



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA-UFSC  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS  
DOUTORADO

ISABEL CRISTINA DA CUNHA

Efeito da micro-injeção de antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA no centro e na concha do Núcleo Accumbens sobre a emocionalidade e ingestão de alimento, em ratos Wistar fêmeas

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Neurociências, sob a orientação do Professor Dr. Moacir Serralvo Faria

FLORIANÓPOLIS, 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA-UFSC  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS  
DOUTORADO

Efeito da micro-injeção de antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA no centro e na concha do Núcleo Accumbens sobre a emocionalidade e ingestão de alimento, em ratos Wistar fêmeas

ISABEL CRISTINA DA CUNHA

**Doutoranda**

Orientação

PROFESSOR DR. MOACIR SERRALVO FARIA  
**Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB**

Florianópolis, 2008



*A Deus.*

*Esta Tese é dedicada aos meus  
queridos pais César e Clarinda  
por todo o amor e ensinamento.*

*Ao Moacir e à Marta por tudo  
que representam para mim.  
Muitíssimo Obrigada!*

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus queridos Marta e Moacir, meus orientadores neste doutoramento e que têm me ensinado a cada dia lições de vida as quais não estão escritas em livros.*

*Ao Professor Moacir que desde o início do meu Mestrado tem me inspirado a ser uma professora cada vez melhor! Quero um dia ser como você! Você é um exemplo de profissional, de competência, de responsabilidade e de ética rara de se encontrar. O meu aprendizado no seu laboratório, com sua equipe, será muito bem aplicado! Obrigada por confiar em mim!*

*À Professora Marta pela disponibilidade total, pelo profissionalismo, por não desanimar um minuto durante todo o tempo. Admiro muito você!*

*Ao Professor Marino pelo profissionalismo, por disponibilizar seu laboratório e por seu apoio constante.*

*Às professoras Mariana, Cristina e Cilene pelo comprometimento e auxílio durante todo o tempo de Mestrado e de Doutorado!*

*Aos demais professores do Departamento de Fisiologia e do Centro de Ciências Biológicas pelo profissionalismo e por colaborarem diretamente na minha formação.*

*À dona Vilma, ao Sr. Carlos, ao Nivaldo e aos demais funcionários pelo apoio diário.*

*Aos meus companheiros de cirurgia, Adriana e Juliano, que nunca me deixaram só, nem aos sábados e domingos!*

*À Ana Paula e ao Sérgio, meus parceiros de pesquisa, pelo companheirismo.*

*A todos os meus colegas da Pós-Graduação: Samira, Amanda, Luciane, Daniele, Aparecida, Diana e Fábio, pelo apoio recebido.*

*Aos meus colegas da UDESC e da UNISUL pela compreensão e incentivo.*

*Aos Coordenadores da UNISUL: Paulo Sandrini, Alexandre Aguiar, Vianney, e Rose Clér, por me apoiarem.*

*À Lidiane, minha companheira bióloga, que tem me auxiliado nesse período,*

*À minha amiga Sílvia por estar presente desde a Graduação.*

*Mãe e Pai! Pelo exemplo de vida, pelo carinho e incentivo!*

*Aos meus queridos irmãos, Karla Regina, César Augusto e Mara Raquel e aos meus cunhados, Gabriel e Márcia pelas lições de vida e solidariedade,*

*Aos meus sobrinhos pela esperança de um mundo mais justo. Amo Vocês!*

*Aos meus tios e tias pelo carinho,*

*À minha tia Clarice e à Icléia pelo incentivo e companheirismo.*

*A esta Universidade por toda a minha formação acadêmica.*

*Aos animais! Aos que foram utilizados neste estudo! Aprendi muito mais com o comportamento de cada um, a cada dia.*

*Muito obrigada!*

## SAUDADE

*"Aqui sentado,  
Lembro daquele que tanto me ensinou  
Daquele que meu coração, embalou  
No longo silêncio de seus lábios, valores você sempre transmitiu  
Na insegurança de seus atos, credibilidade você sempre irradiou  
Nas privações de sua alma, você sempre se doou*

*Você era como um esteio  
Onde meu egoísmo podia descansar  
Hoje sua presença, não mais saboreio  
Com todo empenho e clamor, eu apenas queria irradiar  
Todo o amor que por você senti, sem rodeio  
Com toda a percepção, sem vacilar*

*O tempo não volta jamais  
E eu, na minha vida, como um tolo em devaneio  
Sempre te retribui menos, e não mais  
Nunca a pensar que um dia  
Você inevitavelmente me faltaria*

*Relembro com dor e pesar  
Da tua presença que muita falta me faz  
Deus, que vácuo é esse que não se preenche  
Que dor é essa que não esmorece  
Que tristeza é essa que não padece  
Que culpa é essa que não desaparece"*

*Autor desconhecido*

*"Milagres não ocorrem em contradição com a natureza,mas somente em contradição com o que conhecemos da natureza"*

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivos avaliar o efeito da microinjeção bilateral de antagonistas dos receptores AMPA (á-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) no Núcleo Accumbens (NAcc) sobre a emocionalidade e sobre a ingestão de alimento em ratos Wistar fêmeas. O experimento 1 avaliou se a microinjeção de DNQX (6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona) na sub-região da concha e do centro do NAcc poderia alterar o nível de ansiedade e a aprendizagem emocional dos animais no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). O experimento 2 avaliou se a microinjeção de CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona), em ambas as regiões do NAcc, poderia induzir efeito ansiolítico e hiperfagia em fêmeas submetidas a um teste de ingestão de alimento. Os resultados do Experimento 1 mostraram que a administração bilateral de DNQX (330 e 660ng) na concha, mas não no centro do NAcc (AP entre +1,08 e +2,16mm anterior ao bregma), induziu um efeito do tipo ansiolítico, visto que houve um aumento na porcentagem de entrada nos braços abertos do LCE, sem alteração do número de entrada nos braços fechados. A microinjeção de DNQX (660ng) na concha também aumentou a exploração dos braços abertos em relação aos animais que receberam a mesma microinjeção no centro, indicando que o bloqueio dos receptores AMPA é ansiolítico apenas na concha do NAcc. A microinjeção de DNQX na concha ou no centro do NAcc não prejudicou a aprendizagem emocional. Os resultados do experimento 2 mostraram que a microinjeção de CNQX (5,0 nmol) na concha, mas não no centro do NAcc (AP entre +1.08 e +2.04mm anterior ao bregma), induziu efeito ansiolítico caracterizado por baixa ocorrência de avaliação de risco na caixa de ingestão. O efeito ansiolítico induzido por CNQX (5,0nmol) na concha do NAcc, não deve ser atribuído a alterações na atividade motora dos animais já que a frequência de locomoção e exploração vertical não foram alterados após a microinjeção da droga. Entretanto, a microinjeção de CNQX em qualquer um dos sítios do NAcc, não foi capaz de alterar a ingestão de alimento dos animais. Os dados demonstram que o bloqueio dos receptores AMPA é ansiolítico apenas na cocha do NAcc e pode alterar de forma diferenciada, os comportamentos defensivos e de ingestão de alimento em ratos Wistar fêmeas.

