

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular - LaNeC**

**Avaliação dos efeitos de diferentes esquemas de reforçamento  
e suas relações com parâmetros colinérgicos centrais no  
processo de extinção de um aprendizado espacial**

**Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de  
Especialização em Neurociência  
e suas Interfaces da  
Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Especialista  
em Neurociências**

**Guilherme Alves Farnezi**

**Orientadora: Polliana Toledo Nunes- Doutoranda do Programa de Pós Graduação em  
Neurociências  
Supervisora: Prof<sup>a</sup>. Ângela Maria Ribeiro**

**Belo Horizonte  
2015**

043

Farnezi, Guilherme Alves.

Avaliação dos efeitos de diferentes esquemas de reforçamento e suas relações com parâmetros colinérgicos centrais no processo de extinção de um aprendizado espacial. – 2015.

29f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Polliana Toledo Nunes. Supervisora: Ângela Maria Ribeiro. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Especialização em Neurociência e suas Interfaces da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Neurociências.

1. Comportamento - Avaliação - Teses. 2. Aprendizagem - Aspectos fisiológicos - Teses. 3. Memória - Teses. 4. Esquemas de reforçamento. 5. Sistema colinérgico. 6. Neurociências - Teses. I. Nunes, Polliana Toledo. II. Ribeiro, Ângela Maria. III. Universidade Federal de Minas Gerais. IV. Título.

CDU: 612.8

## Sumário

1. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS .....	4
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....	15
3. OBJETIVOS .....	16
3.1. Geral .....	16
3.2. Específicos .....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	17
4.1 Delineamento Experimental .....	17
4.2 Testes Comportamentais .....	18
4.3 Estudos Bioquímicos .....	21
4.4 Análise Estatística .....	22
4.5 Viabilidades do projeto .....	23
5. CRONOGRAMA .....	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- (ACh) acetilcolina  
(AChE) acetilcolinesterase  
(CaCl<sub>2</sub>) cloreto de cálcio  
(d1) primeiro minuto do índice de extinção  
(d2) segundo minuto do índice de extinção  
(EC) estímulo condicionado  
(EI) estímulos incondicionados  
(EI) índice de extinção  
(EN) estímulo neutro  
(GC) grupo controle  
(GCC) grupo controle reforço contínuo  
(GCI) grupo controle reforço intermitente  
(GRC) grupo de animais com reforço contínuo  
(GRI) grupo de animais com reforço intermitente  
(KCl) cloreto de potássio  
(LAM) Labirinto Aquático de Morris  
(LaNec) Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular  
(MgCl<sub>2</sub>) cloreto de magnésio  
(NaCl) cloreto de sódio  
(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) fosfato monossódico  
(NaHCO<sub>3</sub>) bicarbonato de sódio  
(NE) nordeste  
(NO) noroeste  
(RI) respostas incondicionadas  
(SE) sudeste  
(SNC) sistema nervoso central  
(SNP) sistema nervoso periférico  
(SO) sudoeste  
(T) tentativas  
(UFMG) Universidade Federal de Minas Gerais

## CONSIDERAÇÃO INICIAL:

**O presente trabalho foi elaborado na forma de um Projeto de Pesquisa a ser desenvolvido como pré-requisito de um Curso de Mestrado. A modalidade na forma de um projeto, do *Trabalho de Conclusão de Curso*, foi escolhida entre as opções apresentadas no Regulamento do Curso de Especialização em Neurociências e suas Interfaces da Universidade Federal de Minas Gerais. Exceto no tamanho do texto, o formato do mesmo segue as orientações sugeridas pelo Colegiado do Programa de Pos-graduação Neurociências da UFMG, para submissão ao processo seletivo para o mestrado.**

### 1. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

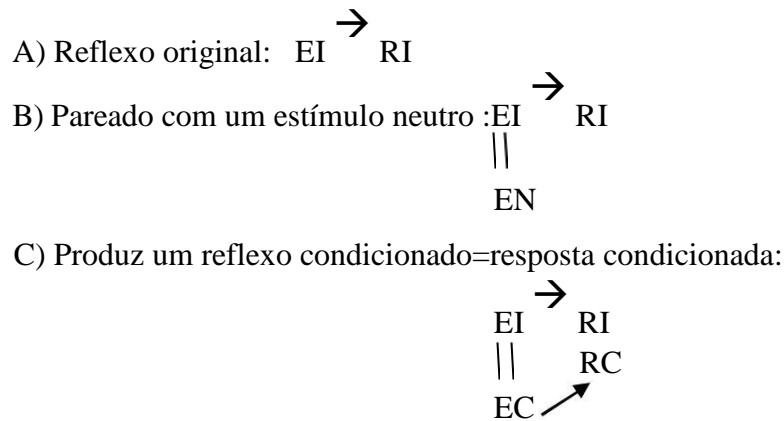
A extinção é um novo aprendizado que inibe uma resposta anteriormente estabelecida, não sendo um simples mecanismo para eliminar um comportamento ou um fenômeno de esquecimento. A aprendizagem e a memória estão intimamente relacionadas, não existindo um sem o outro (Ebbinghaus H, 1985, Berti, 2011). Seguindo esse pensamento, as memórias extintas se mantem armazenadas de forma latente, podendo ser evocadas por estímulo em alguma situação ou contexto (Druzian, 2013; Furlong e cols., 2015).

A extinção envolve os conceitos de aprendizagem e memória que são processos fundamentais do sistema nervoso central (SNC). A aprendizagem consiste na modificação do comportamento de acordo com a natureza das experiências vivenciadas pelos animais (McGauch, 1966). Essas alterações comportamentais, observadas durante o processo de aprendizagem, se devem à plasticidade neuronal, relacionada à capacidade que os indivíduos têm de se adaptar e modificar o comportamento, quando expostos a novas experiências e diferentes ambientes (Ramón e Cajal, 1911). Portanto, alterações no comportamento – a aprendizagem - estão associadas com modificações no próprio sistema nervoso, denominadas plasticidade neuronal, tendo um papel fundamental na sobrevivência da espécie (Pavlov, 1927). A interação entre sistema nervoso periférico (SNP), SNC e ambiente resulta na organização de comportamentos simples ou complexos que podem modificar tanto o ambiente como o próprio sistema nervoso (Ferrarie cols., 2001). Segundo Ferrari e colaboradores (2001), uma vez que

pressões ambientais determinam mudanças no comportamento, essas mesmas pressões também determinam alterações na forma, no tamanho e nas funções do sistema nervoso. Essas interferências ambientais tem a capacidade de modificar o cérebro e moldá-lo produzindo respostas plásticas, na forma de novas conexões neuronais ou reforçamentos das conexões neuronais pré-existentes, que podem permanecer durante longos períodos ou por toda a vida (Ramón e Cajal, 1911; Miranda-Neto e cols., 2002; Fernandes, 2007; Berti, 2011). Se essas alterações estiverem associadas com mudanças de comportamento, pode-se considerar que constituem formas de aprendizagens.

Existem diversas formas de ocorrer uma aprendizagem, que podem ser categorizadas em aprendizagem não associativa e associativa (condicionamentos). Dentre as categorias de aprendizagem não associativa, podemos destacar a aprendizagem por habituação, que consiste em uma queda da resposta por uma repetição de um determinado estímulo (Groves e Thompson, 1969; Thompson e Spencer, 1966), e também a aprendizagem pela sensibilização, onde estímulos repetitivos, que não afetavam o organismo, passam a afetar depois do mesmo ter sido sensibilizado por um estímulo prévio de alta intensidade (Groves e Thompson, 1969; Sato, 1995). Entre as formas de aprendizagem associativas destacamos o condicionamento clássico e o condicionamento operante.

