não

sendo evidenciado comprometimento em estruturas circunvizinhas. Os resultados obtidos indicam que o grupo experimental escolheu o menor reforço imediato mais frequentemente do que o grupo controle durante o atraso de 0 ms e escolheu mais o maior durante o atraso de 60.000 ms; este efeito desapareceu ao longo do treinamento intensivo na tarefa. Seguindo esta etapa de treino pós-cirurgia, os autores treinaram os animais em algumas sessões nas quais era retirado o atraso do maior reforço e posteriormente a reintrodução deste. Foi observado que, durante a remoção, ambos os grupos escolhiam frequentemente o maior reforço; durante a reintrodução do atraso observou-se o retorno do padrão de escolhas, sem diferenças entre os grupos. Uma segunda “fase” de experimentos foi realizada com estes grupos com o objetivo de se avaliar a flexibilidade na estratégia de escolha. Para isso, foi feita a reversão da alavanca que dispensa o maior reforço com atraso. Os resultados indicaram que o grupo experimental teve sua flexibilidade comprometida, pois foi evidenciada uma redução na preferência pelo maior reforço, consequência da contínua emissão de respostas no lado que previamente a reversão dispensava o maior reforço e que após a reversão dispensava o menor. Os autores interpretam estes resultados como uma incapacidade de representar adequadamente aspectos da tarefa no PFC, função que estaria relacionada ao OFC (mas não exclusivamente) e que a correção do comportamento após o treinamento intensivo estaria relacionada a outras estruturas que poderiam ser acionadas para suprir a ausência do OFC. Segundo os autores, a hipótese de que a recuperação do desempenho tenha acontecido por meio de um rearranjo funcional do OFC é refutada pela dificuldade apresentada pelo grupo experimental durante o teste de flexibilidade comportamental.

No mesmo estudo, MAR et al., 2011 realizaram um segundo experimento nos mesmos moldes do primeiro (citado acima), com a **diferença da localização da lesão**. Dois grupos experimentais foram incluídos, um deles com a sub-região medial do OFC (mOFC) lesada e o outro com a sub-região lateral do OFC (lOFC) lesada. Para promover a lesão destas sub-regiões foi utilizado de NMDA a 0,1 M, sendo injetado o volume de 0,2 µL nas coordenadas referentes ao mOFC e 0,3 µL nas coordenadas do lOFC. O grupo controle recebeu injeções de solução tampão fosfato. A análise das lesões indicou que

todas foram satisfatórias, sem o comprometimento das subdivisões circunvizinhas. Os resultados demonstraram que imediatamente após a lesão todos os grupos se comportavam de maneira semelhante, exibindo preferência pelo maior/atraso quando o tempo de espera entre a emissão de uma resposta e a obtenção da recompensa era menor e preferindo escolher o menor/imediato quando o tempo de espera para obter o maior aumentava. Porém, com o prosseguimento do treinamento, foi observado que os animais com o OFC medial lesado escolheram o maior reforço com atraso mais frequentemente do que os outros dois grupos. Distintamente, o grupo que sofreu lesão do OFC lateral escolhia mais frequentemente o menor reforço quando comparado com o grupo controle. Durante a reversão das alavancas, o grupo com dano no OFC medial foi o mais rápido em recuperar seu desempenho quando comparado ao grupo controle e ao grupo IOFC lesado, sendo este último o mais lento em recuperar seu desempenho. Os resultados foram interpretados como uma das primeiras demonstrações de que o OFC não é uma estrutura funcionalmente unitária quando se trata da função de *delay discounting*. Os autores sugerem que, provavelmente, para se escolher o maior reforço com atraso é preciso que se iniba a emissão da resposta que levaria à obtenção do menor reforço imediato. Assim a lesão da sub-região lateral do OFC pode ter prejudicado o componente inibitório necessário para obtenção do maior reforço com atraso. Sobre o grupo com dano no OFC medial que escolhia mais o maior reforço com atraso, foi sugerido que esta subregião do OFC funcionaria como um local de integração e comparação de informações do valor do maior e menor reforço, de forma que a lesão da sub-região medial do OFC tenha privado o animal deste sinal comparativo e, assim, obrigando-o a adotar uma estratégia mais simples, i.e., escolher o maior reforço, pois a quantidade deste é mais vantajosa.

JO et al., 2013 relataram que a **lesão pós-treino** do OFC não alterou o comportamento de escolha, i.e., o grupo experimental se comportou semelhantemente ao grupo controle. A lesão foi induzida utilizando-se de ácido quinolínico a 0,1 M, sendo realizadas 3 injeções por hemisfério, nos volumes de 0,25 µL para 1 rato e 0,4 µL para o restante (os autores não especificam o motivo da diferença de volume utilizado). Os animais controle não foram submetidos à cirurgia. O treino foi realizado em um labirinto

de 6 braços, um deles contendo o menor reforço imediato e os outros 4 contendo o maior reforço com atrasos (cada braço possuía um atraso maior que o outro, i.e., 0, 3000, 6000 e 9000 ms). Após alguns dias, foram adicionados 3000 ms ao menor reforço e o maior reforço foi alterado para 3000, 6000, 9000 e 12000 ms. Foi sugerido pelos autores que a ausência de diferenças comportamentais pela lesão pós-treino do OFC possa ser um indicativo de que esta estrutura não participa da tomada de decisão quando o tempo de espera é a principal forma de custo na tarefa.

ABELA; CHUDASAMA, 2013 treinaram ratos a tocar com o focinho um quadrado branco que aparecia aleatoriamente na direita ou na esquerda de uma tela de LEDs; após o toque eram recompensados. Depois dessa fase inicial de treinamento, o grupo experimental foi submetido à **cirurgia de lesão do OFC (pós-treino)**. A lesão do OFC foi realizada utilizando-se de NMDA 0,09 M, sendo injetado 0.2 μ L para os sítios 1 e 3, 0,3 μ L para o sítio 2. O grupo controle foi submetido a procedimento análogo, porém foi injetada solução salina. A análise da lesão revela que toda a extensão do OFC sofreu morte celular, e que a lesão atingiu-se à estrutura desejada; em 3 animais a subdivisão medial foi poupada. Após a cirurgia, ambos os grupos foram treinados na tarefa, quando deveriam escolher entre o menor reforço imediato e o maior reforço com atraso. Os resultados mostram que o desempenho dos animais experimentais não diferiu do exibido pelos controle. Os autores interpretam os resultados como evidência de que a influência do atraso na decisão não depende do OFC. Outro resultado encontrado neste estudo, revela que a lesão do hipocampo ventral gerou diferenças nos comportamentos dos grupos, quando os animais experimentais escolhiam mais frequentemente o menor reforço imediato quando comparados ao controle. O hipocampo ventral teria participação, possivelmente por permitir ao organismo imaginar recompensas futuras e assim a sua devida valoração.

Em suma, esses conjuntos de observações assinalam que lesões do córtex orbitofrontal podem: (1) **Não causar efeitos** nas escolhas em tarefas de decisão intertemporal (ABELA; CHUDASAMA, 2013; JO et al., 2013; KHERAMIN et al., 2002; MARIANO et al., 2009), (2) direcionar a preferência para o **menor reforço imediato** (MOBINI et al., 2002; RUDEBECK et al., 2006) ou (3) **maior reforço com atraso**

(WINSTANLEY, 2004), (4) **variar** conforme a sub-região lesada (MAR et al., 2011) ou (5) **variar** conforme a apresentação de uma **dica explícita** (LED acesso no período de duração do atraso)(ZEEB; FLORESCO; WINSTANLEY, 2010). É possível que essas discrepâncias possuam relação com as estratégias adotadas para induzir a lesão. Nos experimentos de MOBINI et al., 2002 a lesão foi realizada previamente ao treinamento e não foi restrita apenas ao OFC, lesionando em grande extensão o córtex pré-límbico. Em contrapartida, o estudo de KHERAMIN et al., 2002 também envolveu lesão pré-treinamento, mas esta foi restrita ao OFC. Nos estudos de ABELA; CHUDASAMA, 2013; JO et al., 2013 e MARIANO et al., 2009 a lesão foi realizada pós-treinamento e se estendeu por todo o OFC não afetando regiões circunvizinhas, enquanto no estudo de MAR et al., 2011 apesar da lesão ser realizada pós-treino e ter por objetivo a lesão de toda a extensão do OFC, neste caso em específico, partes das subdivisões dorsolateral, medial e ventral do OFC foram poupadas. RUDEBECK et al., 2006 também induziram uma lesão pós-treino que se estendeu por todo o OFC, não atingindo regiões circunvizinhas e direcionando a preferência para o menor reforço imediato. Interessantemente, WINSTANLEY, 2004 induziu lesão semelhante e obteve resultados diferentes dos de RUDEBECK et al., 2006, isto é, direcionando a preferência para o maior reforço com atraso. O procedimento mais distinto que visava a inativar o OFC foi realizado por ZEEB; FLORESCO; WINSTANLEY, 2010, que, preferindo não lesar permanentemente o OFC, optaram pela implantação de cânulas com a finalidade de infundir antagonistas dopaminérgicos e um coquetel composto por muscimol e baclofen. No conjunto, essas observações levam à seguinte indagação: Quando o comportamento de escolha é dependente de experiência prévia, i.e., situações previamente treinadas, a tomada de decisão independe do córtex orbitofrontal?