Palavras-chave: Núcleo Accumbens; ansiedade; ingestão de alimento; labirinto em cruz elevado; AMPA; glutamato; gênero, rato.

## ABSTRACT

This study investigated the effect of the AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) receptor antagonist microinjections into the core and shell sub-regions of the accumbens nucleus (Acb) on the level of anxiety and food intake in female Wistar rats. Experiment 1 evaluated the effect of 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX; 330 and 660ng) microinjected into the core and shell sub-regions of the accumbens nucleus (Acb), on the level of anxiety and emotional learning of the animals in the elevated plus-maze (EPM). Experiment 2 evaluated the effect of 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; 2.5 and 5.0nmol) microinjected into both Acb sub-regions on food intake and the level of anxiety in female rats submitted to a food intake test. Data from experiment 1 showed that bilateral microinjections of DNQX (330 and 660ng) into the Acb shell, but not into the Acb core (AP, +1.08 to +2.16), induced an anxiolytic-like effect, since there was an increased percentage of entries in the open arms of the maze, with no change in the number of entries into the enclosed arms. The 660ng DNQX microinjection into the Acb shell also increased the open arm exploration in relation to 660ng DNQX microinjection into the Acb core. Prior DNQX microinjections in both core and shell sub-regions of the Acb failed to impair the animals emotional learning. Data from experiment 2 indicated that bilateral microinjections of CNQX (5.0nmol) into the Acb shell (AP, +1.08 to +2.04), but not into the Acb core, induced an anxiolytic-like effect, since the animals exhibited low level of risk assessment in the feeding cage test. The anxiolytic-like effect induced by 5.0nmol CNQX microinjection into the Acb shell may not be ascribed to changes in the motor activity of the animals, because the frequency of locomotion and rearing remained unchanged after the drug microinjection. However, neither Acb shell nor Acb core CNQX microinjections were able to change the food intake of the animals. The data suggest that AMPA receptor blockade in the Acb nucleus is anxiolytic only in the Acb shell and may differentially change the ingestive and defensive behaviours in female rats.

Keywords: Nucleus accumbens, anxiety, food intake, elevated plus-maze, AMPA, glutamate, female, rat.

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos</b>	<i>iv</i>
<b>Lista de Figuras</b>	3
<b>Lista de Tabelas</b>	5
<b>Lista de Abreviaturas</b>	6
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	8
1.1 Núcleo Accumbens: aspectos gerais	8
1.2 Núcleo Accumbens: as sub-regiões	13
1.3 Núcleo Accumbens e cérebro emocional	16
1.4 Núcleo Accumbens: uma visão geral da neuroquímica	19
1.5 Receptor glutamatérgico do tipo AMPA	22
1.6 Envolvimento do NAcc no controle da ingestão do alimento	26
1.7 Labirinto em cruz elevado	29
1.8 Ansiedade, Núcleo Accumbens e LCE	32
<b>2 OBJETIVOS</b>	36
2.1 Objetivo Geral	36
2.2 Objetivo Específico	36
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	37
3.1 Animais	37
3.2 Drogas	38
3.2.1 Experimento 1	
3.2.2 Experimento 2	
3.3 Cirurgia estereotáxica	39

<b>3.4 Injeções intracerebrais</b>	40
<b>3.5 Modelos experimentais</b>	41
<b>3.5.1 Labirinto em cruz elevado e registro comportamental</b>	41
<b>3.5. 2 Caixa de ingestão e registro comportamental</b>	43
<b>3.6 Procedimentos experimentais</b>	47
<b>3.6.1 Experimento 1: Labirinto em cruz elevado</b>	47
<b>3.6.2 Experimento 2: Caixa de registro de ingestão</b>	47
<b>3.7 Perfusão e Histologia</b>	48
<b>3.8 Análise de dados</b>	48
<b>4 RESULTADOS</b>	49
<b>4.1 Experimento 1: Resultados dos experimentos no LCE</b>	49
<b>4.2 Experimento 2: Resultados dos experimentos na caixa de ingestão</b>	59
<b>5 DISCUSSÃO</b>	64
<b>6 CONCLUSÕES</b>	77
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	79
<b>8 ANEXOS: Artigos publicados</b>	92

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Representação da localização do Núcleo Accumbens	10
<b>FIGURA 2.</b> Vias glutamatérgicas e dopaminérgicas do cérebro emocional	17
<b>FIGURA 3.</b> Receptores Glutamatérgicos	24
<b>FIGURA 4.</b> Labirinto em cruz elevado.	42
<b>FIGURA 5.</b> Caixa de Ingestão.	44
<b>FIGURA 6.</b> Representação das seções coronais ilustrando os locais atingidos pela microinjeção de Sal, veículo e DNQX 330 e 660ng, nas sub-regiões centro e concha do NAcc	51
<b>FIGURA 7.</b> Microinjeção de DNQX nas sub-regiões do NAcc e seus efeitos sobre o nível de ansiedade no LCE – % de entrada no braço aberto (%EA).	52
<b>FIGURA 8.</b> Microinjeção de DNQX nas sub-regiões do NAcc e seus efeitos sobre o nível de ansiedade no LCE – % de tempo de permanência no braço aberto (%TA).	53

- FIGURA 9.** Microinjeção de DNQX nas sub-regiões do NAcc e seus efeitos 54  
sobre o nível de ansiedade no LCE – Em relação ao número de entradas  
no braço aberto (EA)
- FIGURA 10.** Microinjeção de DNQX nas sub-regiões do NAcc e seus 55  
efeitos sobre a locomoção no LCE – número de entradas no braço  
Fechado (EF)
- FIGURA 11.** Microinjeção de DNQX nas sub-regiões do NAcc e seus 56  
efeitos sobre a exploração geral no LCE – número total de entradas  
efetuadas (TE)
- FIGURA 12.** Representação das seções coronais ilustrando os locais 60  
atingidos pela microinjeção de veículo e CNQX (2,5 e 5,0nmol) nas sub-  
regiões centro e concha do NAcc
- FIGURA 13.** Microinjeção de veículo e CNQX nas sub-regiões do NAcc e 61  
seus efeitos sobre o nível de ansiedade na caixa de ingestão/Avaliação de  
Risco

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1:</b>	57
Análise de variância (ANOVA) de três vias indicando valores de “F” para os efeitos principais e para as interações entre os fatores no LCE.	
<b>TABELA 2:</b>	58
Algumas variáveis etológicas exibidas no LCE pelas fêmeas de ratos que receberam microinjeção bilateral de salina, veículo ou DNQX na sub-região centro e concha do NAcc.	
<b>TABELA 3:</b>	62
Resultados da ANOVA de duas vias indicando os efeitos principais e as interações entre os fatores na caixa de ingestão.	
<b>TABELA 4:</b>	63
Variáveis comportamentais exibidas por ratos durante a avaliação da ingestão de alimento após a microinjeção bilateral de CNQX no NAcc.	