O condicionamento clássico proposto por Pavlov (1927) está relacionado ao comportamentos reflexos. Chama-se reflexo a relação de um estímulo que necessariamente desencadeia uma resposta em um organismo, estando o estímulo e a resposta interligados por uma determinação genética (Pavlov, 1927). Pavlov (1927) estudou uma forma de aprendizagem que faz com que estímulos, denominados neutros, pois não eliciam uma resposta do organismo, passassem a ter o mesmo papel daqueles estímulos que eliciam as respostas reflexas. Essas respostas, por serem reflexas são denominadas respostas incondicionadas (RI) e os estímulos que as eliciam são denominados estímulos incondicionados (EI). No estudo de Pavlov, um estímulo neutro (EN) foi emparelhado com um EI, tornando o EN em um estímulo condicionado (EC), ou seja, um estímulo que anteriormente era um EN (não desencadeava uma resposta) passava a eliciar uma resposta que antes era eliciada por um EI. Em outras palavras, um EN, que não elicia resposta, quando ocorre momentos antes de um EI passa gradativamente a eliciar uma RC. Na figura 01 está apresentado o modelo desse tipo de aprendizado: condicionamento clássico.



**Figura 01: Modelo de Condicionamento Clássico.** A) representa um estímulo incondicionado eliciando uma resposta incondicionada (RI), ou seja, uma resposta reflexa. B) representa o momento de emparelhamento de um estímulo incondicionado (EI) com um estímulo neutro (EN), que antecede o EI. C) representa o emparelhamento do EI com o EN, tornando EN um estímulo condicionado (EC) tendo a função de eliciar uma resposta condicionada (RC).

O processo de extinção, neste tipo de aprendizagem, ocorre com o rompimento da relação do EC com o EI, através da repetição do estímulo condicionado sozinho, sem pareamento. Com o tempo o organismo passa a não responder ao EC, ocorrendo a extinção do comportamento (Pavlov, 1927; Chan e cols., 2010).

Enquanto o condicionamento clássico está relacionado com os comportamentos reflexos, *respostas eliciadas*, o condicionamento operante analisa o comportamento como uma interação das consequências produzidas entre a relação organismo e ambiente, constituindo uma aprendizagem de *emissão de resposta*, ou seja, não são eliciadas de forma reflexas. Deste modo, o animal tem a capacidade de modificar um determinado ambiente através de suas respostas e ser modificado pelas consequências produzidas pela resposta (Skinner, 2003; Moreira, 2013). Quando essas consequências diminuem a probabilidade de um comportamento ocorrer denomina-se “punição” e quando as consequências produzidas aumentam a probabilidade do comportamento de um organismo ocorrer, denominam-se “reforços” (Skinner, 2003; Moreira, 2013; Martin e Pear, 2009; Caballo, 2007).

Denomina-se punição, quando a consequência de uma resposta leva a uma diminuição da probabilidade dessa resposta ocorrer. O reforço responsável por esse tipo de resposta, que diminui a probabilidade da mesma acontecer é chamado de estímulo punitivo (Catania, 1999; Skinner, 2003). A punição pode ser classificada como punição positiva ou punição negativa. A punição positiva consiste na apresentação ou acréscimo de estímulos no ambiente que tem características aversivas diminuindo a frequência de uma resposta. Como por exemplo, se uma resposta de pressão de barra tiver como consequência um choque, e esse choque fizer o animal diminuir a frequência de pressionar a barra, essa consequência pode ser denominado de punição positiva. A punição negativa consiste em uma remoção de um estímulo com características agradáveis – apetitivo - após a emissão de uma determinada resposta. Por exemplo, o rato pressionar uma barra e em seguida a consequência é a retirada de sua comida ou água. Caso isso diminua a frequência do animal pressionar a barra, essa consequência é denominada de punição negativa (Catania, 1999; Skinner, 2003).

Os reforços, ao contrário da punição, aumentam a frequência de ocorrência de um determinado comportamento. Os reforços podem ser classificados como positivo ou negativo, dependendo das suas características. Os reforços positivos consistem na apresentação ou acréscimo de estímulos no ambiente, como por exemplo, alimento, água, ou contato sexual. Quando esses estímulos aumentam a probabilidade de que uma resposta ocorra com maior frequência, se diz que um comportamento foi fortalecido. Por outro lado, os reforços negativos estão ligados à retirada de algum estímulo aversivo, como por exemplo, algum barulho alto, luz forte, calor, frio ou choque elétrico. No reforço negativo os animais se comportam para fugir ou se esquivar de uma situação aversiva (Catania,1999; Skinner,1982; Skinner,2003). Resumindo, no reforço (consequência) uma resposta deve ser sucedida por um estímulo que faz com que o comportamento se repita novamente, e isso acontece tanto no reforço positivo quanto no reforço negativo. Entretanto, a diferença fundamental entre eles são que no reforço positivo a resposta do animal produz um estímulo no ambiente e no reforço negativo a resposta retira um estímulo aversivo do ambiente (Catania,1999; Skinner,1982; Skinner, 2003).

Além das consequências produzidas pelas respostas do animal, podendo ser um reforço ou punição, outra variável que pode alterar o modo com que o animal se comporta é a forma com que o reforço é apresentado. O modo ou esquema dessa apresentação exerce controle sobre as respostas emitidas pelo animal. No reforço



contínuo, todas as respostas emitidas pelo animal são reforçadas (Sidman, 1976; Martin e Pear, 2009). Desta forma, todas as respostas são contingenciadas com consequências reforçadoras. Este tipo de reforçamento é o ideal para aquisição de uma nova aprendizagem (Skinner, 2003; Catania, 1999; Skinner, 1982). No esquema de reforçamento intermitente, nem todas as respostas são reforçadas (Martin e Pear, 2009). Os esquemas de reforçamento intermitente podem ser dos tipos de reforços (i) *em intervalo* ou (ii) *em razão* (Catania, 1999; Sidman, 1976). Quando o reforçamento é feito em intervalos, a variável é o intervalo de tempo estabelecido de quando o reforço estará disponível (Catania, 1999). Este tempo também é escolhido arbitrariamente podendo ser um tempo fixo ou um tempo variável (Catania, 1999; Skinner, 1982; Skinner, 2003). Quando o tempo é fixo o animal tem que emitir uma resposta a cada ciclo de tempo pré-estabelecido. Nesse esquema, ocorrer uma pausa de respostas após o reforço é um fenômeno característico (Ferster, 1960). Para se manter um “*número de respostas de modo constante*” é usado o esquema de reforçamento intermitente variável, que consiste em variar o intervalo de tempo em que o reforço vai estar disponível (Skinner, 2003). O significado do termo, “*número de respostas de modo constante*” está esclarecido no próximo parágrafo.