2. Objetivos

O objetivo geral deste estudo é avaliar se o comportamento de escolha intertemporal baseado em experiência prévia depende da integridade do córtex orbitofrontal. Se animais treinados na tarefa intertemporal envolvendo escolhas antes ou depois da lesão neurotóxica do OFC não apresentarem deficiência no desempenho,

poderemos concluir que a integridade desta estrutura nervosa não é necessária para essa função. Por outro lado, é possível que animais sem treinamento prévio à lesão exibam prejuízo de desempenho, indicando que o OFC é necessário para a aquisição desta habilidade. Avaliar-se-á também em que extensão a lesão interfere na flexibilidade comportamental dos animais na tarefa de escolhas intertemporais, por meio de um teste de reversão.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos, adultos, originários do biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Eles foram mantidos em gaiolas padrão (no máximo 3 animais por caixa) em um ciclo de 12h luz – 12h escuro (luzes acesas às 06h00min) e a temperatura mantida a $23^{\circ}\text{C} \pm 3$. 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 realização dos experimentos. Todos os procedimentos e cuidados respeitaram as diretrizes da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, que adere a normas nacionais e internacionais. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

3.2. Aparelho Experimental

O aparelho utilizado no experimento, desenvolvido no próprio laboratório, permite avaliar tomada de decisões envolvendo escolhas de quantidades de alimento em função do atraso do reforço. Trata-se de uma caixa de acrílico de 26x 26 x 26 cm e que possui em uma de suas paredes um conjunto de 3 buracos dispostos lado a lado horizontalmente e um comedouro (Fig. 3)

Cada um dos buracos é confeccionado com um tubo quadrado de aço inoxidável medindo 2,5 cm de lado x 4,5 cm de comprimento. No fundo de cada buraco, há um LED (do Inglês: Light Emitting Diode ou Diodo Emissor de Luz) de cor branca que se ascende 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 instalada sobre os focinhadores permite transmitir a imagem para um monitor externo. Imediatamente abaixo dos buracos e 1 cm acima do assoalho há um comedouro, onde o animal recebe reforço (*pellets* de chocolate com peso médio de 17 mg). 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.

O aparelho é mantido dentro de uma caixa atenuadora de ruídos, de MDF, preta, com vedação com borracha isolante. Fora da caixa atenuadora de ruídos encontram-se um 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 o microprocessador (Arduino MEGA) 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.

3.3. Protocolo de Treino

O protocolo de treino envolve etapas sucessivas. 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).

Etapas 1 – Condicionamento aos focinhadores (1 sessão de aproximadamente 60 minutos)

De início, 3 animais foram colocados simultaneamente na caixa de condicionamento operante. Todos os LEDs encontram-se acesos. Os animais podem

explorar livremente a caixa. Quando um dos animais passa a explorar o comedouro e os focinhadores presentes, são fornecidos 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 por fim acabará por chamar a atenção dos demais, que passam também a explorar o focinhador e o comedouro, sendo também reforçados. Nesta etapa, a liberação dos pellets de chocolate pode ser acionada de duas maneiras: (1) Quando o animal inserir o focinho nos focinhadores ou (2) quando se encontra próximo a eles, sendo reforçado pelo experimentador. Dessa forma, atrai-se a atenção dos animais quando encontram-se com a cabeça próxima aos focinhadores.

Etapa 2 – Condicionamento a um focinhador por vez, de 3 possíveis (1 a 2 sessões de aproximadamente 60 minutos)

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 – Condicionamento a apenas um focinhador (1 a 2 sessões de aproximadamente 60 minutos)

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

Etapa 4 – Condicionamento de uma sequência de 2 focinhadores (5 a 6 sessões de aproximadamente 60 minutos)

O animal recebe reforço se focinhar o BC e, em seguida, um BL, quer seja BE ou BD; as sequências BC-BE ou BC-BD são 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 (Fig. 4) as fases do experimento são classificadas como se segue:

-Sessão: Corresponde a cerca de 60 min de treino (podendo se estender além disso) em um dia para cada animal. Uma sessão inclui 4 blocos envolvendo 40 pares de focinhadas BC-BL por bloco.

-Bloco: Cada bloco corresponde a um conjunto de 40 pares de focinhadas. Em cada novo bloco é introduzido um atraso. Os atrasos utilizados foram de 0, 1, 3 e 5 s, respectivamente, em cada bloco, sendo aumentado ao longo dos blocos.

- Tentativa: Equivale a um par de focinhadas, i.e., o animal focinha o BC seguido de um BL, sendo reforçado com uma quantidade pré-estabelecida de bolinhas de chocolate (1 ou 4) em função do buraco lateral que focinha.

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. Se executar essa sequência BC - BL corretamente, o animal é reforçado. O BL que é aceso em cada tentativa varia aleatoriamente ao longo da sequência, mas garantindo que 50% das tentativas tenham BE e as demais 50% das tentativas tenham BD.

Os animais de cada grupo são distribuídos de tal modo que um dos lados é fixado como lado com reforço maior (4 bolinhas de chocolate), enquanto o outro lado libera reforço menor (1 bolinha de chocolate), sendo o lado e a quantidade de reforços contrabalanceado entre os animais do grupo. Essas 16 tentativas forçadas iniciais de cada bloco mostram para os animais a regra vigente naquele bloco, ou seja, informam o lado que leva ao maior reforço, assim como o atraso na sua liberação. Em seguida a essas 16 tentativas iniciais, o animal é exposto, ainda no mesmo bloco, a outros 16 pares tentativas forçadas que seguem o mesmo padrão inicial, porém, são entremeados por pares de 8 tentativas de escolha livre, nas quais , ao invés de acender apenas um dos BLs, ambos os BLs são acesos simultaneamente, permitindo que o animal realize a escolha.

Essas 8 tentativas de escolha livre em cada bloco permitem aferir a escolha dos animais para um dos lados, portanto, para uma determinada quantidade de reforço em função do atraso.

Durante as tentativas de escolha livre, se focinhado o BC e após 10000 ms não for focinhado o BL (BD-BE) é contabilizado erro de omissão. Os erros de omissão nos permitem aferir o aprendizado dos procedimentos relacionados ao funcionamento da tarefa.

A etapa 5 foi constituída de 3 fases (Fig. 5). A fase 1 foi composta por 15 sessões de treino e as fases 2 e 3 por 10 sessões de treino cada, totalizando, assim, 35 sessões. Metodologicamente, as fases 1 e 2 são idênticas. Na fase 3, realizamos a reversão do buraco que dispensa o maior reforço, ou seja, se antes o animal recebia o maior reforço no BD, agora ele é apresentado ao focinhar o BE, e vice-versa.

Fig.4 – Representação esquemática de uma tentativa livre durante a etapa 5 do experimento. A barra preta à esquerda representa o tempo de duração de uma tentativa. A esquerda é representada uma tentativa com menor reforço (1 pellet) fornecido imediatamente após a resposta e à direita são representadas tentativas com maior reforço (4 pellets) que podem ser fornecidos, em tentativas independentes, após os atrasos de 0, 1, 3 e 5 s, em cada bloco de 40 tentativas.

Fig.5 – Linha temporal do experimento para o grupo ingênuo (acima) e grupo experiente (abaixo).

3.4. Grupos Experimentais

Os 20 animais utilizados no experimento foram organizados em 4 grupos, cada qual com 5 animais. Dois grupos, um Lesado (L) e outro Controle (C), foram submetidos ao treinamento na tarefa antes da neurocirurgia, portanto, no momento da lesão eram Experientes (E) em relação ao desempenho da tarefa. Outros 2 grupos, um L e outro C, foram submetidos ao treinamento na tarefa depois da neurocirurgia, portanto, no momento da lesão, eram inexperientes (I) em relação ao desempenho da tarefa. Portanto, resultaram 4 grupos: CE, LE, CI e LI.

Resumidamente, os animais dos grupos LI e CI foram submetidos à cirurgia de lesão do OFC previamente ao início do treinamento na tarefa (Fig. 5) [incluindo as etapas 1 a 5 (Fases 1, 2 e 3)]. Diferentemente, os animais do grupo CE e LE foram submetidos ao treinamento (Fig. 5), passando pelas etapas 1 a 5 (Fase 1), e somente então foi realizada a neurocirurgia para indução de lesão do OFC, retornando para os treinos nas Fases 2 e 3. Dessa forma, foi possível avaliar os efeitos da lesão induzida antes do treinamento e também após o treinamento na tarefa, num mesmo experimento.

3.5. Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados com uma mistura composta por 5 ml de Ketamina (100 mg/ml) e 1,7 ml de Xilazina (20 mg/ml), em volume de 0,15 ml/100 g de peso animal. Após a realização da tricotomia com o intuito de expor o local da incisão cirúrgica, os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Alemanha), no qual é realizado o procedimento cirúrgico, tendo a barra dos incisivos posicionada 3,3 mm abaixo da linha interaural. Após a incisão da pele por bisturi e remoção do periósteo, foi possível expor as linhas de sutura de seus ossos. Por meio de uma broca odontológica foram abertos dois orifícios, um sobre cada hemisfério cerebral, sobre a região nervosa almejada, possibilitando inserir uma micropipeta de vidro estirado cujo diâmetro era inferior a 40 μ m, colada à ponta de uma microseringa. Cuidados especiais foram tomados para evitar danos à dura-máter. Tomando-se o bregma como referência ântero-posterior (AP) igual a zero, a linha média como referência meso-lateral

(ML) e a superfície da dura-máter como referência dorso-ventral (DV) utilizaram-se os seguintes conjuntos de coordenadas para atingir a estrutura almejada: (1) AP = - 3,7 mm, ML = $\pm$ 1,2 mm e DV = - 4,6 mm, e (2) AP = - 3,7 mm, ML = $\pm$ 2,8 mm e DV = - 4,6 mm. Em cada um desses pontos injetou-se 0,16 μ L de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) a 0,1M por local de aplicação, dissolvido em tampão fosfato (PBS) com pH 7,4, com o intuito de lesionar o OFC dos animais submetidos à lesão (experientes e ingênuos). Os animais controle foram submetidos ao mesmo procedimento, exceto pelo fato de que ao invés de injetar NMDA, 0,16 μ L de PBS foi injetado (nos experientes e ingênuos). Após cada microinfusão, aguardou-se 60 segundos antes de remover a micropipeta para possibilitar a difusão da substância injetada, minimizando refluxo do volume injetado pela trajetória da micropipeta. Concluídas as microinjeções, a pele excisada foi suturada.