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- %EA – Porcentagem de entrada nos braços abertos do LCE
- %TA – Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do LCE em relação ao tempo total do teste
- AcbC – Centro do núcleo accumbens
- AcbSh – Concha do núcleo accumbens
- aca – Parte anterior da comissura anterior
- acer – Artéria cerebral anterior
- AL – Auto-limpeza
- AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
- AN – Anorexia nervosa
- ANOVA – Análise de variância
- ATV – Área tegmental ventral
- AP – Anterior à linha interaural
- BA – Braço aberto do labirinto
- BDZ – Benzodiazepínicos
- BF – Braço fechado do labirinto
- cc – Corpo caloso (gcc)
- CB – Células ponte do striatum ventral
- CEUA – Comitê de Ética para o uso de animais
- CNQX – 6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
- CPm – Córtex pré-frontal medial
- Cpu – Caudado putâmem
- DAMGO – Agonista seletivo do receptor  $\mu$ - opióide
- DMSO – Solução de dimetilsulfóxido
- DNQX – 6,7-Dinitroquinoxalina-2,3-diona
- DV – Localização dorso-ventral abaixo da dura máter
- E – Camada endodimal e subependimal
- EA – Número de entrada nos braços abertos do labirinto
- EF – Número de entrada nos braços fechados do labirinto
- E<sub>1</sub> – Primeira exposição ao LCE
- E<sub>2</sub> – Segunda exposição ao LCE

EV – Exploração vertical

GABA – Ácido-gama-aminobutírico

GABA<sub>A</sub> – Receptor do neurotransmissor ácido-gama-amino butírico

GABA<sub>B</sub> – Receptor do neurotransmissor ácido-gama-amino butírico

GLU – Glutamato

GLUKA1-2 – Subunidade receptor cainato

GLUKA5-7 – Subunidade receptor cainato

GLUR1-4 – Subunidade do receptor AMPA

ICj – Ilhas Callejas

ICjM – Ilhas Callejas maior

i.p – Via intraperitoneal

L – Localização lateral para cada um dos lados da sutura sagital

LAcSh – Concha lateral do núcleo accumbens

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

LH – Hipotálamo lateral

LSD – Parte dorsal do núcleo septal lateral

LSI – Parte intermediária do núcleo septal lateral

LSS – Striatum lateral

LV – Ventrículo lateral

MC – Mergulho da cabeça

MO – Microscópio Óptico

MS – Núcleo septal medial

NAcc – Núcleo Accumbens

NBQX – 2,3dioxo-6-nitro-1,2,3,4,tetrahidrobenzo-quinoxalina-7-sulfonamida  
dissódica

NMDA – N-Metil-D-aspartato

NR1 – Subunidade do receptor NMDA onde se liga glicina

NR2 – Subunidade do receptor NMDA onde se liga glutamato

NR – Núcleo da rafe

NS – Valores de probabilidade não significativos

TE – Número total de entradas efetuadas no LCE

VDB – Núcleo da banda diagonal e limbo vertical

VP – Pálido ventral.

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Núcleo Accumbens: aspectos gerais**

O Núcleo Accumbens (NAcc) é um componente dos núcleos da base, situado na região do prosencéfalo basal. Tradicionalmente, os núcleos da base são representados pelo claustrum, corpo amigdalóide, núcleo caudado, putâmen e globo pálido. Estes três últimos núcleos constituem o corpo estriado (HEIMER et al, 2003). O corpo estriado se divide em uma área mais antiga, chamada de paleoestriado ou pallidum (globo pálido), e uma mais recente, denominada neoestriado ou simplesmente striatum, que compreende o putâmen e o caudado. A esse esquema de organização do corpo estriado, veio juntar-se, mais recentemente, a concepção de corpo estriado ventral, formado por extensões ventrais do striatum e do pallidum que têm conexões com áreas corticais do sistema límbico e, desse modo, participam da regulação do comportamento emocional. Essa extensão ventral do pallidum (pálido ventral) corresponde ao território anteriormente incluído na substância inominada de Reichert e situa-se adjacientemente ao feixe prosencefálico medial (HEIMER, 1995) e ao núcleo basal de Meynert. Por vezes esse núcleo de Meynert é utilizado como sinônimo de substância inominada (HEIMER, 1995) e está funcionalmente relacionado aos mecanismos de vigília e atenção (HAINES, 2006; HEIMER & VAN HOESEN, 2006).

Conjunta e superiormente, striatum e pálido ventrais são como que cobertos pelo braço anterior da cápsula interna, que contém fibras de projeção

para o córtex pré-frontal e cingular anterior (HEIMER et al, 2003). Já medialmente ao striatum e ao pálido ventrais, localiza-se a porção do hipotálamo que forma a parte inferior da parede ipsolateral do terceiro ventrículo (RIBAS, 2007).

É importante ressaltar que, enquanto o striatum recebe projeções de toda a extensão cortical, o globo pálido se projeta predominantemente para as áreas corticais anteriores (HEIMER e VAN HOESEN, 2006), podendo, no entanto, também influenciar outros processos perceptivos como, por exemplo, visuais e de discriminação de objetos, através da sua interação com áreas corticais mais posteriores. Alguns autores conceituam o striatum ventral e o pálido ventral como regiões dos núcleos da base que abrigam o sistema córtico-estriatal-palidal ventral, distinto do clássico sistema córtico-estriatal-palidal dorsal, relacionando-os com atividades motoras e com implicações neuropsiquiátricas (HAINES, 2006; MELLO e VILARES, 1997).