Quando os reforços são apresentados na modalidade “*em razão*” o que vai estabelecer o momento que o reforço estará disponível depende diretamente das respostas do próprio animal. Deste modo, se estabelece quantas respostas o animal deve emitir (critério) para que o reforço esteja disponível (Catania, 1999; Sidman, 1976; Tourinho e Luna, 2010; Castro e Haydu, 2009). Essas respostas também podem ser *fixas* ou *variáveis*. Na *razão fixa*, o número de respostas emitidas para conseguir um reforço não varia ao longo do processo de aprendizagem. Pode-se aumentar a razão, gradativamente, e fazer o sujeito responder cada vez mais para conseguir o reforço. Isto significa que o critério de exigência “razão” pode aumentar ao longo do tempo, ou seja, com esse método é possível induzir um aumento da frequência de resposta. Entretanto, com esse aumento gradual, pode ocorrer que no início do processo a emissão de respostas possam ser mais lenta, mas a medida que vai se aproximando do total de razão estabelecida para obter o reforço, o animal aumentando a velocidade de emissões de respostas (Ferster, 1960, Catania, 1999). A alta frequência de resposta em uma razão fixa pode ser fatigante para o animal, levando-o a cada término de um ciclo parar de responder por um período. O reforçamento por “*razão variável*” elimina o problema da fadiga, gerando-se um “*número de respostas de modo constante*”, como mencionado

acima. Como nesse esquema o critério para obter um reforço se modifica, o animal responde sem variar a velocidade de emissão de resposta (Skinner, 2003; Catania, 1999; Sidman, 1976).

Como citado anteriormente, algumas variáveis, do sujeito e do contexto, podem interferir no processo de aprendizagem, ou seja, na aquisição de um comportamento. Como por exemplo, idade, sexo, tipo de tarefa, repetição da tarefa, esquema de aprendizagem. Não existem na literatura estudos comparativos de processos de aprendizagem de navegação espacial, nos quais se utilizam diferentes esquemas de reforçamento, como por exemplo, comparando os reforçamentos dos tipos (i) *contínuo* e (ii) *intermitente fixo*. Uma das hipóteses do presente estudo é que sujeitos submetidos à um processo de aprendizagem utilizando-se de esquemas de reforçamento diferentes, irão apresentar diferenças na extinção do comportamento aprendido.

Sabe-se que tanto o condicionamento quanto a extinção envolvem mudanças fisiológicas no córtex cerebral, principalmente, neocórtex (Myskiw e cols., 2014). Quando estes comportamentos são gravados pelo organismo, na rede neuronal, os registros são denominados de memória. Entretanto, não existe uma região cerebral específica para armazenamento de memória, estudos mostram que o armazenamento está distribuído por amplas regiões neurais como por exemplo, o córtex pré-frontal (Oliveira, 2007), amígdala (Myskiw e cols., 2014) e hipocampo, o qual tem uma função central para a consolidação da memória (Zhang e Wang, 2013). Existem evidências de que lesões hipocampais afetam a aquisição de novas memórias (Zhang e Wang, 2013), uma vez o hipocampo desativado ou danificado, resulta em prejuízos direto no processo de aprendizagem (Chang e Maren, 2010). O hipocampo se conecta com o neocórtex tendo um papel importante no armazenamento de informações - memória (O'Keefe e Nadel, 1978; Oliveira e cols., 2010; Druzian, 2013; Zhang e Wang, 2013). Desta forma, tanto o hipocampo quanto o neocórtex tem um papéis fundamentais na memória (Oliveira e cols., 2010)

A memória é um fenômeno complexo e por isso existem formas arbitrárias de classificá-la. De uma forma ampla, pode-se classificar a memória por sua duração de armazenamento, como as memórias de curto e longo prazo (Squire, 1986) ou por armazenar habilidades e processamento de dados como a memória não-declarativa ou implícita e a memória declarativa ou explícita (Squire, 1986; Lombroso, 2004). As memórias não-declarativas são, normalmente, memórias de procedimentos em sua natureza e, frequentemente, são adquiridas de forma inconsciente, não demandando

atividade consciente para realizar uma tarefa (Squire, 1986). Em animais fala-se de memória implícita pela sua inacessibilidade à lembrança consciente e pela expressão somente através de medidas implícitas de desempenho, normalmente como um aumento na velocidade para realizar uma tarefa (Eichenbaum, 1997).

A memória declarativa é acessível de forma consciente, e está relacionada com a capacidade de associar coordenadas, deduzir, lembrar episódios, acessar os fatos e verbalizar sobre acontecimentos e experiências (Eichenbaum, 1997; Druzian, 2013). Para abranger os outros animais que não podem relatar suas experiências verbalmente, mas que possuem essas capacidades, essa memória do tipo “declarativa” também pode ser avaliada e é chamada, para os demais animais, memória explícita (Eichenbaum, 1997). Um dos tipos de memória declarativa ou explícita é a memória espacial, fenômeno central abordado no presente projeto. Este tipo de memória possibilita ao indivíduo orientar-se espacialmente em qualquer local onde ele esteja através de pistas espaciais (Eichenbaum, 1997). Em humanos é possível relatar verbalmente sua trajetória utilizando pontos de referências, como ruas e edifícios, a partir de um mapa cognitivo espacial aprendido (Eichenbaum, 1997). Apesar dos demais animais não verbalizarem, eles utilizam pistas espaciais aloentricas, sendo capazes de associar coordenadas de dicas espaciais para se orientarem no ambiente. Uma das formas mais simples de aprendizado espacial observado, faz com que roedores não dispenda tempo explorando ambientes previamente conhecidos (Sanderson e col. 2012; Druzian, 2013). Essa orientação está associada com a formação de um mapa cognitivo no hipocampo, conforme demonstrado por O’Keefe e Nadel (1978).

A partir do momento que os animais aprendem e memorizam um determinado comportamento, este apenas se manterá se as consequências ambientais forem favoráveis e se mantiverem. Quando esses animais são colocados em um ambiente no qual as consequências reforçadoras param de ocorrer, a frequência da resposta começa a diminuir, voltando ao nível basal (Catania, 1999; Moreira, 2013). Esse processo é denominado extinção, que é considerado um reaprendizado. Para dizer que um comportamento foi extinto ele deve seguir alguns pré-requisitos como: (a) é necessário que haja um processo prévio de aprendizado bem estabelecido, ou seja, a resposta tem que ter sido reforçada; (b) deve acontecer a quebra da relação da resposta e o reforço; (c) a resposta ao estímulo é alterada, diminuindo-se a frequência de resposta até a extinção do comportamento, devido a ruptura da relação previamente estabelecida (Catania, 1999). Partindo dessa definição, fica claro que o processo de extinção

depende diretamente da forma com que os esquemas de reforçamentos ocorrem (Skinner, 2003). Quando esses são diferentes, os processos de extinção passam a ter características diferenciadas, podendo ocorrer de forma mais rápida ou ser mais resistente (Catania,1999; Sidman,1976; Tourinho e Luna, 2010; Souza e Abreu-Rodrigues, 2012). Dados obtidos por diferentes autores mostram que animais reforçados no esquema contínuo apresentam um processo de extinção rápido, enquanto para aqueles reforçados de forma intermitente, o processo de extinção ocorre de forma mais lenta, podendo dizer que o comportamento aprendido se torna mais resistentes ao processo de extinção (Catania, 1999; Sidman, 1976; Tourinho e Luna, 2010; Castro e Haydu, 2009; Souza e Abreu-Rodrigues, 2012).