Após a cirurgia, os animais passaram por um período de 7 dias de recuperação, e depois submetidos às etapas comportamentais do experimento.

3.6. Histologia

Ao final dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados profundamente com um volume de 0,3 ml/100 g de peso animal de uma mistura composta por 5 ml de Cetamina 10% e 1,7 ml de Xilazina 2%. Os encéfalos foram removidos das caixas cranianas e congelados. Secções frontais de 30 μ m de espessura foram tomadas ao nível do OFC. As secções foram coradas com violeta de cresil. As lâminas foram analisadas sem conhecimento do desempenho comportamental dos animais.

3.7. Análise Estatística

A análise estatística envolveu os resultados coletados de 19 animais, pois um dos animais morreu durante o procedimento cirúrgico.

Os resultados comportamentais envolvendo (1) os tipos de escolhas dos animais e (2) o número de erros cometidos, ambos das tentativas em que houve escolha livre, foram analisados utilizando-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) (ZAR, 2010). Foi realizada uma análise independente para cada um desses escores. “Bloco” e “Sessão” foram incluídos na análise como fatores intrassujeitos e

“Grupo” foi incluído como fator entressujeitos. O fator “Bloco” afere escolhas orientadas para o lado com maior reforço considerando os diferentes atrasos na sua liberação. O fator “Sessão” afere a melhora do desempenho do animal ao longo do treinamento, ou seja, reflete o aprendizado ao longo do treino.

Essas análises foram realizadas utilizando-se os programas Statistica 10 (Statsoft, Tulsa, Ok, USA) e Sigmaplot (Systat Software Inc).

Para fins de análise estatística, e depois de constatada ausência de diferenças significantes, os resultados dos animais dos grupos CI e CE foram agrupados, uma vez que os animais não foram submetidos à lesão do OFC, sendo sua única diferença o momento em que o procedimento cirúrgico, sem indução de lesão, foi realizado em relação às fases de treino. Similarmente, para fins de análise estatística, os resultados na Fase 1 dos grupos CI, CE e LE foram agrupados, uma vez que nesta fase esses animais não haviam sido submetidos à lesão do OFC, sendo sua diferença apenas terem (Grupo CI) ou não (Grupos CE e LE) sido submetidos ao procedimento cirúrgico, mas todos sem lesão nesta fase.

Em outras palavras, a fim de avaliar em que extensão o OFC contribui para a **aquisição** do comportamento de escolha, comparou-se o desempenho, na Fase 1, de animais submetidos à lesão antes do treinamento (Grupo LI) com o desempenho de animais não submetidos à lesão. Note-se que estes últimos incluem animais expostos ao procedimento cirúrgico (Grupo CI) e animais que não haviam sido submetidos ao procedimento ou à lesão nesta fase (Grupos LE e CE). Isto é, uma vez que os animais dos grupos CI, LE e CE não tinham lesão na Fase 1, seus resultados foram agrupados num único grupo “Controle”.

Também o desempenho dos animais de uma fase para a outra foi comparado. Isso foi implementado comparando-se os resultados das 3 últimas sessões de uma fase com as 3 primeiras da fase subsequente. Em outras palavras, foram comparados os resultados coligidos nas sessões 13, 14 e 15 da Fase 1 com as sessões 16, 17 e 18 da Fase 2. Procedimento similar foi adotado em relação aos resultados das Fases 2 e 3. Dessa forma, foi possível avaliar o efeito da lesão sobre o desempenho de animais submetidos ao treinamento pré- ou pós-operatório.

4. Resultados

4.1. Histológicos

A análise histológica mostra que os animais do grupo lesado apresentaram perda celular em toda extensão do OFC e que, em sua maioria, a lesão foi restrita a essas regiões (Fig. 6 e 7). Observou-se também que 1 animal exibiu pequena perda celular no córtex frontal associativo e 1 animal no córtex motor primário e córtex infralímbico. Assim, no conjunto, esses resultados indicam que o procedimento cirúrgico empregado promoveu perda celular em toda a extensão do córtex orbitofrontal, com poucos danos nas regiões circunvizinhas.

Fig. 6 – Coordenada anteroposterior mensurada a partir do bregma +3.7. À esquerda, fotografia do córtex orbitofrontal de um animal controle, 0.16 uL de PBS. À direita, fotografia do córtex orbitofrontal de um animal do grupo lesado, 0.16 uL de NMDA. * = Localização da lesão.

Fig. 7 – Representação das maiores e menores lesões observadas. Progredindo do cinza mais claro para o mais escuro, a maior lesão observada e a menor lesão observada. MO = OFC medial, VO = OFC ventral, LO = OFC lateral, DLO = OFC dorso lateral, M2 = Córtex Motor Secundário, FrA = Córtex Frontal Associativo e IL = Córtex Infra-Límbico.

4.2. Comportamentais

A Fase 1, composta por 15 sessões, representou uma tentativa de avaliar o efeito da lesão do OFC sobre a **aquisição** da tarefa de escolha de quantidades de reforço, em função do atraso na liberação do reforço depois da escolha.

A Fase 2, incluindo 10 sessões, representa uma tentativa de avaliar o efeito da lesão do OFC sobre o **desempenho** da tarefa de escolha adquirida previamente à lesão.

A Fase 3, incluindo 10 sessões, representa uma tentativa de avaliar a flexibilidade comportamental dos animais após lesão do OFC, por meio de uma estratégia de reversão em que o local previamente associado ao maior reforço é alterado.

Comparações dos resultados das Fases 1 e 2 fornecem informações adicionais sobre o impacto da lesão do OFC sobre o desempenho da tarefa de escolha adquirida pré-operatoriamente, e comparações dos resultados das Fases 2 e 3 fornecem informações adicionais envolvendo os efeitos da lesão sobre o desempenho na tarefa de reversão.

4.2.1. Fase 1. Efeito da lesão do OFC na aquisição da tarefa envolvendo escolhas e atrasos (ou espera) na liberação do reforço

A Figura 8 mostra os resultados em termos do número de escolhas do maior reforço (Figura 8A) e número de erros de omissão (Figura 8B), ambos nas tentativas de escolha livre, em função dos atrasos de 0, 1000, 3000 e 5000 ms e das 15 sessões de treino na fase 1.

Em relação ao número de escolhas do maior reforço (Figura 8A), a ANOVA revelou diferença significativa nos fatores Sessão ($F_{14,238} = 3,25$; $P < 0,0001$), Atraso ($F_{3,51} = 40,84$; $P < 0,0001$) e na interação envolvendo os fatores Sessão*Atraso*Grupo ($F_{42,714} = 1,59$; $P = 0,0117$). Assim, como esperado, há um aumento significativo do número de escolhas pelo lado que proporciona o maior número de reforços ao longo das sessões de treino, expresso pelo efeito significativo do fator Sessão. Também, como esperado, o aumento do atraso na liberação do maior reforço leva a uma redução substancial do número de escolhas por esse lado, indicando que o atraso deteriora a preferência dos animais pelo mesmo, expresso no efeito significativo do fator Atraso. A Figura 8A ilustra, no geral, que os animais lesados exibiram um padrão de desempenho similar ao exibido pelos controle, indicando que foram capazes de aprender a tarefa e que foram sensíveis ao atraso imposto na liberação do reforço. O significado da interação significativa envolvendo os fatores Sessão*Atraso*Grupo, detectada pela ANOVA, não é claro, pois

não parece haver um padrão inteiramente consistente nesses resultados. Nas sessões iniciais de treino, em geral, os animais lesados exibem maior número de escolhas pelo lado que oferece o maior reforço e a redução dessas escolhas pelo aumento do atraso é menor em relação ao exibido pelos animais controle (ver sessões 1, 2, 3 e 5). Em algumas sessões das etapas mais avançadas do treino os animais lesados exibem maior redução do número de escolhas pelo maior reforço (ver sessões 9, 12 e 13). Nas duas últimas sessões de treino (sessões 14 e 15) o desempenho dos animais lesados é inconsistente.

No conjunto, os resultados sugerem que a lesão do OFC não prejudicou a aquisição da tarefa ao longo das sessões de treino e não interferiu na capacidade dos animais de desvalorizarem a dimensão do reforço pelo aumento do atraso, mas parece ter alterado a consistência dessa resposta.

Em relação ao número de erros de omissão (Figura 8B), a ANOVA revelou diferença significativa na interação envolvendo os fatores Sessão*Atraso*Grupo ($F_{42,714} = 1,52$; $P = 0,0204$). Novamente, não parece haver um padrão inteiramente consistente em relação ao número de erros de omissão, pois parece haver sessões e atrasos em que esse número seria maior e outros em que esse número seria menor.

4.2.2. Fase 2. Efeito da lesão do OFC no desempenho da tarefa envolvendo escolhas e atrasos (ou espera) na liberação do reforço

A Fase 2 do presente conjunto de experimentos envolveu a tentativa de avaliar o impacto da lesão sobre o desempenho da tarefa adquirida previamente à lesão. Assim, animais intactos previamente submetidos ao treinamento na tarefa (Fase 1) foram submetidos à neurocirurgia para a indução da lesão (Grupo LE) e treinados novamente na tarefa ao longo de 10 sessões adicionais (Fase 2). O desempenho desses animais foi comparado ao de (1) animais sem lesão (Grupos CI e CE) também expostos ao treinamento prévio (Fase 1) e submetidos ao treinamento durante a Fase 2, e (2) animais lesados, porém, que receberam treinamento na tarefa (Fase 1) quando já se encontravam lesados (Grupo LI), sendo, posteriormente, submetidos ao treinamento na Fase 2.