Além disso, o striatum ventral compreende a área que abriga o NAcc e as porções mediais/ventrais do putâmen, além da cabeça do núcleo caudado. Assim, o NAcc é topograficamente situado à porção do striatum em que o putâmen e a cabeça do núcleo caudado encontram-se unidas sob o braço anterior da cápsula interna (HEIMER et al, 2003; HEIMER & VAN HOESEN, 2006).



fonte proeminente de informação sensorial e motora para o striatum. A chegada desta fonte de informações, possivelmente, facilitou o papel dos núcleos da base no controle do movimento (VEENMAN, 1995).

Em ratos, o NAcc é um dos principais componentes da região do striatum ventro-medial (MALDONADO-IRIZARRY, et al, 1995). Este núcleo está envolvido em vários processos comportamentais, tais como: atividades motoras (GARGIULO, 1996) motivação e reforço (SALAMONE, 1994), e também nas funções cognitivas (USIELLO et al, 1998).

Mogenson, em 1980, publicou um trabalho considerando o NAcc como uma interface essencial entre motivação e ação, ou seja, como um elemento chave na integração da afetividade e cognição com as ações motoras voluntárias. Nesse período, foram realizadas muitas pesquisas sobre a anatomia do cérebro de roedores a fim de se investigar a interface entre o sistema límbico e motor. Paralelamente, os mecanismos neuronais, por meio dos quais a motivação pode ser convertida em ação, também foram amplamente estudados. Segundo Mogenson, o NAcc é um componente fundamental desta interface neuronal, pois recebe aferências de estruturas do prosencéfalo límbico, direta ou indiretamente, através da área tegmental ventral (ATV), e envia sinais para o sistema motor através do globo pálido (MOGENSON et al, 1980).

O NAcc pode ser considerado uma região de interconexão, recebendo projeções de células dopaminérgicas, situadas na ATV, e atua como um local de convergência para estímulos procedentes da amígdala, hipocampo, área

cingulada anterior e parte do lobo temporal. Do NAcc, partem eferências para o hipotálamo, área cingulada anterior e lobos frontais. Neurônios dopaminérgicos na ATV modulam a atividade de neurônios dentro do NAcc (KELLEY, 2004).

O NAcc, a partir daí, tem sido considerado potencialmente envolvido na atividade de locomoção, sendo que esta capacidade locomotora é um dos componentes de ataque e de defesa que facilita a procura pelos alimentos e que permite outros comportamentos, incluindo o reprodutivo, além de estar diretamente relacionada a mecanismos de adaptação e de sobrevivência das espécies. O NAcc também tem sido envolvido nas respostas motoras orais, utilizadas na alimentação, na ingestão de água, na vocalização e em outras respostas adaptativas (MOGENSON et al, 1980).

O papel do NAcc e sua relação funcional com a ATV e o globo pálido tem sido amplamente investigado por diversos laboratórios de pesquisa que o apontam como uma interface límbico-motora (MOGENSON et al, 1980). De acordo com essa interface límbico-motora, considera-se que para iniciar uma ação é necessário que diversas estruturas do prosencéfalo límbico, também denominado de cérebro emocional, realizem variados processos cognitivos, envolvendo experiências prévias e aprendizagem. Ainda que a proposta desse modelo inclua a necessidade de realização de mais pesquisas para verificar como o cérebro emocional e o cognitivo operam juntos na iniciação da resposta motora, pode-se dizer que o NAcc recebe convergência de informações de regiões cerebrais envolvidas na aprendizagem emocional,

memória e cognição. Algumas dessas regiões são, por exemplo, a amígdala, o hipocampo, o tálamo e o córtex pré-frontal (MOGENSON et al, 1980).

Em suma, o NAcc tem um papel crucial nos comportamentos envolvidos com os processos naturais de recompensa, controle motivacional, ingestão de alimento, comportamento sexual e aprendizagem instrumental (KELLEY et al, 2002, 2005).

## **1.2 Núcleo Accumbens: as sub-regiões**

No início da década de 1990, o NAcc, embora já considerado um substrato importante na mediação de efeitos reforçadores de substâncias estimulantes psicomotoras, foi alvo de uma relevante reorganização anatômica, embasada na análise das suas conexões neurais e no seu perfil histoquímico. A partir daí, o NAcc passou a ser considerado uma estrutura heterogênea, contendo pelo menos duas sub-regiões anatômicas e funcionalmente distintas: o centro (o termo inglês *core* será traduzido como centro) que compreende a área ao redor da comissura anterior e a concha (o termo inglês *shell* será traduzido como concha), uma região que se estende medianamente, ventralmente e lateralmente ao redor do centro (ZAHM e HEIMER, 1990; HEIMER et al., 1991; JONES et al., 1996; DAVID et al., 1998; KELLEY e BERRIDGE, 2002).

As sub-regiões do centro e da concha possuem diferenças em relação às suas aferências e eferências (ZAHM e BROG, 1992). Em ratos, as sub-

regiões concha e centro também podem ser reconhecidas por possuírem diferentes conexões e especificidades neuroquímicas, além de identidades funcionais distintas. O centro assemelha-se em vários aspectos ao complexo caudado-putâmen por seu caráter striatal; e a concha apresenta, além das características striatais, uma diversidade muito maior de características neuroquímicas e de conexões aferentes e eferentes. (GROENEWEGEN et al, 1996).

Embora tanto o centro quanto a concha recebam aferências do hipocampo, a região do subículo ventral projeta-se principalmente para a concha, enquanto o subículo dorsal projeta-se para o centro. Paralelamente, diferentes regiões do córtex pré-frontal projetam-se para diferentes áreas do NAcc, como por exemplo, a área pré-límbica que projeta-se para o centro, enquanto a área infra-límbica e o córtex piriforme projetam-se para a concha (BROG et al, 1993). Alguns sub-compartimentos específicos da amígdala também alcançam sub-regiões do NAcc, principalmente a região da concha (WRIGHT et al, 1996). Em relação às eferências, o centro conecta-se com estruturas clássicas do gânglio basal, que são sistemas de saída, tais como: o pálido ventral, o núcleo subtalâmico e a substância negra, enquanto a sub-região da concha projeta-se preferencialmente para regiões subcorticais límbicas, tais como o hipotálamo lateral (LH), a ATV, a região do pálido ventral ventro-medial e para os centros autonômicos do tronco cerebral (USUDA et al, 1998; KELLEY, 2004).