A ocorrência dos processos de aprendizagem e memória envolve modificações funcionais e morfológicas nas estruturas neurais, levando à alterações em suas atividades (Miranda-Neto e cols., 2002; Valenzuela-Harrington e cols., 2012; Santini e cols., 2012). Mudanças fisiológicas também podem afetar esse processo, como o uso de fármacos ou drogas (Furlong e cols., 2015; Hai-Shu, e cols., 2015). Isso é possível devido à plasticidade neuronal. O fenômeno da plasticidade neuronal possibilita que circuitos neuronais sejam eliminados, mantidos reforçados ou reorganizados (Miranda-Neto e cols., 2002). No processo de plasticidade pode ocorrer formações de novas sinapses e modificação na produção de neurotransmissores (Miranda-Neto e cols., 2002). Dados obtidos de diferentes estudos mostram que o uso de fármacos e drogas pode afetar o processo da consolidação de memória e o processo de extinção (Furlong e cols., 2015; Hai-Shu, e cols., 2015). Outros dados da literatura, do nosso grupo e de outros autores, mostram que parâmetros colinérgicos, por exemplo liberação do neurotransmissor acetilcolina (ACh), possuem um papel nos processos de aprendizagem e memória (Andrade e cols., 2003; Pires e cols., 2005). A enzima acetilcolinesterase (AChE) tem um papel importante na regulação da atividade de sinapses colinérgicas. A diminuição da atividade da AChE resulta no acúmulo de ACh , fazendo com que ocorra uma maior ativação na neurotransmissão, podendo afetar aspectos cognitivos (Valenzuela-Harrington e cols., 2012). Evidências relativamente atuais (Valenzuela-Harrington e cols., 2012; Santini e cols., 2012) tem mostrado que o sistema colinérgico tem um papel importante não só para o aprendizado, mas também no processo de extinção. Foi observado que o aumento da disponibilidade do neurotransmissor ACh no hipocampo facilita o processo de extinção (Valenzuela-Harrington e cols., 2012; Santini e cols., 2012). Em outro estudo executado pelo nosso grupo, Pires e colaboradores

(2005) mostraram que animais que foram submetidos a mesma tarefa por duas vezes consecutivas, depois de um intervalo de tempo, apresentam desempenho cognitivo, memória espacial e extinção, relacionado significativamente com a atividade da AChE e com a liberação de ACh no hipocampo e neocórtex. Foi demonstrado também que diferentes proporções na liberação de ACh no hipocampo podem estar relacionadas com diferentes formas de aprendizado, indicando que esse neurotransmissor pode ser considerado como um marcador útil para detectar diferentes formas de aprendizagem (McIntyre e cols., 2003).

Portanto, considerando que existem evidências de um papel do sistema colinérgico em processos de aprendizagem, memória e extinção, uma segunda questão levantada no presente projeto é se alterações nesse sistema estariam relacionadas com diferentes tipos de esquemas (contínuo e intermitente) de aprendizagem espacial e, conseqüentemente, no processo de extinção do comportamento aprendido.

Diferentes tipos de testes comportamentais são utilizados para se estudar processos cognitivos espaciais como aprendizado, memória e extinção em modelos experimentais animais. Os testes são de navegação espacial, como Labirinto de Oito Braços (Olton e Samuelson, 1976), Labirinto de Barnes (Barnes, 1979), Labirinto Aquático de Morris (LAM) (Morris, 1981), entre outros. Dentre esses equipamentos, o LAM, desenvolvido por Morris em 1981, é uma ferramenta útil na avaliação do aprendizado espacial através do condicionamento operante e também dos processos de memória e extinção (Morris, 1981; Morris, 1984, Martins, 2012;). Uma das vantagens desse labirinto e do método desenvolvido por Morris é que os animais não precisam ser privados de alimento ou utilizar o choque para motivar a aprendizagem, como é necessário em outras modalidades. Embora os ratos sejam nadadores naturais, para eles a água é um estímulo aversivo. A tarefa de escapar da água se torna relativamente fácil, devido suas habilidades naturais, mesmo que tenham sofrido lesões cerebrais telencefálicas de vários tipos (Morris, 1984). Outra vantagem é que a utilização de uma plataforma escondida (submersa abaixo do nível da água), como um reforço, requer que o rato tenha que localizá-la utilizando apenas pistas extralabirinto. Portanto, neste modelo de labirinto aquático exige-se que o animal tenha um conhecimento exato da localização da plataforma submersa – reforço - em relação às pistas extralabirinto (Morris, 1984). Existem evidências que, para encontrar a plataforma os animais formam um mapa cognitivo no hipocampo, utilizando as coordenadas estabelecidas através das pistas extralabirinto (Morris, 1984; Lattal e cols., 2003). Huston e colaboradores (2013)

apontam que o LAM é uma ferramenta voltada para o reforçamento do tipo “negativo”, uma vez que o animal fica em um ambiente aversivo, dentro da água, e o reforço é a plataforma, que possibilita a saída deste ambiente aversivo.

O processo de extinção no LAM é realizado depois de se treinar o animal a encontrar a plataforma em um determinado quadrante. A partir do momento que esse comportamento é estabelecido a plataforma é retirada, e a reexposição à tarefa sem a presença do reforço, leva gradativamente ao processo de extinção. O momento que o animal permanece no quadrante alvo, indica uma memória espacial e, a partir do momento que ele começa a nadar para outros quadrantes pode-se dizer que está ocorrendo o processo de extinção (Oliveira e cols., 2007). Entretanto, apesar de ficar claro que ocorre a extinção quando o animal não demonstra mais preferência pelo quadrante alvo (onde se encontrava a plataforma), existem diferentes protocolos de aprendizado e critérios de quando termina o processo de extinção, como descritos a seguir. Estudos prévios mostram que animais treinados no LAM por 5 dias consecutivos (4 tentativas/sessão= dia) e testados no 6º dia, através de um teste comprobatório (*probe trial* = teste de memória e extinção), no qual o reforço não se encontra mais presente, foram capazes de aprender (durante as 5 sessões do treino) e de lembrar a tarefa no 1º minuto do teste comprobatório (memória), enquanto que no 2º minuto ocorreu o processo de extinção (Pires e cols., 2007; Oliveira e cols., 2010; Silva e cols., 2009). Em outro estudo em que os animais foram treinados apenas por 2 dias (4 sessões com 4 tentativas/dia) e testados no 2º dia por 120s, esses animais também mantinham a memória da tarefa aprendida no 1º minuto, e também extinguiram o comportamento a partir do 2º minuto do teste comprobatório (Sparling e cols., 2010). Outro estudo em que animais foram treinados diariamente (4 tentativas por dia) até aprenderem a achar a plataforma em um tempo máximo de 10s, observou-se que foram necessários 4 dias para que esses animais atendessem esse requisito. No 5º dia, esses animais foram testados – teste comprobatório - por 60s, o qual foi um tempo suficiente para que a memória da tarefa aprendida se mantivesse, mas não foi suficiente para que ocorresse o processo de extinção (Bissonette e cols., 2014). Esses resultados de desempenho dos animais, memória e extinção, quando testados em 60s foram confirmados por Fiedlera e colaboradores (2014), mesmo após um tempo de treino (processo de aprendizagem) maior (4 sessões com 6 tentativas cada/dia).

Estudos onde animais foram treinados por 10 dias consecutivos (4 tentativas/sessão/dia) e com o tempo máximo de 60s, como critério para encontrar a

plataforma, tiveram um melhor desempenho a partir da 4<sup>a</sup>. sessão do treino. O processo de extinção – sem o reforço - foi realizado por 10 dias consecutivos com 4 tentativas por dia, também com o tempo de 60s. O resultado mostrou redução significativa da escolha pelo quadrante alvo (onde se encontrava o reforço) no segundo dia. A partir do 7º dia, os animais começaram a expressar um comportamento de boiar e diminuindo o comportamento de explorar, natação (Lattale cols., 2003).