Os resultados são apresentados na Figura 9

Em relação ao número de escolhas do lado que oferece o maior reforço em função do atraso e sessão (Figura 9A), a ANOVA revelou a existência de efeito significativo apenas em relação ao fator Atraso ($F_{3,48} = 54,15$; $P < 0,0001$). De fato, a Figura 9A indica que os animais continuam escolhendo o lado que oferece o maior reforço e que essa escolha é substancialmente alterada pela interposição de um intervalo de tempo (atraso) entre a escolha e o reforço. Por outro lado, como não houve qualquer efeito significativo envolvendo o fator Grupo, depreende-se que a lesão pós-treino não afetou a escolha dos animais em relação aos Controle e mesmo em relação aos animais cuja lesão foi executada previamente ao treino inicial na Fase 1. Portanto, independentemente do momento em que a lesão foi realizada, i.e., pré- ou pós-treino, não houve alteração no desempenho dos animais na tarefa envolvendo escolha da magnitude do reforço, nem prejuízo na identificação e depreciação do reforço pelo aumento do atraso.

Em relação ao número de erros de omissão (Figura 9B), a ANOVA revelou a existência de efeito significativo em relação ao fator Atraso ($F_{3,48} = 4,13$; $P = 0,0111$).

Parece haver uma tendência (relativamente pouco consistente) ao aumento do número de erros de omissão com o aumento do atraso. Não se descarta a possibilidade de que esse efeito esteja associado com o fato de as tentativas com atraso maior serem as últimas da sessão de treino. Assim, os animais poderiam estar menos motivados por já terem recebido reforço ao longo da sessão ou mesmo cansados.

4.2.3. Fase 1 versus Fase 2

A comparação das sessões 13, 14 e 15 da Fase 1 com as sessões 16, 17 e 18 da Fase 2 representa uma tentativa de avaliar o efeito da lesão pós-treino no comportamento dos animais

Os resultados são apresentados na Figura 10.

Em relação ao número de escolhas do maior reforço (Figura 10A), a ANOVA revelou a existência de diferença significativa em relação ao fator Fase ($F_{1,16} = 11,46$, $P = 0,0038$) e Atraso ($F_{3,48} = 36,74$, $P < 0,0001$). A ANOVA revelou ainda efeitos não significantes, porém tendendo à significância estatística, em relação à interação envolvendo os fatores Atraso*Grupo ($F_{6,48} = 4,87$, $P = 0,0857$) e os fatores Fase*Sessão*Atraso*Grupo ($F_{12,96} = 1,76$, $P = 0,0709$). A Figura 10A sugere uma inconsistência no desempenho do Grupo LI particularmente na sessão 18, uma vez que, diferentemente dos demais grupos, o consistente efeito de atraso não foi observado para este grupo nesta sessão. Por outro lado, cabe ressaltar que o desempenho dos animais LE apresentou o esperado efeito de maior número de escolhas no atraso igual a zero associado a uma redução do número de escolhas do maior reforço em função do aumento do atraso.

Em relação ao número de erros de omissão (Figura 10B), a ANOVA revelou que o único efeito digno de nota se refere ao efeito próximo da significância estatística em relação ao fator Grupo ($F_{2,16} = 3,06$, $P = 0,075$) que parece estar relacionado com o menor número de erros dos animais do Grupo LE, particularmente nas duas sessões que se seguem a cirurgia.

4.2.4. Fase 3. Teste de reversão do local que oferece maior quantidade de reforço

Na Fase 3 inverteu-se o lado que oferece maior quantidade de reforço, como forma de avaliar a flexibilidade comportamental dos animais portadores de danos no OFC, em comparação com os controle, considerando seu histórico de treinamento na tarefa em relação ao momento da realização do procedimento cirúrgico.

Os resultados são apresentados na Figura 11.

Em relação ao número de escolhas do maior reforço (Figura 11A), a ANOVA revelou efeito significativo envolvendo os fatores principais Sessão ($F_{9,144} = 21,50$, $P < 0,0001$) e Atraso ($F_{3,48} = 3,11$; $P = 0,0487$), e efeitos significantes envolvendo a interação entre os fatores Sessão*Atraso ($F_{27,432} = 1,82$, $P = 0,0081$). Como esperado, nas sessões iniciais da fase de reversão, o número de escolhas em relação ao lado que oferece a maior quantidade de reforços foi relativamente pequena, o que contribuiu para a eliminação do efeito de atraso (Figura 11A). Porém, à medida que o treinamento prosseguiu ao longo das sessões de treino na fase 3, houve recuperação da típica preferência das escolhas pelo lado que oferece maior quantidade de reforço e também do esperado efeito do atraso sobre essas escolhas (Figura 11A).

Quanto ao número de erros de omissão (Figura 11B), a ANOVA revelou efeito significativo em relação ao fator Sessão ($F_{9,144} = 5,39$; $P < 0,0001$). De fato, a Figura 11B mostra que o número de erros de omissão foi relativamente elevado nas sessões iniciais

da fase 3, de reversão, mas esse efeito tendeu a diminuir com o prosseguimento das sessões de treino nessa fase.

Portanto, os animais parecem adequar suas escolhas em função dos atrasos e das contingências de treino, independentemente da lesão ou do momento em que a mesma foi realizada ao longo do treinamento.

4.2.5. Fase 2 *versus* Fase 3

A comparação das sessões 23, 24 e 25 da fase 2 com as sessões 26, 27 e 28 da fase 3 representa uma tentativa de avaliar a readequação do comportamento dos animais à reversão das contingências de reforço.

Os resultados são apresentados na Figura 12.

Em relação ao número de escolhas do maior reforço, a ANOVA revelou a existência de diferenças significantes em relação aos fatores principais Fase ($F_{1,16} = 8,47$, $P = 0,0102$), Sessão ($F_{2,32} = 3,95$, $P = 0,0328$) e Atraso ($F_{3,48} = 10,89$, $P < 0,0001$), e em relação a interação entre os fatores Fase*Sessão ($F_{2,32} = 6,38$, $P = 0,0047$) e Fase*Atraso ($F_{3,48} = 25,74$, $P < 0,0001$) (Figura 12A). Assim, como esperado, logo após a reversão há uma significativa redução das escolhas pelo lado que leva à liberação de uma maior quantidade de reforço, o que interfere no efeito do atraso. Note que nas sessões 23, 24 e 25 da fase 2 os animais escolhem preferencialmente o maior reforço quando o atraso é pequeno, mas essas escolhas diminuem à medida que o atraso aumenta. Diferentemente, nas sessões 26, 27 e 28 da fase 3 observa-se uma reduzida resposta inicial à maior quantidade de reforço; essa resposta aumenta paulatinamente ao longo das sessões (Figura 12A). Como vimos acima, são necessárias mais sessões de treino para que o efeito do atraso reapareça (Figura 12A).

Esses resultados ressaltam, novamente, que o padrão de comportamento de escolha dos animais lesados não difere do exibido pelos animais controle.

Em relação ao número de erros de omissão (Figura 12B), a ANOVA revelou ausência de quaisquer efeitos significantes.

5. Discussão

Os resultados do presente conjunto de experimentos mostram que danos seletivos do OFC não causam prejuízos no desempenho da tarefa de escolha intertemporal, independentemente do dano ter sido induzido antes (Fase 1, Figura 8) ou depois (Fase 2, Figuras 9 e 10) do treinamento dos animais na tarefa. Ademais, esses resultados mostram que os animais lesados permanecem sensíveis à desvalorização do reforço por meio da imposição de um atraso (ou espera) entre a emissão da resposta e a liberação do reforço.

Os resultados mostram ainda que a reversão da contingência de reforço dos animais, envolvendo a inversão dos locais em que o maior reforço foi obtido, interferiu no desempenho dos animais lesados da mesma forma que o fez nos animais controle (Fase 3, Figuras 11 e 12). Mais ainda, os resultados mostraram que os animais com danos no

OFC são capazes de adequar-se às novas contingências de reforço tão rapidamente quanto os animais controle.

Os fatores que determinam a escolha numa tarefa intertemporal incluem a magnitude do reforço em associação com o atraso, isto é, o tempo decorrido desde a emissão da resposta de escolha até a liberação do reforço. Quando esse intervalo de tempo é pequeno há uma preferência pela emissão das respostas em direção a este local. Diferentemente, quando esse intervalo de tempo é relativamente grande, há uma diminuição na quantidade de respostas para o lado que leva a esse reforço. Assim, a tarefa permite identificar escolhas impulsivas, como quando os animais escolhem preferencialmente o local que leva a um reforço imediato, porém menor, em contraposição a escolherem um local que leva a um reforço maior, porém após um atraso (HAMILTON et al., 2015; WINSTANLEY, 2011).

Esses resultados estão em sintonia com os de estudos prévios que mostram que a lesão do córtex orbitofrontal, seja ela realizada pré-treino (KHERAMIN et al., 2002) ou pós-treino (ABELA; CHUDASAMA, 2013; JO et al., 2013; MARIANO et al., 2009), não afeta o desempenho da tarefa de escolhas intertemporais.

No estudo de ABELA, CHUDASAMA (2013), os animais com o OFC lesado **posteriormente ao treino** não apresentaram prejuízo no comportamento ao serem testados na tarefa de escolha intertemporal. Porém, os mesmos animais foram submetidos a uma tarefa de escolha com probabilidades. Nesta tarefa, eram apresentadas duas opções de escolha, i.e., 1 pelota de ração, com 100% de chance de ser entregue ou 4 pelotas de ração com diferentes chances de serem entregues, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%, que eram reduzidas após um determinado número de tentativas. Os resultados revelam que os animais com lesão do OFC, diferentemente dos animais controle, preferem **não correr riscos** (aversão ao risco), pois escolheram a opção que leva a 100% de certeza, mesmo quando esta não era vantajosa. Estes resultados estão em sintonia com os de outros estudos que utilizaram procedimentos semelhantes (KHERAMIN et al., 2003; MOBINI et al., 2002).