A concha do NAcc apresenta interconexões entre circuitos corticais e circuitos do hipotálamo e do tronco cerebral (KELLEY, 2004). Tem sido

sugerido que a inervação da região da concha é especialmente responsiva à ingestão, em experimentos sobre alimentação (TANDA e DI CHIARA, 1998; BASSAREO e DI CHIARA, 1999), e no uso e abuso de drogas (DI CHIARA et al., 1993; PONTIERI et al., 1995; CARLEZON e WISE, 1996; TANDA et al., 1997). A partir deste enfoque, a concha é considerada um importante componente de um sistema neuronal envolvido no comportamento de ingestão de alimentos em ratos (STRATFORD, 2005). Também, em ratos saciados, os antagonistas glutamatérgicos promovem uma específica resposta comportamental de ingestão de alimento (STRATFORD et al., 1998; MALDONADO-IRIZARRY et al., 1995).

Especificamente na concha do accumbens, a transmissão dos aminoácidos atua como uma espécie de interruptor do circuito central, visando flexibilizar o início ou o término do ato de consumir alimentos, através das vias de conexões descendentes para os sistemas hipotalâmicos de controle da ingestão (BALDO e KELLEY, 2007).

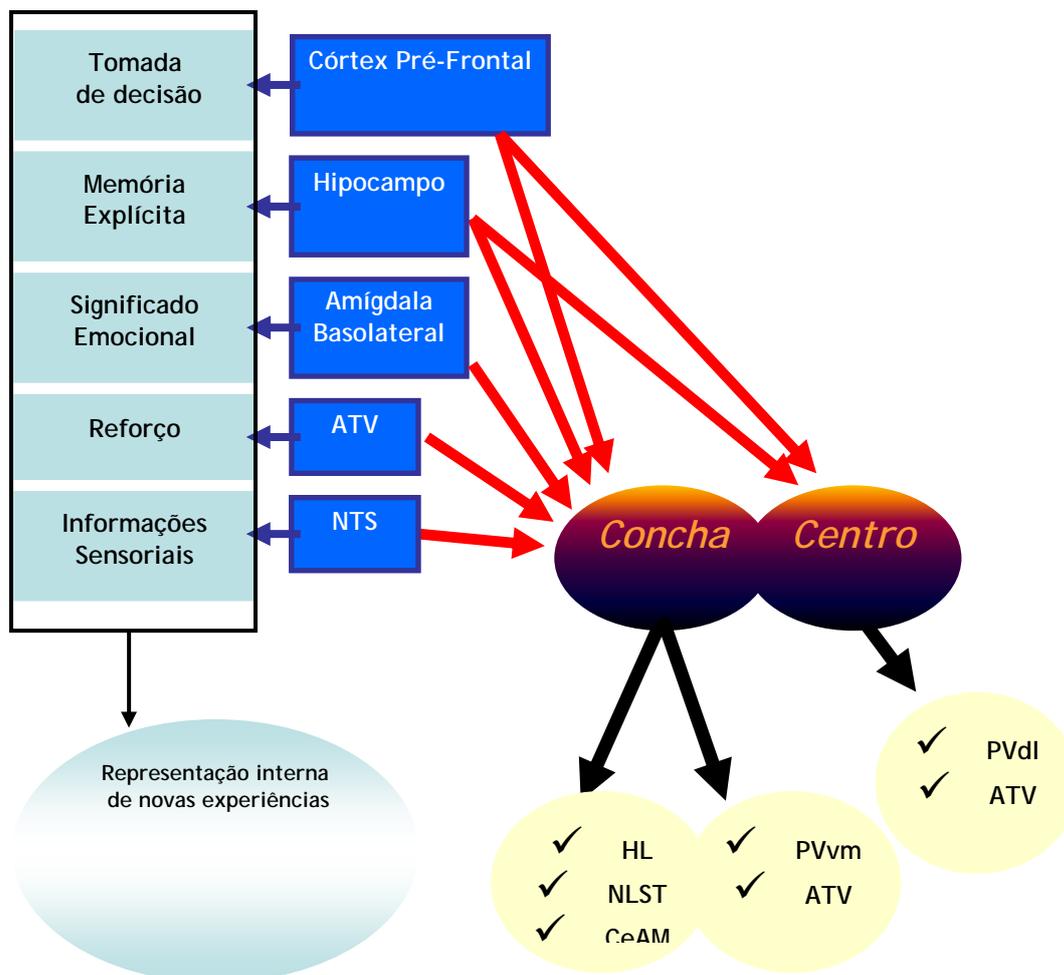
Em relação ao que vem sendo investigado sobre a sub-região do centro do NAcc, estudos sugerem que este núcleo está envolvido tanto na resposta de aprendizagem (KELLEY et al., 1997) quanto em uma resposta comportamental que está sujeita a um estímulo condicionado (BASSAREO e DI CHIARA, 1999; DI CHIARA e IMPERATO, 1998; PARKINSON et al., 1999b, 2000).

Sendo assim, o NAcc tem um papel chave nos circuitos neuronais que são responsáveis por comportamentos dirigidos a um determinado alvo, tais como aqueles que fundamentam a procura compulsiva por drogas em

indivíduos dependentes de cocaína (KELLEY, 1999b; GROENEWEGEN e UYLINGS, 2000).

### **1.3 Núcleo Accumbens e cérebro emocional**

O NAcc está relacionado à função de interação, comunicando-se com as regiões límbicas e, portanto, emocionais. Sendo assim, o sistema límbico ou emocional compreende tanto o córtex como sistemas sub-corticais, incluindo a formação hipocampal, o complexo do núcleo amigdalóide, o hipotálamo, o córtex cingulado, a ATV, outras áreas importantes do córtex pré-frontal e o próprio NAcc (DUGAL, 2003). O termo sistemas emocionais engloba cada uma destas áreas e sua distribuição para o prosencéfalo, mesencéfalo e hipotálamo. Estas regiões são interconectadas e, na maioria das vezes, por vias recíprocas, ou seja, por via de mão dupla entre o prosencéfalo e mesencéfalo límbico, sendo que ainda, do prosencéfalo límbico, partem projeções para a região do tronco cerebral e do mesencéfalo, justificando o termo área mesencefálica límbica (MORGANE et al, 2005). Alguns sistemas de neurotransmissores têm sido investigados na tentativa de se compreender melhor algumas dessas complexas redes neurais. Na figura 2 estão representadas algumas áreas dos sistemas emocionais e vias que, provavelmente, estão envolvidas em um fluxo de informações que podem gerar comportamentos emocionais (MORGANE et al, 2005; DUGAL, 2003).



**Figura 2.** Esquema representando as sub-regiões concha e centro do NAcc e algumas de suas aferências e eferências. ATV: área tegmental ventral; NTS: núcleo do trato solitário; HL: hipotálamo lateral; NLST: núcleo lateral da estria terminal; CeAM: núcleo central da amígdala; PVvm: núcleo ventro-medial do pálido ventral; PVdl: núcleo dorso-lateral do pálido ventral.