Méndez-Couz e colaboradores (2014) utilizaram protocolos diferentes dos citados acima, onde os animais foram treinado por 5 dias consecutivos, com 4 tentativas/sessão/dia. No 6º dia, os ratos foram submetidos a 60s dentro do LAM sem a plataforma, para avaliar a memória. No 7º dia, os ratos foram retornados ao labirinto, mas desta vez com a plataforma para reforçar o aprendizado e evitar uma extinção precoce. No 8º dia, foi realizado o protocolo de extinção que consistiu em 4 sessões de 4 tentativas de 60s de duração, sendo uma sessão por dia. Neste experimento, o critério utilizado para dizer que ocorreu a extinção foi a permanência de 25% do tempo em cada um dos quadrates, ou seja, o animal não poderia expressar preferência por nenhum dos quadrantes, o que ocorreu na terceira sessão do teste se mantendo na quarta (Méndez-Couz e cols., 2014).

Levando em consideração os dados apresentados acima para avaliação de aspectos cognitivos espaciais utilizando o LAM, pode-se inferir que: (i) em grande parte dos estudos os roedores aprendem a encontrar a plataforma escondida (reforço negativo) em quatro sessões consecutivas, uma sessão/dia, com quatro tentativas/sessão no mínimo; (ii) nos protocolos de extinção (teste comprobatório sem o reforço) que utilizam 60s de duração, não ocorre a extinção na primeira sessão de 60 s, mas em uma segunda sessão de 60s já se observa indícios de extinção, enquanto que, nos protocolos no quais o teste comprobatório tem duração de 120s, ocorre uma diminuição de preferência pelo quadrante alvo no segundo minuto do teste; (iii) a utilização de reforçamento contínuo, uma vez que o reforço, plataforma, sempre está presente durante o treino, pode explicar o porquê do processo de extinção (com a retirada da plataforma) ocorrer de maneira relativamente rápida.

A partir dessas inferências e também nos dados apresentados, levantamos as seguintes hipóteses:

- a) comparado com o modelo de reforçamento contínuo, no modelo de reforçamento intermitente os animais levarão mais tempo para aprender uma

tarefa de navegação espacial, tendo como consequência efeitos na extinção do comportamento.

- b) utilizando o mesmo procedimento para extinguir o comportamento aprendido, os animais treinados no esquema de reforçamento intermitente terão um desempenho na extinção diferente dos animais treinados no esquema de reforçamento contínuo.
- c) o envolvimento do sistema colinérgico hipocampal e neocortical nos processos de aprendizagem (aquisição e extinção) são diferentes, quando os animais são submetidos a diferentes esquemas de reforçamento: contínuo e intermitente

Portando, o presente trabalho buscamos investigar se mudanças nos esquemas de reforçamentos interferem no comportamento de aprendizado espacial e extinção. Além disto, verificar se essas alterações envolvem parâmetros colinérgicos centrais, no hipocampo e neocórtex.

## **2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**

Embora várias propriedades da extinção de um comportamento vem sendo estudadas, pouco se sabe sobre os processos de extinção em relação a aprendizagem e a memória explícita espacial.

Sabe-se que os processos de aprendizagem podem envolver diferentes esquemas de reforçamento, como o reforço contínuo e intermitente, e que esses influenciam no processo de extinção. Entretanto, até então não foi investigado as propriedades do reforço intermitente e sua interferência em processos cognitivos espaciais como, aprendizagem, memória e a extinção. Sabe-se que o reforçamento intermitente torna o comportamento aprendido mais resistente ao processo de extinção, indicando uma possível diferença no mecanismo de codificação e/ou manutenção e/ou recuperação das informações em relação ao aprendizado de uma mesma tarefa, realizado em um esquema contínuo. Como se pretende também avaliar o papel do sistema colinérgico nesse fenômeno, o presente estudo pode representar um primeiro passo no entendimento das diferenças, em termos de mecanismos neurobiológicos, nos processos de



codificação e/ou manutenção e/ou recuperação das informações aprendidas através de esquemas de aprendizagem diferentes.

O hipocampo e o neocórtex possuem papéis importantes na consolidação, armazenamento de informações e no processo de extinção uma vez que existem evidências que o aumento da disponibilidade do neurotransmissor, como a acetilcolina, nessas regiões pode facilitar o processo de extinção. Além disto, existem várias evidências mostrando o envolvimento do sistema colinérgico em processos cognitivos, como aprendizado e memória espacial. A escolha do sistema colinérgico representa apenas um ponto de início, e os dados obtidos no presente estudo poderão abrir perspectivas para estudos futuros abordando o envolvimento de outros sistemas neuroquímicos.

O presente projeto representa o primeiro estudo sistemático sobre as relações entre parâmetros colinérgicos, diferentes esquemas de reforçamento (contínuo e intermitente) e o processo de extinção de um comportamento aprendido durante uma tarefa de navegação espacial.

### **3. OBJETIVOS**

#### ***3.1. Geral***

Avaliar a extinção de um comportamento de navegação espacial aprendido em diferentes esquemas de reforçamentos, em modelo experimental animal e o envolvimento do sistema colinérgico hipocampal e neocortical nesses processos.

#### ***3.2. Específicos***

***Em ratos Wistar adultos, avaliar:***

3.2.1 as curvas de aprendizagem obtidas com o treino em duas modalidades de esquemas de reforçamento: (i) contínuo e (ii) intermitente;

3.2.2 a extinção do comportamento aprendido em tarefa de navegação espacial, utilizando os modelos de aprendizagem com reforço intermitente e reforço contínuo;

3.2.3 a atividade da AChE no hipocampo e neocórtex e a liberação de ACh no neocórtex;

3.2.4 as correlações entre os parâmetros bioquímicos (3.2.3), e entre eles e os parâmetros comportamentais (3.2.1 e 3.2.2).

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os animais serão manipulados e mantidos de acordo com as normas do *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1985).

##### *4.1 Delineamento Experimental*

Será realizado um experimento (n=30) e uma réplica (n=30), com o seguinte delineamento: no total serão utilizados 60 ratos Wistar adultos (3 meses), provenientes do Centro de Biotério da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Todos os ratos serão mantidos em gaiolas com no máximo 3 animais, em um ciclo regular noite/dia de 12 horas cada. Os 60 animais serão separados aleatoriamente em quatro grupos, e tratados de acordo com os seguintes critérios:

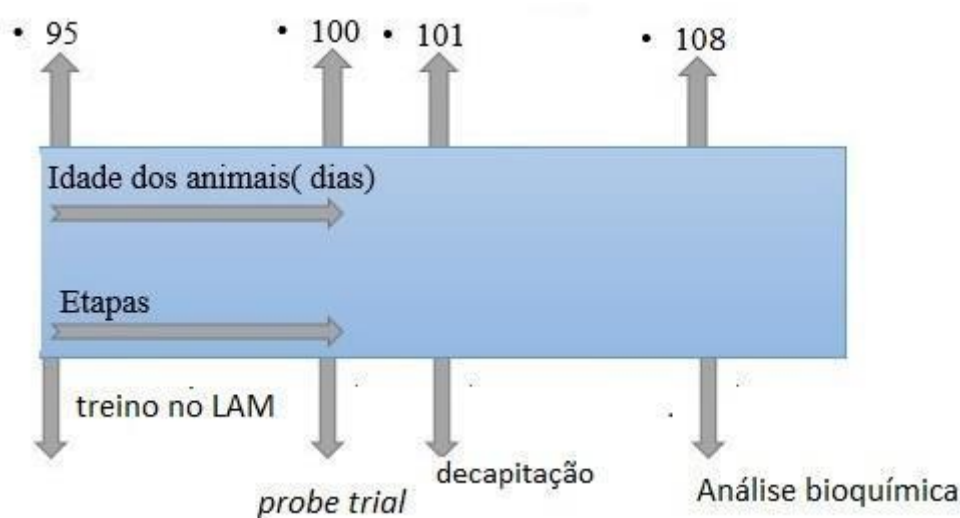
- (i) Treinados no esquema com **Reforço Contínuo = GRC** (n=12);
- (ii) Treinados no esquema com **Reforço Intermitente = GRI** (n=12);
- (iii) Não treinados, **Controle Reforço Contínuo = GCC** (n=12);
- (iv) Não treinados, **Controle Reforço Intermitente = GCI** (N=12);
- (v) Não treinados, **Controle não Exposto ao Labirinto = GC** (n=12)

Cada um dos tratamentos – cinco grupos experimentais - está detalhado abaixo.