Ademais, o estudo de ABELA, CHUDASAMA (2013) também se propôs comparar, na tarefa de escolha intertemporal, os efeitos da lesão do hipocampo ventral com os

efeitos da lesão do OFC. Para isso, um grupo de animais foi treinado na tarefa de escolha intertemporal e posteriormente o hipocampo ventral foi lesado por meio de uma neurotoxina (NMDA). Os resultados apontam que a lesão do hipocampo ventral **acentuou** o *delay discounting*, direcionando as escolhas deste grupo para o reforço menor e imediato. Este resultado é semelhante ao do estudo de MARIANO et al (2009), que reportou efeito semelhante após lesão do hipocampo, mas não após lesão do OFC.

Embora o córtex pré-frontal conte com diferentes circuitos potencialmente envolvidos no processamento de parâmetros necessários para a tomada de decisão, os resultados do presente estudo sugerem que sua integridade não é requerida para o desempenho dessa função. Isto é, seu engajamento no *delay discounting* não parece necessário já que animais com danos na estrutura continuam exibindo esse comportamento. Esse resultado é confirmado por estudos prévios (MARIANO et al., 2009; RUSHWORTH et al., 2012; WIKENHEISER; SCHOENBAUM, 2016; WILSON et al., 2014). Assim, embora existam diferentes vias neuronais (tanto intrínsecas, quanto extrínsecas ao PFC) potencialmente responsáveis pela integração, valoração e comparação de diferentes custos e benefícios, com base nos resultados destes estudos, levanta-se a hipótese de que o OFC participaria de um circuito responsável pela devida integração, valoração e comparação de escolhas que envolvam riscos, mas não atrasos (ABELA; CHUDASAMA, 2013; PAIS-VIEIRA; LIMA; GALHARDO, 2007; RUDEBECK et al., 2006; WALTON et al., 2010).

Resultados de outros autores (ABELA; CHUDASAMA, 2013; CHEUNG; CARDINAL, 2005; MARIANO et al., 2009) mostram que a lesão do hipocampo gera prejuízo no comportamento quando as escolhas envolvem diferentes atrasos, sugerindo seu envolvimento no *delay discounting*. O mecanismo sugerido seria a memória prospectiva (dependente da integridade desta estrutura), que promoveria a visualização de ganhos futuros e a partir do fornecimento desta informação ao córtex pré-frontal, modular o *delay discounting* para baixo permitindo, assim, a escolha de uma gratificação tardia, o que favoreceria ganhos a longo prazo (ABELA; CHUDASAMA, 2013; HAMILTON et al., 2015; KWAN et al., 2015; MARIANO et al., 2009; PALOMBO; KEANE; VERFAELLIE, 2015; PETERS; BÜCHEL, 2010; WIKENHEISER; SCHOENBAUM, 2016).

Por outro lado, existem estudos descrevendo resultados conflitantes em relação aos do presente conjunto de experimentos, mostrando, por exemplo, que lesões pré-treino e pós-treino do OFC resultam em efeitos sobre o *delay discounting*, i.e., **acentuação** do *delay discounting* e consequente impulsividade (MAR et al., 2011; MOBINI et al., 2002; RUDEBECK et al., 2006; ZEEB; FLORESCO; WINSTANLEY, 2010); e **redução** do *delay discounting* e consequente redução da impulsividade (WINSTANLEY, 2004).

Mobini et al (2002) lesaram o OFC por meio da microinfusão de ácido quinolínico administrado **anteriormente ao treino** e observaram **acentuação do *delay discounting***. No presente estudo, utilizou-se NMDA para lesar o OFC e não houve alteração no desempenho dos animais. Hipoteticamente, o uso de diferentes neurotoxinas para induzir à lesão poderia, em parte, explicar a discrepância entre os resultados. Porém outros estudos (JO et al., 2013; KHERAMIN et al., 2002; MARIANO et al., 2009) também utilizaram ácido quinolínico para induzir lesão no OFC e não observaram alterações no desempenho dos animais. No estudo de MOBINI et al., 2002, foi evidenciado que a lesão não foi seletiva ao OFC, o córtex pré-límbico também foi lesado em grande parte dos animais (não é especificado pelos autores em quanto). Em nosso estudo, bem como em outros que apresentam resultados análogos ao nosso (JO et al., 2013; MARIANO et al., 2009), a lesão foi seletiva a toda a extensão do OFC, sendo evidenciado lesão de regiões circunvizinhas em apenas dois animais e em nenhum deles o córtex pré-límbico foi lesionado. Possivelmente poderia ser esta a origem da diferença entre nossos resultados.

No entanto, foi observado que lesões do córtex pré-límbico não causaram efeitos no comportamento em tarefas de escolhas intertemporais (CARDINAL, 2006). É sugerido que os efeitos observados no estudo de MOBINI et al., 2002 possam estar relacionados ao ascendimento de um LED, localizado acima da alavanca responsável pela entrega do maior reforço. Este LED permanecia aceso durante o período de espera para a entrega do reforço. Dessa forma, a presença de uma dica pode ser um fator que contribuiria para o recrutamento do OFC e sua lesão causaria prejuízos no comportamento nesta situação (CARDINAL, 2006). Diferentemente, não fornecemos dicas aos animais, logo, podemos ter replicado uma situação na qual o OFC não seria acionado.

RUDEBECK et al. (2006) mostraram que a **lesão pós-treino** do OFC **acentua o *delay discounting***. A lesão foi realizada por meio de microinfusões de ácido quinolínico, sendo seletiva ao OFC, não havendo morte celular em regiões vizinhas. O treinamento dos animais foi realizado utilizando um labirinto em T. Neste caso, o rato é posicionado no corredor principal o qual deve percorrer e, ao chegar ao seu final, decidir em qual dos dois braços entrar. Se entrar no braço esquerdo deve aguardar por 15.000 ms para que o portão se abra e a recompensa seja obtida (10 pelotas de ração). Caso entre no braço direito, é recompensado imediatamente com 1 pelota de ração. Apesar de utilizar uma neurotoxina diferente, a lesão no estudo de RUDEBECK et al., 2006 foi seletiva ao OFC como em nosso estudo e em outros (JO et al., 2013; MARIANO et al., 2009). Possivelmente um dos pontos de discrepância entre nossos estudos esteja na proporção de recompensa utilizada que é diferente. Preferência pelo menor reforço imediato é observada em estudos que fizeram uso das seguintes proporções 10:1 (RUDEBECK et al., 2006) e 2:1 (MOBINI et al., 2002), mas não em estudos com a proporção 4:1 (ABELA; CHUDASAMA, 2013; WINSTANLEY, 2004). A proporção utilizada em nosso estudo é de 4:1. Segundo CARDINAL, N. R., 2006, a sensibilidade do organismo tanto a proporção dos reforços, quanto ao tempo de espera (atraso) poderiam influenciar o comportamento. Dessa forma, a lesão pode causar diferentes efeitos dependendo da manipulação destes parâmetros.

Outro aspecto que hipoteticamente poderia ser levantado para explicar a discrepância nos resultados de nossos estudos envolve o aparelho experimental. No estudo de MARIANO et al. 2009, foi utilizado um labirinto em T para o treinamento dos ratos. Este se assemelha ao utilizado por RUDEBECK et al., 2006, porém a parede de cada um dos braços foi pintada com um padrão visual, a fim de diferenciar o reforço que continha. Cinza para o braço contendo o maior reforço com atraso e listrado de preto e branco para o braço que continha o menor reforço imediato. Em contrapartida, o labirinto utilizado por RUDEBECK et al., 2006 não possuía diferença na coloração do braço direito para o esquerdo, pois ambos eram pintados de cinza. Os resultados de MARIANO et al., 2009 apontam que não houve diferença no comportamento dos grupos, ou seja, a **lesão pós-treino** do OFC **não causou alterações no *delay discounting***. Segundo os autores,

a ausência de efeito observada em seu estudo, pode estar relacionada à saliência das dicas fornecidas. A pintura nos braços contendo cada reforço salienta a recompensa que este braço contém, pois está presente no momento da escolha, durante todo o *delay* para a entrega do reforço e quando a recompensa é recebida, diferentemente do estudo de RUDEBECK et al., 2006, em que os braços são pintados de cinza e os ratos possuem informações apenas sobre a direção a percorrer (MARIANO et al., 2009).

É possível que o OFC, como partícipe da integração de estímulos e memórias, mantenha uma representação da provável recompensa a ser obtida em situações em que a falta de informações dificulte a formação de associações entre as respostas emitidas e os resultados destas respostas (FUSTER, 2015; MARIANO et al., 2009), de forma que a lesão do OFC na tarefa espacial cause prejuízos (RUDEBECK et al., 2006), mas que estes não sejam observados na versão não-espacial da mesma tarefa (MARIANO et al., 2009). No paradigma experimental utilizado no presente estudo não há componente espacial tão explícito como o de RUDEBECK et al., 2006, e também não são apresentadas dicas explícitas sobre os reforços a serem oferecidos aos animais, como no estudo de MARIANO et al., 2009. Entretanto, nossos resultados corroboram com os MARIANO et al., 2009, possivelmente indicando que em tarefas de escolha intertemporal nas quais a emissão de respostas instrumentais seja necessária para obter-se a recompensa, a participação do OFC não seja necessária (ABELA; CHUDASAMA, 2013; KHERAMIN et al., 2002).