O cérebro emocional está organizado em termos de elaboração e coordenação de variados e complexos padrões de comportamento (RAMNANI et al, 2002; MORGANE et al, 2005). Nesse sentido, processos complexos

como a inteligência, a memória, a aprendizagem e a personalidade não apresentam uma localização específica, ou seja, não podem ser representadas como um *lócus*, porém são consideradas propriedades emergentes das atividades neuronais realizadas dentro de sistemas funcionais bem distribuídos. Em outras palavras, estes aspectos são considerados reflexos de funções integrativas, isto é, uma reunião de complexas redes funcionais (RAMNANI et al, 2002).

Estes aspectos são decorrentes de dois processos que suportam as funções cerebrais. Um deles é a segregação funcional, a qual objetiva localizar as funções de grupos celulares específicos. O outro processo é a integração funcional, na qual as funções são interpretadas em termos de fluxo de informações entre diferentes áreas cerebrais (ROBERTS, 1966; KOTTER e MEYER, 1992).

Tal fluxo de informações, em redes neuronais específicas, é responsável pela formação da memória, adição e plasticidade, por exemplo. Envolve, ainda, sistemas de neurotransmissores, como por exemplo, a serotonina, dopamina, noradrenalina, o ácido-gama-amino butírico (GABA), o glutamato e a acetilcolina, os quais são importantes nos estados de vigília, de reforço e na regulação das atividades da região septo-hipocampal específicas (MORGANE et al, 2005).

#### **1.4 Núcleo Accumbens: uma visão geral da neuroquímica**

No NAcc alguns sistemas de neurotransmissores estão envolvidos com as informações processadas em diversas regiões do cérebro e do tronco cerebral. Alguns desses sistemas são bem conhecidos.

O sistema serotoninérgico exerce um papel importante no controle de funções cerebrais complexas como aprendizagem, memória e regulação cerebral através de diferentes estágios do ciclo sono – vigília (JACOBS e AZMITIA, 1992). A serotonina também está envolvida na regulação de vários sistemas do cérebro límbico (KOOB, 2000). Antagonistas serotoninérgicos reduzem o aumento de dopamina no córtex pré-frontal e no NAcc (COSTALL et al, 1990). Sendo assim, a serotonina deve modular a liberação de dopamina no prosencéfalo límbico por induzir a sua liberação na ATV (MORGANE et al, 2005). A dopamina liberada no prosencéfalo e, especialmente no NAcc, tem sido associada com os efeitos reforçadores do uso de drogas (SALAMONE et al, 2003). Recentemente, Baldo e Kelley (2007) propuseram que o processo de ativação do sistema motor deve estar dissociado sendo que a dopamina deve estar associada à procura por alimentos e a liberação do peptídeo opióide na região striatal deve influenciar o comportamento relacionado à sensação de prazer (BALDO e KELLEY, 2007).

Quanto à transmissão dopaminérgica, parece que esta ainda deve ser importante na memória de associação entre as ações motoras e a capacidade de atingir um determinado alvo, possivelmente nas representações neurais correspondentes ao resultado de uma recompensa (BALDO e KELLEY, 2007).

Nos últimos anos, evidências têm-se acumulado, sugerindo que estes processos são possibilitados por áreas cerebrais e por sistemas de neurotransmissores distintos dentro do mesmo sítio do núcleo accumbens. As teorias sobre as funções dopaminérgicas divergem sobre vários pontos, mas há uma aceitação geral de que a dopamina está envolvida na mediação da ativação motora (BALDO e KELLEY, 2007).

O NAcc, além de receber aferências dopaminérgicas da ATV, recebe também aferências glutamatérgicas do córtex pré-frontal, amígdala basolateral, subículo inferior do hipocampo e núcleos hipotalâmicos intralaminares (KELLEY e DOMESICK, 1982; BERENDSE et al., 1992; SHINONAGA et al., 1994). O glutamato (GLU), principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), atua em circuitos neuronais envolvidos com a plasticidade sináptica, tais como, aprendizagem e memória emocionais (Da CUNHA et al., 2005), e em circuitos relacionados à ingestão de alimentos (RUMPEL et al, 2005).

French e Totterdell (2003) demonstraram que neurônios aferentes glutamatérgicos, provenientes do córtex pré-frontal, do hipocampo e da região basolateral da amígdala podem se sobrepor na modulação de neurônios gabaérgicos, salientando a função integradora do NAcc (FRENCH e TOTTERDELL, 2003).

Circuitos glutamatérgicos envolvidos no comportamento alimentar, especialmente aqueles localizados no NAcc, foram altamente conservados durante a evolução biológica (KELLEY, 2004). Entretanto, cerca de 90 % do

núcleo accumbens compõem-se de neurônios médios espinhais, essencialmente gabaérgicos (MEREDITH, 1999).

Vários comportamentos direcionados à execução de uma ação específica são considerados como sendo regulados por projeções glutamatérgicas que se originam em regiões límbicas do córtex frontal, as quais convergem sobre os neurônios médios espinhais do NAcc (HEIDBREder e GROENEWEGEN, 2003). O córtex cingulado anterior projeta-se para o NAcc por uma via de projeções glutamatérgicas (CARDINAL et al, 2002) e constitui uma parte do córtex pré-frontal medial que tem sido fortemente relacionado com o processamento emocional.

Devido ao fato de que grande parte dos neurotransmissores GABA é liberada no núcleo accumbens (SUN e CASSEL, 1993; CHURCHILL e KATIVAS, 1994; KAWAGUCHI et al., 1995; VAN BOCKSTAELE e PICKEL, 1995; MEREDITH, 1999), o efeito dos agonistas gabaérgicos deve revelar, principalmente, como os micro-circuitos do NAcc organizam os comportamentos de apetite versus comportamentos defensivos (REYNOLDS e BERRIDGE, 2003). Os circuitos do NAcc estão organizados em duas maneiras distintas para alcançar o controle basal clássico do sistema motor: por conexões às estruturas do núcleo pálido que processam informações para o córtex motor (voluntário), e por projeções diretas aos circuitos hipotalâmicos que se comunicam com os centros de controle motor e autonômico (KELLEY et al., 2005).

A inibição funcional dos neurônios do NAcc pelos antagonistas glutamatérgicos induz efeito ansiolítico em ratos (MARTINEZ et al., 2002), ou a estimulação pelos receptores GABAA e GABAB (STRATFORD e KELLEY, 1997) induz hiperfagia em animais saciados. Este efeito hiperfágico é semelhante ao encontrado no estudo de Berridge e Valenstein (1991) que utilizaram estimulação elétrica no hipotálamo lateral (HL - BERRIDGE & VALENSTEIN, 1991). A administração local de agonista do receptor do glutamato no HL também induz a hiperfagia (DUVA et al., 2001).