Um dia depois dos testes comportamentais os ratos serão mortos por decapitação e os cérebros rapidamente removidos e colocados sobre placas de Petri invertidas sobre o gelo, para separação do hipocampo e do neocórtex. O tecido neocortical será fatiado em prismas 400 µm, misturadas com uma espátula e a mostra 30 mg separadas para os ensaios de liberação de ACh, no mesmo dia do sacrifício. O tecido restante do neocórtex e do hipocampo serão mantidos no freezer à -80°C e processados, posteriormente, em

um prazo de no máximo uma semana, para as análises da atividade da AChE. A descrição detalhada dos ensaios bioquímicos se encontra abaixo.

Um esquema do delineamento experimental está representado na Figura 2.



**Figura 02: Representação esquemática do delineamento experimental**, indicando as etapas desde o início dos experimentos – teste comportamental - até os ensaios bioquímicos . A linha superior da barra representa a escala do tempo, de acordo com a idade dos animais em dias. A linha inferior indica as etapas do experimento.

#### 4.2 Testes Comportamentais

##### Equipamento:

*Labirinto Aquático de Morris (LAM)* (Morris, 1981): Este labirinto foi desenvolvido por Morris (1981), sendo um instrumento capaz de avaliar o aprendizado e a memória espacial uma vez que demanda a utilização de pistas extra-labirinto para o animal se guiar e se localizar espacialmente.

O LAM consiste em uma piscina circular de fibra de vidro, com aproximadamente 1,80m de diâmetro e 43 cm de altura, contendo água a 25°C até o

nível de 30 cm. Esta piscina será dividida em quatro quadrantes imaginários denominados NO (noroeste), SO (sudoeste), NE (nordeste) e SE (sudeste). Uma plataforma circular (15 cm de diâmetro) de acrílico será colocada 2 cm abaixo do nível da água. Para impedir a localização visual desta plataforma, a água será turvada com 80g de leite em pó. A sala que se encontra a piscina conterá pistas visuais fora do labirinto que serviram de referência para que o animal localizar a plataforma. Estas pistas serão objetos da sala e serão mantidas na mesma posição (local) em todas as sessões experimentais. Para registrar o comportamento dos animais será utilizado uma câmera com lente angular que se localiza no teto da sala em posição central em relação à posição da piscina. As imagens serão analisadas posteriormente, utilizando um programa de analisador de imagens, onde o desempenho dos animais serão quantificados e expressos em distancia percorrida (cm) para encontrar o reforço (plataforma), latencia, em segundos, que é o tempo gasto pelo animal para encontrar a plataforma. Utilizando esses parametros, o programa também fornece a velocidade de nado (cm/s).

Todos os animais dos grupos GRC e GRI serão submetidos à tarefa no LAM, que consiste da etapa de “Treino” ou aquisição e uma etapa de “Teste”, para avaliação da memória e da extinção.

### **Treino**

#### *(i) Esquema de Reforçamento Continuo:*

Para os animais do grupo GRC, a aquisição do comportamento consistirá em cada animal ser submetido a uma sessão/dia, durante 5 dias consecutivos. Cada sessão será constituída de quatro tentativas, com rodízio dos animais entre as tentativas. Durante o treino a plataforma estará localizada em uma posição constante no centro de um dos quadrantes (quadrante alvo). Cada tentativa consiste em colocar o animal dentro da piscina, com o focinho voltado para à borda da piscina, em um dos 4 quadrantes, escolhido de forma aleatoriamente, ou seja, em cada tentativa o animal será colocado na piscina a partir de uma posição cardeal diferente, sinalizada na borda (norte, sul, leste, oeste). O treino será finalizado quando o animal encontrar a plataforma ou após 60 segundos. Se o animal não encontrar a plataforma em 60 segundos, ele será guiado até a plataforma pelo

experimentador. Os ratos serão deixados em cima da plataforma por 15 segundos e em seguida serão retirados da piscina.

(ii) *Esquema de Reforçamento Intermitente:*

Os animais do grupo GRI serão treinados até atingirem o desempenho obtido pelos animais do grupo GRC na quinta sessão. Portanto o número de sessões necessárias para atingir esse critério será conhecido durante a execução do experimento. Cada sessão será constituída por 8 tentativas (T), sendo 4 T com a plataforma no quadrante alvo e 4 T sem a plataforma, as quais serão intercaladas. Ou seja, T1, com plataforma, T2 sem plataforma, T3 com plataforma, T4 sem plataforma e assim sucessivamente. Os procedimentos serão os mesmos descritos acima para os animais do grupo GRC. Cada tentativa consiste em colocar o animal dentro da piscina, voltado para a borda, em um dos quatro quadrantes, que será escolhido de forma aleatória. Nas tentativas que a plataforma estiver presente, essa será finalizada quando o animal encontrar a plataforma ou após 60 segundos, quando o animal será guiado para a plataforma.

Nas tentativas sem a plataforma, o animal será retirado da piscina no momento correspondente a 60 segundos.

### Controles do Treino

(i) *Exposição ao labirinto sem execução da tarefa cognitiva:*

Os animais do grupo GCC serão colocados na piscina sem plataforma e deixados lá por 60 segundos. Essa exposição será repetida por 4 vezes/sessão/dia, durante 5 dias consecutivos. Portanto, os animais deste grupo não serão treinados em nenhuma tarefa cognitiva. Os animais irão apenas exercer atividade física – natação – sem nenhuma demanda cognitiva. Os animais do grupo GCI utilizará do mesmo critério estabelecido pelo grupo GCC. Entretanto, o critério de encerramento da atividade no LAM estará relacionado com o número de sessões estabelecidos para o grupo GRI

(ii) *Controle*

Os animais do grupo GC irão permanecer durante todo o tempo nas gaiolas, mantidas no biotério do Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular (LaNec).

**Teste comprobatório (*probe trial*):**

Um dia após a última sessão do treino, ou seja, no 6º dia para os animais do GRC e após atingir o critério estabelecido (vide o item acima) para os animais do GRI, será realizado o teste comprobatório (*probe trial*) para avaliar a memória espacial e o comportamento de extinção dos animais. Todos os animais dos grupos GRC e GRI, que foram submetidos ao treino, serão testados conforme descrito a seguir. Os animais serão colocados na piscina, sem a presença da plataforma, e deixados lá por um período de 120 segundos, ou seja, uma tentativa de 120s de duração. A distância média ao alvo (centímetros) e o tempo (segundos) que o animal permanecer em cada quadrante no primeiro minuto serão quantificados e expressos como desempenho relativo à memória espacial. O Índice de Extinção, definido como a razão entre o tempo em que o animal permanecer no quadrante alvo no segundo minuto (d2), pelo tempo em que o animal permanecer no mesmo quadrante no primeiro minuto (d1), será utilizado para se avaliar a capacidade de extinção do comportamento. Desta forma um índice de extinção (EI) será calculado como,  $EI = d2/d1$ . Se d2 for maior do que d1, EI será maior do que 1, o que sugere que houve extinção comportamental (Oliveira e cols., 2010). O comportamento no teste comprobatório também será expresso em termos da % de tempo, considerando o tempo total de 120 s como 100%, que o animal permanecer em cada quadrante. Desta forma, a preferência pelo quadrante poderá ser avaliada, tanto para os primeiros 60 s, como para os 60 s finais.