MAR et al. (2011) obtiveram resultados que indicam a **acentuação do *delay discounting*** quando a sub-região lateral do OFC é **lesada posteriormente ao treino**. Ademais, este estudo também apresentou resultados indicativos de prejuízo na flexibilidade comportamental após a lesão, pois os animais lesados foram mais lentos em recuperar seu desempenho pré-reversão. O aparelho experimental utilizado para treinar os animais é semelhante ao nosso. Os ratos foram treinados a pressionar alavancas para obter recompensas de diferentes tamanhos, 4 pelotas de ração após um determinado tempo de espera ou 1 pelota de ração imediatamente. O procedimento de reversão das alavancas também se assemelha ao nosso. Utilizamos a mesma neurotoxina para promover a morte celular, NMDA. A discrepância entre nossos resultados parece

relacionar-se à extensão da lesão produzida. Enquanto em nosso estudo a lesão abrange a totalidade do OFC, MAR et al., 2011 optaram em lesionar especificamente a subdivisão lateral do OFC, e sua análise histológica revela que a morte celular limitou-se a essa subdivisão. Um dos elementos que envolve a decisão é inibir a emissão de respostas previamente treinadas, portanto automatizadas, para possibilitar que a ação planejada seja emitida (KABLE; GLIMCHER, 2009; WINSTANLEY, 2011). Assim, é possível que os efeitos da lesão observados por MAR et al. (2011) reflitam ações impulsivas, caracterizadas por uma incapacidade do organismo de interromper uma ação previamente treinada. Sendo um indicativo de que a lesão do OFC lateral prejudicou o controle motor, de forma que os animais lesados não eram capazes de interromper prontamente a emissão de respostas na alavanca previamente utilizada extensivamente (STALNAKER; COOCH; SCHOENBAUM, 2015).

Entretanto, no estudo de ZEEB, FLORESCO e WINSTANLEY (2010), foram encontrados resultados que divergem dos apresentados por MAR et al., 2011. O procedimento adotado para treinar os ratos é semelhante ao estudo de MAR et al., 2011, bem como ao nosso. A estratégia de intervenção neurológica difere da nossa e da adotada por MAR et al., 2011. ZEEB, FLORESCO e WINSTANLEY, 2010, pois esses autores realizaram microinfusão de uma solução composta por Muscimol e Baclofen, i.e., agonistas de GABA-A e GABA-B, respectivamente, que se acredita levar a uma inativação temporária da estrutura infundida, assim como antagonistas dopaminérgicos. A análise histológica revela que o ponto de inserção das cânulas abrangeu em sua totalidade a subdivisão lateral do OFC. Os grupos experimentais foram organizados como se segue: grupo com dica visual e grupo sem dica visual. Ao escolher a alavanca que correspondia ao maior reforço, um LED era aceso acima da alavanca durante a duração do atraso e era apagada ao fim deste. Este processo de sinalizar a duração do atraso não ocorria para o grupo sem dica, que deveria se basear em experiência prévia para determinar o atraso vigente. Além da divisão “com dica” e “sem dica”, os animais foram separados em subgrupos mediante avaliação do seu nível de impulsividade basal, i.e., animais que escolhiam com maior frequência a maior recompensa durante os atrasos de

0 ms e 15.000 ms eram designados como “baixa impulsividade” e os que escolhiam com maior frequência a menor recompensa “alta impulsividade”.

Os resultados mostram que a inativação do OFC lateral causou uma redução na preferência pelo menor reforço imediato no grupo “alta impulsividade sem dica” e um aumento na preferência pelo menor reforço imediato no grupo “baixa impulsividade com dica”. A infusão de antagonistas dopaminérgicos aumentou a preferência pelo menor reforço imediato em ambos os grupos com dica (alta e baixa impulsividade). Segundo os autores, o efeito observado deve-se aos diferentes níveis de sensibilidade do organismo ao atraso. Dessa forma, animais com alta impulsividade basal do grupo com dica poderiam ser menos sensíveis ao significado da dica fornecida e, assim, incapazes de utilizá-la para influenciar o *delay discounting* (CARDINAL, 2006). Ademais, os sinais emitidos pelo OFC lateral destes animais podem ser pouco consistentes ou mais fracos, de forma que a tomada de decisão nestes casos seja atribuída a outras estruturas (ZEEB; FLORESCO; WINSTANLEY, 2010).

Para IZQUIERDO, 2017, o OFC lateral é uma das subdivisões do OFC menos explorada nos últimos anos, principalmente em sua relação com as escolhas intertemporais. O estudo de ZEEB, FLORESCO, WINSTANLEY, 2010 e de MAR et al., 2011 foram os mais relevantes a abordar os efeitos de manipulações seletivas desta subdivisão em tarefas de escolha intertemporal (IZQUIERDO, 2017). Devido a este fato, faltam-nos dados para entender como uma lesão menor e restrita a uma subdivisão do OFC causa efeitos sobre o comportamento e uma lesão maior e seletiva de toda a estrutura não o faz.

MAR et al., 2011 mostram que a **lesão pós-treino** restrita à subregião medial do OFC (mOFC) resulta em **atenuação do *delay discounting***, isto é, os animais escolhem o maior reforço com atraso; e não foi evidenciado prejuízos na flexibilidade comportamental deste grupo. Os procedimentos cirúrgicos e de treinamento são idênticos aos descritos no parágrafo acima. A análise histológica revela lesão seletiva da subdivisão medial do OFC, não sendo evidenciado morte celular em estruturas circunvizinhas. Existem propostas de que a região medial do PFC está envolvida em aspectos valorativos e comparativos de uma decisão; assim, não se descarta a

possibilidade de que esteja envolvida na integração e comparação das opções de escolha disponíveis (CARDINAL, 2006; IZQUIERDO, 2017). A lesão do OFC medial possivelmente prejudica a tomada de decisão, pois privaria o PFC de um sinal comparativo que aponte qual das opções é a melhor e assim o organismo estabeleceria uma estratégia mais simples, ou seja, escolheria a opção com maior quantidade de reforço (BASTEN et al., 2010; BENOIT; GILBERT; BURGESS, 2011; MAR et al., 2011). Ademais, segundo MAR et al., 2011, a flexibilidade comportamental não foi afetada nestes animais pois o OFC lateral estava preservado.

Esses resultados conflitam com os do presente estudo que mostraram que danos mais extensos do OFC não produzem qualquer alteração de desempenho da tarefa adquirida pré ou pós-operatoriamente. Entretanto, o estudo de STOPPER, GREEN e FLORESCO, 2014, realizou inativação temporária do OFC medial, por meio da injeção bilateral de 0.5 μ L de uma solução composta por muscimol e baclofen. A análise histológica revela que as cânulas foram inseridas com precisão no OFC medial. Os animais foram treinados em aparelhos semelhantes aos do nosso estudo e de MAR et al., 2011. Os resultados revelam que mesmo após inativação do OFC medial, os animais não apresentaram qualquer alteração comportamental, i.e., decidiam identicamente ao grupo controle. STOPPER, GREEN e FLORESCO, 2014, sugerem que a possível discrepância entre seus resultados e os de MAR et al., 2011 podem estar relacionados ao tempo de treinamento dos animais. MAR et al., 2011 mostraram ausência de diferenças entre o grupo lesado e o controle em um período de 6 dias, imediatamente após o início do retreino na tarefa. Porém é observado o surgimento de diferenças entre os grupos no período entre os dias 14 e 18 de retreino. No estudo de STOPPER, GREEN e FLORESCO, 2014, a inativação do OFC medial é realizada em um período inferior a 10 dias de retreino após a cirurgia de inserção das cânulas; semelhantemente, o nosso grupo experiente lesado, passou por apenas 10 dias de retreino na tarefa. Assim, não se pode descartar a possibilidade de que a ausência de efeitos da lesão tenha relação com o reduzido tempo de retreino em relação ao esperado para o surgimento do prejuízo.

Estes efeitos observados podem ser indicativos de que a função do OFC medial influencie a tomada de decisão intertemporal a longo prazo e não a curto prazo

(IZQUIERDO, 2017; STOPPER; GREEN; FLORESCO, 2014). Sendo interessante ressaltar que apesar de nosso grupo ingênuo lesado ter sido submetido a 25 sessões de treinamento na tarefa, nenhum efeito é observado neste período que, segundo STOPPER, GREEN e FLORESCO 2014, seria tempo suficiente para algum efeito de lesão do OFC medial surgir.

WINSTANLEY (2004) mostrou que a **lesão pós-treino** do OFC promoveu a **atenuação do *delay discounting***. Assim como em nosso trabalho, a lesão neurotóxica do OFC almejou toda a estrutura, com diferença para o agente químico utilizado, que foi o ácido quinolínico. A principal diferença entre o presente estudo e o de WINSTANLEY (2004) encontra-se na forma como o treino dos animais foi realizado. O treinamento pré-operatório teve duração de 35 sessões, em cada uma delas eram apresentados dois reforços diferentes em quantidade, 1 pellet ou 4 pellets, porém sem diferenças em seu tempo de entrega, i.e., todos eram entregues imediatamente. Em sessões posteriores de pré-treino, o tempo de espera para entrega do maior reforço foi sendo aumentado a cada bloco de tentativa (0 ms, 10.000 ms, 20.000 ms, 40.000 ms e 60.000 ms). Em nosso estudo, o treinamento pré-operatório do grupo LE consistiu em apenas 15 sessões, mas uma diferença importante deve ser ressaltada: em todas as sessões de treino pré-operatório os animais eram expostos a reforços com magnitudes diferentes (1 pellet e 4 pellets) e diferentes atrasos (0 ms para o menor reforço, e 0 ms, 1.000 ms, 3.000 ms e 5.000 ms para o maior reforço). Outro fator importante é a presença de uma etapa de reversão das contingências de reforço, que nos permitiu analisar a flexibilidade comportamental, diferentemente do estudo de WINSTANLEY (2004) que não o fez.

WINSTANLEY (2004) sugeriu que o extenso treino pré-operatório sem tempo de espera fez com que os animais aprendessem qual alavanca dispensava qual reforço (i.e., alavanca A, 1 pellet, e alavanca B, 4 pellets) de maneira que após a lesão os animais tiveram prejuízos em modular sua escolha baseando-se no tempo de espera. A ideia subjacente a esta interpretação é que o OFC possuiria um papel na flexibilidade comportamental, por estar envolvido na revisão da relevância de uma resposta que levou à obtenção de uma recompensa. Ou seja, se o OFC estivesse intacto, provavelmente sinalizaria para outras regiões nervosas que o pressionar da alavanca B não gera o

resultado esperado de entregar 4 pellets **imediatamente** (como ocorria na situação pré-operatória); ao contrário, agora, devido a mudanças nas contingências da tarefa, a escolha da alavanca B resultaria na liberação de 4 pellets, porém após um período de espera (WINSTANLEY, 2004).