### **1.5 Receptor glutamatérgico do tipo AMPA**

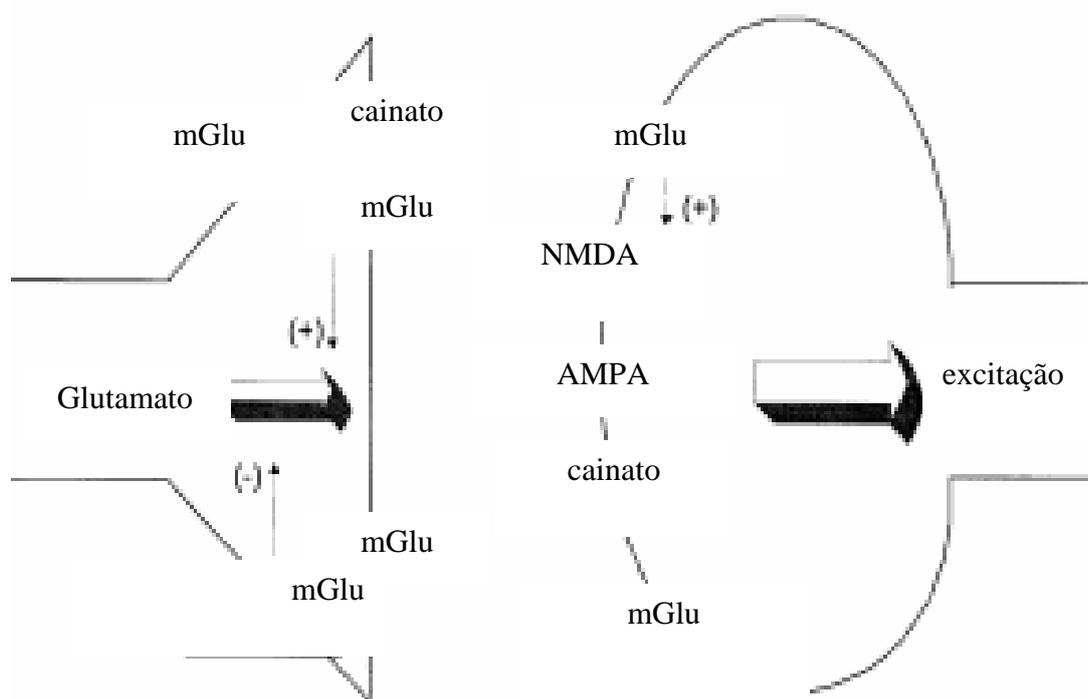
Glutamato é um aminoácido que age como principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central. Durante anos pensou-se que o efeito do glutamato no cérebro fosse mediado exclusivamente através de canais iônicos. Entretanto, a partir das duas últimas décadas, vários estudos permitiram categorizar dois tipos de receptores de glutamato: metabotrópico e ionotrópico. Esta classificação é baseada sobre o acoplamento intra e extracelular e sobre diferentes características farmacológicas e bioquímicas (Figura 3 - BERGINK, 2004).

Os receptores metabotrópicos são ligados à proteína G e, embora sejam freqüentes nos mesmos neurônios que possuem os receptores ionotrópicos, interagindo em quase todos os casos dentro de complexas redes neurais, estes não serão discutidos neste trabalho.

Os receptores ionotrópicos são compostos por quatro ou cinco subunidades formando um poro central com condutância para  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Na}^+$  e incluem três importantes grupos: N-Metil-D-aspartato (NMDA), cainato e  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA), classificados por características específicas conforme a sua união com o agonista (NAKANISHI, 1992; HOLLMANN e HEINEMANN, 1994).

O subtipo NMDA possui várias subunidades, porém a combinação de duas subunidades de NR1 (onde se liga glicina) e NR2 (onde se liga glutamato) constitui os receptores presentes em maior número no SNC (DINGLELINE et al, 1999). Os receptores AMPA são formados por subunidades GLUR1-4 (BOULTER et al., 1990) e os receptores cainato possuem subunidades denominadas GLUKA5-7 e GLUKA1-2 (HUETTNER, 2003).

Em muitas sinapses no SNC, o receptor NMDA coexiste com receptores cainato e com receptores AMPA. A ativação de receptores AMPA e Cainato promove uma corrente de despolarização que evoca uma resposta sináptica rápida, induzindo a ativação de receptores NMDA que são voltagem-dependente, ou seja, tanto AMPA quanto Cainato mediam a transmissão sináptica excitatória rápida (COTMAN et al., 1995).



**Figura 3:** Subtipos de receptores Glutamatérgicos

Fonte: BERGINK, V. et al., **European Neuropsychopharmacology** 2004, 14: 175-183.

Dessa forma o processamento neural depende de uma ação balanceada dos receptores glutamatérgicos de diferentes classes (BERGINK, 2004). Por exemplo, a neurotransmissão glutamatérgica desempenha função fundamental na cognição, na aprendizagem e memória (DAVIS et al., 1994; MAREN, 1996; LEDOUX, 1994). A densidade dos receptores NMDA é alta em regiões límbicas e corticais. A distribuição dos receptores AMPA e cainato é similar àquelas exibidas pelos receptores NMDA, consistindo em uma ação comum, como um par funcional. (KRYSTAL et al., 1999). A localização destes receptores está relacionada ao seu papel na cognição, percepção e humor (KRYSTAL et al., 1999).

Embora os receptores AMPA sejam abundantes no NAcc (BERNARD et al., 1997; CHEN et al., 1998) a regulação de suas expressões pode ser diferenciada, visto que a exposição de ratos a diferentes ambientes ou ambientes enriquecidos altera a expressão de receptores NMDA, mas não de receptores AMPA, tanto na concha quanto no centro do NAcc (WOOD et al., 2005).

Desse modo, o ciclo, a taxa de renovação e a inserção celular de receptores AMPA e NMDA são regulados independentemente (ZHOU et al., 2001). Além disso, o número de receptores AMPA, diferentemente dos receptores NMDA, não diminuem em função do desenvolvimento (BOTTJER, 2002), embora possam rapidamente aumentar logo após a aprendizagem (BRETT e NICOLL, 2003).