**4.3 Estudos Bioquímicos**

As amostras de hipocampo e neocórtex mantidas à 80<sup>o</sup>C, conforme mencionado acima, serão descongeladas e processadas para os ensaios da atividade da AChE. O experimento da liberação de ACh, utilizando amostras de neocórtex, será realizado no mesmo dia que os animais forem mortos.

***Liberação de Acetilcolina:***

Para a medição da libertação de ACh, duas alíquotas de 30 mg de tecido do neocórtex de cada animal serão pré-incubadas sob agitação durante 5 min a 37 ° C em 1 ml de meio de incubação contendo (mM): NaCl 136,0, KCl 2,7, CaCl<sub>2</sub> 1,35, NaHCO<sub>3</sub> 12,0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36, MgCl<sub>2</sub> 0,49, glucose 5,5 e eserina 0,01. Após a pré-incubação, será realizada a incubação por 30 min, nas condições estimulada e basal (não estimulada). Condição estimulada: potássio (50 mM). A reação será interrompida pela adição de 100 µL de 50% de TCA para cada tubo. Todos os tubos serão mantidos a -20 °C até o dia do ensaio (máximo de 2 dias). A ACh libertada a partir das fatias do neocórtex será extraída dos meios de incubação utilizando o método de Prado e cols. (1990). A determinação da concentração de ACh será feita por quimiluminescência, utilizando o método descrito por Israel e Lesbats (1981) e Israel e Lesbats (1982) . A ACh libertada será expressa em pmols por mg de tecido.

#### ***Atividade da Acetilcolinesterase:***

Amostras de neocórtex e do hipocampo serão utilizadas para dosagens da atividade da AChE, utilizando o método de Ellman e colaboradores (1961). De forma breve, alíquotas de 20mg do tecido – hipocampo ou neocórtex – serão transferidas para tubos contendo 1 ml de tampão de borato e homogeneizadas. A atividade da AChE será determinada por espectrofotometria, medindo-se de forma indireta a cinética de formação do produto a 412 nm. A atividade enzimática será expressa em moles de substrato hidrolisados por minuto por grama de tecido.

#### ***4.4 Análise Estatística***

Os dados serão analisados quanto à normalidade e homogeneidade da variância. Para dados com distribuição normal, serão utilizados testes paramétricos, como ANOVA (obs. com medidas repetidas para os dados comportamentais referentes ao treino) seguida do teste *post-hoc* Newman-Keuls, correlação de Pearson. Para dados que não apresentarem uma distribuição normal entre as medidas coletadas serão aplicados testes não paramétricos, como teste pareado Wilcoxon e não pareado U Mann Whitney, ANOVA Kruskal-Wallis seguido por comparações múltiplas, correlação de Spearman. O limite de confiança será de 95% e o nível de significância mínimo será menor que

0,05. Um programa para análise estatística, como o ambiente R será utilizado  
(disponível no endereço <http://www.r-project.org/>).

#### ***4.5 Viabilidades do projeto***

O LaNec contém os equipamentos necessários e os reagentes para a execução do presente projeto.



## 5. CRONOGRAMA

ATIVIDADES	MESES																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Treinamento na aplicação dos testes comportamentais		X	X																					
Treinamento na execução dos ensaios bioquímicos				X	X																			
<b>(i) Experimento (n=24)</b>																								
Testes comportamentais						X																		
Análises bioquímicas						X	X																	
Análises estatísticas parciais dos dados								X	X	X														
<b>(ii) Réplica (n=24)</b>																								
Testes comportamentais											X													
Análise bioquímicas											X	X												
Análises estatísticas final dos dados												X	X	X	X									
Preparação do texto da dissertação														X	X	X	X	X						
Defesa da dissertação																			X					

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIS-BALBOA, Roberto, e cols. A hippocampal insulin-growth factor 2 pathway regulates the extinction of fear memories. **The EMBO Journal**. Aug; p.4071-4083, 2011.

ANDRADE, R.V., e cols. Atuação dos Neurotransmissores na Depressão. **Ciências Farmacêuticas**. p.1-13, 2003.

BARNES, C.A., Memory Deficits Associated With Senescence: A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. Feb; p.74-104, 1979.

BERTI, Simone. **Efeito da creatina e do piruvato sobre alguns parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos submetidos à administração intra-hipocampal de fenilalanina**. 2011.92 f. Tese doutorado, Ciências Biológicas: Química, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2011

BISSONETTE, Gregory B., e cols. Prefrontal cognitive deficits in mice with altered cerebral cortical GABAergic interneurons. **Behavioural Brain Research**. Feb; p.143-51, 2014.

CABALLO, Vicente. **Manual de técnicas de terapia de modificação do comportamento**. Santos, 2007.

CASTRO T. C., HAYDU, V. B. Efeitos da punição e da extinção na ressurgência de relações equivalentes. **Acta Comportamentalia**. p.211-223, 2009.

CATANIA, Charles. **Aprendizado: Comportamento, Linguagem e Cognição**.4.ed. Porto Alegre, 1999.

CHAN, Wan Y.M., e cols. Effects of recent exposure to a conditioned stimulus on extinction of Pavlovian fear conditioning. **Learning & Memory**. Sep; p.512-521, 2010.

CHANG, C., MAREN, S. Strain difference in the effect of infralimbic cortex lesions on fear extinction in rats. **Behavioral Neuroscience**. Jun; p.391-397, 2010.

DRUZIAN, Alessandra F. **A influência do ambiente enriquecido na memória espacial de camundongos Swiss em três diferentes faixarias**. 2013.67 f. Dissertação (mestrado) Pós graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

EBBINGHAUS, H. (1885). **Memory: A contribution to experimental psychology**. Henry A. Ruger & Clara. Trabalho original publicado em 1885.

EICHENBAUM, Howard. DECLARATIVE MEMORY: Insights from Cognitive Neurobiology. **Annual Review of Psychology**. p.547-572, 1997.

ELLMAN G.L., COURTNEY K.D., ANDRES Jr V., FEATHERSTONE R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, July; p.88–95, 1961.

FERNANDES, Flavia S. **A Semente De Linhaça (Linum Usitatissimum) Como Fonte De Ácido Graxo Omega-3 Durante A Gestação, Lactação E Crescimento No**

**Desenvolvimento Cognitivo De Ratos**, 2007.132 f. Dissertação (Mestrado)- Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal Fluminense. Niterói. 2007.

FERRARI, Elenice A. de Moraes e cols. Plasticidade Neural: Relações com o Comportamento e Abordagens Experimentais. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**. Mai-Ago; p.187-194, 2001.

FERSTER, C. B. Intermittent reinforcement of matching to sample in the pigeon. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**. March; p. 259-272, 1960.

FIEDLER, Anna, e cols. Hippocampus-dependent learning in SKAP-HOM deficient mice. **Behavioural Brain Research**. Aug; p.125-130, 2014.

FURLONG, T.M, e cols. The effects of compound stimulus extinction and inhibition of noradrenaline reuptake on the renewal of alcohol seeking. **Translational Psychiatry**. Set; 2015.