A discrepância entre nossos estudos parece relacionar-se com a duração e a forma como o treino pré-operatório foi realizado. Possivelmente a exposição dos animais aos contingentes por 15 sessões é tempo suficiente para que aprendam sobre estes e os utilizem adequadamente em uma estratégia de escolha, tendo em vista que ao analisarmos a Fase 1 do experimento (Fig. 8) as diferenças entre sessões desaparecem a partir da oitava sessão, indicando que todos os grupos estabilizaram seu comportamento. Segundo RUDEBECK et al 2006, o treinamento extensivo pode modular o recrutamento de outras regiões no processo de aprendizado da tarefa, sendo sugerido que ao treinar os animais sem a presença dos atrasos, o núcleo basolateral da amígdala pode ter codificado fortemente a associação entre cada uma das alavancas e seus respectivos reforços, e posteriormente este processo dificultaria a flexibilidade comportamental, que se apresentaria ainda mais debilitada devido à lesão do OFC. Em nosso caso, possivelmente, ao treinarmos com todos os atrasos presentes desde o início das sessões pré-treino, podemos ter criado um contexto no qual o núcleo basolateral da amígdala não seria recrutado para codificar estas associações.

No presente conjunto de experimentos, a recuperação do desempenho durante a fase de reversão dos animais com danos no OFC não diferiu da exibida pelos animais controle. Este resultado confirma os resultados de outros estudos mostrando que a lesão do OFC não prejudica a flexibilidade comportamental quando a reversão da contingência de reforço envolve a inversão do local em que o reforço de diferentes magnitudes é obtido. Em outras palavras, quando apenas o local de liberação do reforço é invertido, o OFC não parece necessário para a readequação do comportamento (WALTON et al., 2010; WIKENHEISER; SCHOENBAUM, 2016).

Ademais, MAR et al., 2011 evidenciaram que a lesão pós-treino e seletiva de todo o OFC promovia acentuação do *delay discounting*, apenas nas sessões iniciais após a lesão. A estratégia de lesão bem como a de treinamento são semelhantes tanto a de

WINSTANLEY, 2004 e da empregada no presente estudo. A análise histológica, no entanto, revela que a lesão foi seletiva ao OFC, sendo poupado em diferentes graus nas subdivisões medial, ventral e dorsolateral, diferentemente de nosso estudo e do de WINSTANLEY, 2004 em que a lesão seletiva do OFC abrangeu toda a estrutura de maneira satisfatória. O estudo de MAR et al., 2011 realizou 27 sessões de pré-treino nos ratos, o modo como o treinamento que foi realizado se assemelha ao de nosso estudo, ou seja, todas as sessões pré-treino possuíam os reforços com diferentes tempos de entrega. Esses autores mostraram que após a lesão evidenciou-se que o *delay discounting* se acentuou nos animais lesados da sessão 28 (imediatamente após a lesão) até a sessão 33. A análise das sessões 38 até a 43 revelou que o efeito de *delay discounting* já não era mais evidenciado no grupo lesado, este se comportava identicamente ao controle. MAR et al., 2011 propõem que a normalização do *delay discounting* após treino pós-lesão extensivo deve-se ao funcionamento de outras estruturas como o núcleo basolateral da amígdala.

Em nosso estudo, realizamos menor número de sessões pré-treino do que o estudo de MAR et al., 2011, e treinamos os animais de forma semelhante ao seu estudo, porém, não evidenciamos alterações no comportamento. Hipoteticamente, a discrepância entre nossos estudos pode estar relacionada à quantidade de sessões pré-treino realizadas. Possivelmente não realizamos sessões suficientes para a lesão apresentar algum efeito em nossos animais.

No estudo de KHERAMIN et al. (2003), a **lesão pré-treino** do OFC com ácido quinolínico almejou a destruição de toda a estrutura. Os autores relatam que a lesão causou perda celular em toda a porção ventral e lateral, estendendo-se também para as subregiões mediais e dorsolaterais, apesar de não ter causado morte celular extensa nessas duas últimas. No presente conjunto de experimentos, os danos, induzidos pela microinfusão de NMDA, assemelham-se aos relatados por Kheramin et al. (2003). Mesmo assim, os resultados comportamentais diferem substancialmente. Enquanto Kheramin et al. (2003) relatam que a **lesão pré-treino** causou **atenuação no *delay discounting***, nossos resultados não detectaram alterações dignas de nota. É possível que essa discrepância esteja relacionada com substancial diferença entre as metodologias de

treino empregadas nesses estudos. No estudo de Kheramin et al. (2003), as manipulações foram organizadas em 6 fases, com 80 sessões na Fase 1, 40 sessões nas Fases 2 a 5, e 60 sessões na Fase 6. Os atrasos foram adicionados na passagem de uma fase para outra. Isto é, os animais escolhiam entre dois reforços, “A” e “B”. Se escolhessem “A”, tinham 50% de chance de receber 1 pellet de ração após 1.000 ms, 2.000 ms, 4.000 ms, 8.000 ms, 12.000 ms, e 500 ms de espera. Este tempo era fixo durante todas as tentativas daquela sessão e era aumentado ao se mudar de fase, i.e., 1.000 ms na Fase 1 e 2000 ms na Fase 2. Se optassem por “B”, tinham 100% de chance de receber 1 pellet de ração após um determinado tempo de espera, que sofria acréscimos durante a sessão de treinamento, i.e., 1.000 ms no bloco 1 de tentativas, 1.750 ms no bloco 2 de tentativas. Sempre sendo garantido que durante o primeiro bloco de tentativas o atraso de “A” fosse igual ao de “B”. Ao mudar-se de fase, os atrasos crescentes de “B” recebiam um acréscimo, ou seja, se na Fase 1 bloco 1 o atraso era 1.000 ms, na Fase 2 bloco 1 o atraso seria 2.000 ms. Os resultados mostraram que os animais com o OFC lesado escolhiam mais o reforço “B”.

A discrepância entre nossos estudos pode estar relacionada à forma pela qual os reforços foram manipulados. No presente estudo, os reforços diferenciavam-se apenas em relação a sua magnitude e tempo entre a emissão de uma resposta e sua entrega. KHERAMIN et al., 2003 adicionam o fator probabilidade como uma das diferenças e a tarefa assume um caráter diferenciado da intertemporal. O resultado apresentado por KHERAMIN et al (2003) seria melhor explicado pelo envolvimento do OFC na função de “*probabilistic discounting*”, ou seja, a desvalorização de um reforço em decorrência da menor probabilidade de obtê-lo, e não por alterações no *delay discounting*. Ao observar-se que os animais lesados escolhem mais o reforço “B” do que o reforço “A”, estes resultados estão em sintonia com outros estudos que, ao exporem animais com o OFC lesado em situações com diferentes probabilidades, evidenciaram a preferência destes aos reforços com maior chance de serem obtidos, o que foi descrito como uma aversão ao risco (ABELA; CHUDASAMA, 2013; MOBINI et al., 2002).

Não se descarta a possibilidade de que ao utilizarem múltiplos parâmetros que devem ser valorados durante a decisão (quantidade, tempo de espera e probabilidade)

em uma única tarefa, Kheramin et al. (2003) dificultaram a associação do efeito da lesão especificamente a prejuízos no *delay discounting*.

Há controvérsias sobre a participação do OFC nos processos de tomada de decisões, particularmente no que se refere ao *delay discounting*, em que há interposição de um atraso (ou espera) entre a resposta e a liberação do reforço. Diversos estudos indicam que danos ou inativação do OFC levam a uma **atenuação** no *delay discounting*, ou seja, os animais ficam mais **tolerantes** ao atraso (MAR et al., 2011; WINSTANLEY, 2004; ZEEB; FLORESCO; WINSTANLEY, 2010); outros estudos sugerem uma **acentuação** no *delay discounting*, ou seja, evidenciam **intolerância** ao atraso, também sendo referido como **impulsividade** (MAR et al., 2011; MOBINI et al., 2002; RUDEBECK et al., 2006; ZEEB; FLORESCO; WINSTANLEY, 2010)

Os resultados do presente conjunto de experimentos somam-se aos de estudos que mostram ausência de qualquer efeito de danos no OFC sobre o desempenho de tarefa de tomada de decisões envolvendo *delay discounting* (ABELA; CHUDASAMA, 2013; JO et al., 2013; KHERAMIN et al., 2002; MARIANO et al., 2009), mostrando, adicionalmente, que essa ausência de alterações independe do momento da indução do dano, i.e., antes ou depois do treinamento dos animais na tarefa de tomada de decisões envolvendo *delay discounting*.

6. Conclusão

Os resultados do presente conjunto de experimentos sugerem que o OFC não é necessário para o desempenho da função de *delay discounting*. Esse resultado independe do treinamento ter sido executado na presença (lesão pós-treino) ou ausência (lesão pré-treino) da estrutura. Em outras palavras, os animais não apresentaram prejuízos em seu comportamento na tarefa de escolha intertemporal, o que nos faz considerar que possivelmente o OFC intacto não seja necessário para a execução do comportamento neste contexto.

7. Referências Bibliográficas

ABELA, A. R.; CHUDASAMA, Y. Dissociable contributions of the ventral hippocampus and orbitofrontal cortex to decision-making with a delayed or uncertain outcome. **European Journal of Neuroscience**, 2013.

ARNSTEN, A. F. T. Ameliorating prefrontal cortical dysfunction in mental illness: inhibition of phosphatidylinositol-protein kinase C signaling. **Psychopharmacology**, v. 202, n. 1–3, p. 445–455, 22 jan. 2009.

BASTEN, U. et al. How the brain integrates costs and benefits during decision making. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 50, p. 21767–21772, 14 dez. 2010.

BECHARA, A. et al. Deciding advantageously before knowing the advantageous strategy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 275, n. 5304, p. 1293–5, 28 fev. 1997.

BECHARA, A.; DAMASIO, H.; DAMASIO, A. R. Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 10, n. 3, p. 295–307, 15 mar. 2000.

BENOIT, R. G.; GILBERT, S. J.; BURGESS, P. W. A Neural Mechanism Mediating the Impact of Episodic Prospection on Farsighted Decisions. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 18, p. 6771–6779, 4 maio 2011.

BRODAL, P. **The Central Nervous System: Structure and Function**. 4 ed. ed. [s.l.] Oxford University Press, 2010.

CARDINAL, R. N. Neural systems implicated in delayed and probabilistic reinforcement. **Neural Networks**, v. 19, n. 8, p. 1277–1301, 2006.

CATANI, M. et al. Short frontal lobe connections of the human brain. **Cortex**, v. 48, n. 2, p. 273–291, fev. 2012.

CHEUNG, T. H. C.; CARDINAL, R. N. Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. **BMC neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 36, 13 maio 2005.

DAMASIO, A. R. **E O CEREBRO CRIOU O HOMEM**. 1. ed. [s.l.: s.n.].

FLORESCO, S. B.; TSE, M. T.; GHODS-SHARIFI, S. Dopaminergic and Glutamatergic Regulation of Effort-and Delay-Based Decision Making. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 1966–1979, 2008.

FUSTER, J. The Prefrontal Cortex, (2015). **The Prefrontal Cortex**, p. i–v, 2015.

FUSTER, J. M. Distributed Memory for Both Short and Long Term. **NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY**, v. 70, p. 268–274, 1998.

GOLD, J. I.; SHADLEN, M. N. The Neural Basis of Decision Making. **Annual Review of Neuroscience**, v. 30, n. 1, p. 535–574, jul. 2007.

HAMILTON, K. R. et al. Choice Impulsivity: Definitions, Measurement Issues, and Clinical Implications. **Association**, v. 6, n. 2, p. 182–198, 2015.

HEEKEREN, H. R. et al. Influence of bodily harm on neural correlates of semantic and moral decision-making. **NeuroImage**, v. 24, n. 3, p. 887–897, fev. 2005.

HEEKEREN, H. R.; MARRETT, S.; UNGERLEIDER, L. G. The neural systems that mediate human perceptual decision making. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 6, p. 467–479, 9 jun. 2008.

HO, M. Y. et al. Theory and method in the quantitative analysis of “impulsive choice” behaviour: implications for psychopharmacology. **Psychopharmacology**, v. 146, n. 4, p. 362–72, out. 1999.

IZQUIERDO, A. Functional Heterogeneity within Rat Orbitofrontal Cortex in Reward Learning and Decision Making. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 44, p. 10529–10540, 2017.

JO, S. et al. Effect of orbitofrontal cortex lesions on temporal discounting in rats. **Behavioural Brain Research**, 2013.

KABLE, J. W.; GLIMCHER, P. W. The Neurobiology of Decision: Consensus and Controversy. **Neuron**, v. 63, n. 6, p. 733–745, set. 2009.

KHERAMIN, S. et al. Effects of quinolinic acid-induced lesions of the orbital prefrontal cortex on inter-temporal choice: A quantitative analysis. **Psychopharmacology**, 2002.

KHERAMIN, S. et al. Role of the orbital prefrontal cortex in choice between delayed and uncertain reinforcers: A quantitative analysis. **Behavioural Processes**, 2003.

KWAN, D. et al. Cueing the personal future to reduce discounting in intertemporal choice: Is episodic prospection necessary? **Hippocampus**, v. 25, n. 4, p. 432–443, abr. 2015.

LEE, D.; SEO, H.; JUNG, M. W. Neural Basis of Reinforcement Learning and Decision Making. **Annual Review of Neuroscience**, v. 35, n. 1, p. 287–308, 21 jul. 2012.

LUCANTONIO, F. et al. Neural Estimates of Imagined Outcomes in Basolateral Amygdala Depend on Orbitofrontal Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 50, p. 16521–16530, 16 dez. 2015.

MAR, A. C. et al. Dissociable Effects of Lesions to Orbitofrontal Cortex Subregions on Impulsive Choice in the Rat. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 17, p. 6398–6404, 27 abr. 2011.

MARIANO, T. Y. et al. Impulsive choice in hippocampal but not orbitofrontal cortex-lesioned rats on a nonspatial decision-making maze task. **European Journal of**

Neuroscience, 2009.

MAZUREK, M. E. et al. A role for neural integrators in perceptual decision making. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 13, n. 11, p. 1257–69, nov. 2003.

MEDALLA, M.; BARBAS, H. The Anterior Cingulate Cortex May Enhance Inhibition of Lateral Prefrontal Cortex Via m2 Cholinergic Receptors at Dual Synaptic Sites. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 44, p. 15611–15625, 31 out. 2012.

MILLER, E. K.; COHEN, J. D. An integrative theory of prefrontal cortex function. **Annual review of neuroscience**, v. 24, p. 167–202, 2001.

MOBINI, S. et al. Effects of lesions of the orbitofrontal cortex on sensitivity to delayed and probabilistic reinforcement. **Psychopharmacology**, 2002.

MONTAGUE, P. R.; BERNIS, G. S. Neural Economics and the Biological Substrates of Valuation. **Neuron**, v. 36, n. 2, p. 265–284, out. 2002.

PAIS-VIEIRA, M.; LIMA, D.; GALHARDO, V. Orbitofrontal cortex lesions disrupt risk assessment in a novel serial decision-making task for rats. **Neuroscience**, 2007.

PALOMBO, D. J.; KEANE, M. M.; VERFAELLIE, M. The medial temporal lobes are critical for reward-based decision making under conditions that promote episodic future thinking. **Hippocampus**, v. 25, n. 3, p. 345–53, mar. 2015.

PEARSON, J. M.; WATSON, K. K.; PLATT, M. L. **Decision making: The neuroethological turn** **Neuron**, 2014.

PETERS, J.; BÜCHEL, C. Episodic Future Thinking Reduces Reward Delay Discounting through an Enhancement of Prefrontal-Mediotemporal Interactions. **Neuron**, v. 66, n. 1, p. 138–148, abr. 2010.

RANGEL, A.; CAMERER, C.; MONTAGUE, P. R. A framework for studying the neurobiology of value-based decision making. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 545–556, 11 jul. 2008.

ROITMAN, J. D.; ROITMAN, M. F. Risk-preference differentiates orbitofrontal cortex responses to freely chosen reward outcomes. **European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 8, p. 1492–1500, abr. 2010.

RUDEBECK, P. H. et al. Separate neural pathways process different decision costs. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 9, p. 1161–1168, 20 set. 2006.

RUSHWORTH, M. F. S. et al. **Frontal Cortex and Reward-Guided Learning and Decision-Making** *Neuron*, 2011.

RUSHWORTH, M. F. S. et al. **Valuation and decision-making in frontal cortex: One or many serial or parallel systems?** *Current Opinion in Neurobiology*, 2012.

SCHOENBAUM, G.; ROESCH, M. **Orbitofrontal cortex, associative learning, and expectancies** *Neuron*, 2005.

STALNAKER, T. A.; COOCH, N. K.; SCHOENBAUM, G. What the orbitofrontal cortex does not do. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 5, p. 620–627, 28 abr. 2015.

STOPPER, C. M.; GREEN, E. B.; FLORESCO, S. B. Selective involvement by the medial orbitofrontal cortex in biasing risky, but not impulsive, choice. **Cerebral Cortex**, v. 24, n. 1, p. 154–162, 2014.

WALLIS, J. D. From Rule to Response: Neuronal Processes in the Premotor and Prefrontal Cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 90, n. 3, p. 1790–1806, 7 maio 2003.

WALLIS, J. D. Orbitofrontal Cortex and Its Contribution to Decision-Making. **Annual Review of Neuroscience**, v. 30, n. 1, p. 31–56, jul. 2007.

WALTON, M. E. et al. Separable Learning Systems in the Macaque Brain and the Role of Orbitofrontal Cortex in Contingent Learning. **Neuron**, 2010.

WIKENHEISER, A. M.; SCHOENBAUM, G. Over the river, through the woods: cognitive maps in the hippocampus and orbitofrontal cortex. **Nature Publishing Group**, v. 17, 2016.

WILSON, R. C. et al. Orbitofrontal cortex as a cognitive map of task space. **Neuron**, 2014.

WINSTANLEY, C. A. Contrasting Roles of Basolateral Amygdala and Orbitofrontal Cortex in Impulsive Choice. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 20, p. 4718–4722, 19 maio 2004.

WINSTANLEY, C. A. et al. Lesions to the subthalamic nucleus decrease impulsive choice but impair autoshaping in rats: The importance of the basal ganglia in Pavlovian conditioning and impulse control. **European Journal of Neuroscience**, 2005.

WINSTANLEY, C. A. et al. Double dissociation between serotonergic and dopaminergic modulation of medial prefrontal and orbitofrontal cortex during a test of impulsive choice. **Cerebral Cortex**, 2006.

WINSTANLEY, C. A. The utility of rat models of impulsivity in developing pharmacotherapies for impulse control disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1301–1321, out. 2011.

WOOD, J. N.; GRAFMAN, J. Human prefrontal cortex: processing and representational perspectives. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 139–147, fev. 2003.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5th. ed. [s.l: s.n.].

ZEEB, F. D.; FLORESCO, S. B.; WINSTANLEY, C. A. Contributions of the orbitofrontal cortex to impulsive choice: Interactions with basal levels of impulsivity, dopamine signalling, and reward-related cues. **Psychopharmacology**, 2010.

ZHOU, Y. DI; ARDESTANI, A.; FUSTER, J. M. Distributed and associative working memory. **Cerebral Cortex**, 2007.