GROVES, P.M; THOMPSON, R.F. Effects of stimulus frequency and intensity on habituation and sensitization in acute spinal cat. **Physiology and Behavior**. May; p.383-8, 1969.

HAI-SHUI, Shi, e cols. Reconsolidation of a cocaine associated memory requires DNA methyltransferase activity in the basolateral amygdala. **Scientific Reports**. Aug; p.1-13, 2015.

HUSTON, Joseph P., e cols. Animal models of extinction-induced depression: Loss of reward and its consequences. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. Nov; p.2059-2070, 2013.

ISRAEL, M., LESBATS B. Application to mammalian tissue of the chemiluminescent method for detecting acetylcholine. **Journal of Neurochemistry**. Jul; p.248-250, 1982.

ISRAEL, M., LESBATS B. Continuous determination of transmitter release and compartmentation in Torpedo electric organ synaptosomes, studied with chemiluminescent method detecting acetylcholine. **Journal of Neurochemistry**. Dec; p.1475-1483, 1981.

KALIVAS, Peter W. Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval. **Neuropsychopharmacology**. Jan; p.56–72, 2008.

LATTAL, K. Matthew., e cols. Extinction, Renewal, and Spontaneous Recovery of a Spatial Preference in the Water Maze. **Behavioural Neuroscience**. Oct; p.1017-1028, 2003.

LOMBROSO, Paul. Aprendizagem e memória. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. Set; p. 207-210, 2004.

MARTIN, Garry, PEAR, Joseph. **Modificação de Comportamento o que é e como fazer**. ROCCA. São Paulo. 8ªed, 2009.

MARTINS, Wagner C. **Estudo do Efeito da Atorvastatina sobre Alterações Comportamentais e Bioquímicas em Camundongos Infundidos com o Peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ 1-40)**. 2012.74 f. Dissertação (mestrado) Pós graduação de Neurociências, da Universidade Federal Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MCGAUGH, James L. Time-Dependent Processes in Memory Storage. **SCIENCE**. Sep p.1351-1358, 1966.

MCINTYRE, Christa K., e cols. Patterns of brain acetylcholine release predict individual differences in preferred learning strategies in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**. Mar; p.177-183, 2003.

MÉNDEZ-COUZ, M., e cols. Spatial memory extinction: A c-Fos protein mapping study. **Behavioural Brain Research**. Mar; p.101-110, 2014.

MIRANDA-NETO, M.H., e cols. Relações Entre Estimulação, Aprendizagem e Plasticidade do Sistema Nervoso. **Arquivos da Apadec**. Jan; p.9-14,2002.

MOREIRA, Marcio. **Comportamento e práticas culturais**. Instituto Walden4.Brasilia, 2013.

MORRIS, Richard, G.M. Spatial Localization Does Not Require the Presence of Local Cues. **Learning And Motivation**. 12, p.239-260. University of St. Andrews, 1981.

MORRIS, Richard. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**. May; p.47-60, 1984.

MYSKIW, Jociane C, IZQUIERDO, Ivan, FURINI, Cristiane R.G. Modulation of the extinction of fear learning. **Brain Research Bulletin**. Jun; p.61-9, 2014.

NATIONAL Research Council. **Guide for the care and use of laboratory animals: a report of the Institute of Laboratory Animal Resources Committee on Care and Use of Laboratory Animals**. Washington (DC): U.S. Department of Health and Human Services. p.125, 1985.

O' KEEFE, J, NADEL, L. **The Hippocampus Cognitive Map**. Clarendon Press, Oxford. 1987.

OLIVEIRA, Fernando A., e cols. Abolition of reperfusion-induced arrhythmias in hearts from thiamine-deficient rats. **American Journal of Physiology**. Jul; p.394-401, 2007.

OLIVEIRA, Luciana, e cols. Correlations among central serotonergic parameters and age-related emotional and cognitive changes assessed through the elevated T-maze and the Morris water maze. **Age**. Jun; p.187-196, 2010.

OLTON, David S, SAMUELSON, Robert J. Remembrance of Places Passed: Spatial Memory in Rats. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**. The Johns Hopkins University, Mar; p.97-116, 1976.

PAVLOV, Ivan P. **Conditioned Reflexes: An Investigation Of The Physiological Activity Of The Cerebral Cortex**. Oxford University Press, London, 1927.

PIRES, Rita G.W., e cols. Correlation between phosphorylation level of a hippocampal 86 kDa protein and extinction of a behaviour in a model of Wernicke–Korsakoff syndrome. **Behavioural Brain Research**. Jun; p.102-106, 2007.

PIRES, Rita G.W., e cols. Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: A study using a model of Wernicke–Korsakoff Syndrome. **Behavioural Brain Research**. Jul; p.11-21, 2005.

PRADO, M.A., MORAES-SANTOS T., FREITAS R.N., SILVA, M.A, GOMEZ, M.V. E. Choline oxidase chemiluminescent assay, after removal of eserine from medium, of acetylcholine released in vitro from brain slices. **Journal of Neuroscience Methods**. Oct; p.193–196, 1990.

RAMÓN, Y e CAJAL, S. *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebretes*. Maloine. Paris, 1911.

SANTINI, Edwin.,e cols. Muscarinic Receptors Modulate the Intrinsic Excitability of Infralimbic Neurons and Consolidation of Fear Extinction. **Neuropsychopharmacology**. Aug; p.2047-2056, 2012.

SANDERSON DJ, BANNERMAN DM. The role of habituation in hippocampus-dependent spatial working memory tasks: evidence from GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice. **Hippocampus**. May; p.981-994, 2012.

SATO, Takechi. *Habituação e Sensibilização Comportamental*. Instituto de Psicologia. USP. **Psicologia USP**. p.231-276, 1995.

SIDMAN, Murry. **Táticas de pesquisa científicas**. Edit. Brasiliense, 1976

SILVA, Danielle. e cols. Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. **Journal of Neuroscience Methods**. Mar; p.289-293, 2009.

SKINNER B.F (2003). **Ciência e Comportamento Humano**. Martins fontes, ed.11, São Paulo. Trabalho original publicado em 1979.

SKINNER, B.F. (1982). **Sobre o behaviorismo**. Trad. de Maria da Penha Villalobos. São Paulo: Cultrix/EDUSP. Trabalho original publicado em 1974.

SOUZA, Alessandra S, ABREU-RODRIGUES Josele. Extinção e estímulo independente da resposta: Efeitos e relações não-contingentes sobre o comportamento. **Psicologia: reflexão e crítica**. Porto Alegre, p.764-773, 2012.

SPARLING, Jessica E., e cols. The effects of gestational and postpartum environmental enrichment on the mother rat: A preliminary investigation. **Behavioural Brain Research**. Mar; p.213-223, 2010.

SQUIRE, Larry R. Mechanisms of Memory. **Science**. Jun; p.1612-1619, 1986.

THOMPSONS, R.F., SPENCER, W A. Habituation. **Psychological Review**. Jan; p.16-43, 1966.

TOURINHO, E.Z, LUNA, S.V. **Análise do comportamento: Investigações históricas conceituais e aplicadas**. Roca, 2010.

VALENZUELA-HARRINGTON, Mauricio. e cols. Dimethoate accelerates the extinction of eyeblink conditioning in mice. **Neuro Toxicology**. Jan; p.105-110, 2012.

ZHANG, Ming, WANG, Hongbing. Mice overexpressing type 1 adenylyl cyclase show enhanced spatial memory flexibility in the absence of intact synaptic long-term depression. **Learning & Memory**. Jul; p.352–357, 2013.