Também tem sido sugerido que 25% dos receptores AMPA e cainato estão envolvidos na regulação pré-sináptica da liberação de dopamina. Isto indica que receptores AMPA no NAcc de ratos estão localizados sobre os terminais pré-sinápticos de fibras dopaminérgicas reforçando o papel dos receptores AMPA, na regulação pré-sináptica da liberação de dopamina no striatum de ratos (ZAVITSANOU et al, 1996).

## **1.6 Envolvimento do NAcc no controle da ingestão de alimento**

O NAcc está situado em uma região anatômica estratégica que permite a sua participação no controle neural da ingestão de alimento. Este núcleo tem sido muito utilizado para investigar como a integração de estímulos internos e externos ao organismo (do meio ambiente) regulam a ingestão de alimento ou apetite, e como o NAcc pode influenciar as vias eferentes no controle da alimentação (KELLEY, 2004).

O NAcc recebe informações do tronco cerebral, relacionadas ao paladar e às funções viscerais, através de aferências do núcleo do trato solitário para a região medial da concha, bem como através de uma via indireta do córtex gustatório, passando pelo tálamo gustatório e daí alcançando a concha lateral e centro do NAcc (RICARDO, 1978; SAPER, 1982). Tanto o paladar quanto as informações do trato gastrointestinal podem influenciar o NAcc por duas vias que passam pela amígdala: uma que se projeta do núcleo do trato solitário para o núcleo central da amígdala, e área tegmental ventral, e a outra envolvendo projeções do córtex gustatório até a amígdala basolateral e daí para o núcleo accumbens (McDONALD e JACKSON, 1987). Essas vias de sinalização interna para a manutenção da homeostasia que alcançam o NAcc incluem as projeções do hipotálamo lateral para a região medial da concha (KELLEY, 2004).

Muitas vias eferentes do centro do NAcc chegam até circuitos clássicos de controle motor, como por exemplo, os que envolvem os núcleos da base, enquanto que os principais sistemas eferentes da concha envolvem regiões do

núcleo pálido ventro-medial e hipotálamo lateral (KELLEY, 2004). Essas projeções descendentes para o hipotálamo lateral envolvem estruturas que controlam diretamente os padrões originados pelo tronco cerebral na realização de ações motoras e autonômicas relacionadas com o ato de comer.

Em resumo, verifica-se que tanto a concha quanto o centro comunicam-se extensivamente com vários circuitos que controlam a percepção do paladar, o balanço energético, a função autonômica visceral e os efetores somato-motores relacionados com a ingestão de alimentos (KELLEY, 2004; STRATFORD et al., 1998).

No NAcc o comportamento de ingestão parece ser regulado por múltiplos sistemas de neurotransmissores como o glutamato, GABA, opióides e dopamina (KELLEY et al, 2005). Em relação a neurotransmissão glutamatérgica, embora haja um consenso de que os receptores AMPA localizados no NAcc sejam importantes na modulação da ingestão de alimentos, existem dados conflitantes relacionados ao efeito da ativação desses receptores no NAcc sobre a ingestão de alimento. Por exemplo, a administração de um agonista do receptor AMPA aumentou, de forma dose-dependente, a ingestão de alimento em ratos saciados, quando administrado na concha do NAcc (ECHO et al, 2001), em semelhança ao que ocorre quando o mesmo agonista é microinjetado no hipotálamo lateral (KHAN et al, 1999; STANLEY et al, 1996; STANLEY et al, 1993).

Entretanto, também, tem sido demonstrado que a microinjeção de antagonistas dos receptores AMPA na concha do NAcc, mas não no centro,

induz hiperfagia em ratos, sugerindo que a neurotransmissão glutamatérgica na concha do NAcc pode inibir tonicamente a ingestão de alimentos (KELLEY e SWANSON, 1997; STRATFORD et al., 1998; REYNOLDS e BERRIDGE, 2003).

De acordo com os estudos de Ann Kelley, essa resposta hiperfágica, induzida pela microinjeção de antagonista AMPA na concha do NAcc, era semelhante àquela induzida pela estimulação elétrica do LH, e poderia ser bloqueada pela microinjeção simultânea de muscimol no LH, sugerindo que o NAcc poderia modular a ingestão de alimento através do LH (KELLEY, 2004). Ann Kelley propôs, então, que o efeito hiperfágico induzido pela microinjeção de antagonista AMPA seria decorrente da remoção da influência excitatória que as aferências glutamatérgicas exerceriam sobre neurônios gabaérgicos do NAcc, os quais inibiriam o hipotálamo lateral, e conseqüentemente a ingestão de alimento. Desse modo, o bloqueio dos receptores AMPA na concha do NAcc, resultaria em desinibição do hipotálamo lateral, favorecendo o aparecimento de intensa ingestão de alimento (KELLEY, 2004). Essa teoria tem sido corroborada por estudos demonstrando que a inibição da concha do NAcc com a microinjeção de muscimol, agonista dos receptores GABA<sub>A</sub>, ou baclofem, agonista do GABA<sub>B</sub>, também induz significativo aumento da ingestão de alimento (LOPES et al., 2007).

Ann Kelley também tem postulado que a via concha do NAcc - hipotálamo lateral constitui uma importante rota de comunicação entre mecanismos hipotalâmicos e estriatais no controle do comportamento motivado (KELLEY, 1999), com a concha do accumbens agindo como uma espécie de

sentinela sensorial, tendo como função ligar e desligar a via descendente responsável pela origem dos padrões motores, relacionados com alimentação, via hipotálamo lateral (KELLEY, 2004). Entretanto, a possível ocorrência de hiperfagia e ansiólise ainda não foi avaliada em relação ao bloqueio do receptor AMPA no NAcc. A relação NAcc/medo/ingestão tem importante implicação clínica e deve ser mais investigada, uma vez que estes diferentes estados motivacionais são rompidos em alguns transtornos psiquiátricos, tal como anorexia e bulimia (PATRICK, 2002).

### **1.7 Labirinto em cruz elevado**

O Labirinto em cruz elevado (Figura 4) é um modelo animal baseado no comportamento exploratório de roedores. O modelo é simples, barato, não utiliza choques elétricos como fonte de motivação aversiva e já foi validado como útil no estudo da ansiedade em animais (PELLOW et al, 1985).

O LCE tem favorecido o aumento do conhecimento acerca da neurobiologia do comportamento relacionado à ansiedade em roedores. Conforme pesquisa no sítio [www.entrezpubmed.com](http://www.entrezpubmed.com) com a palavra chave “*plus maze*”, cerca de 2.900 artigos foram publicados sobre o tema desde a sua criação, por Handley e Mithany, em 1984, com uma média de 120 artigos anuais. O LCE é um modelo animal baseado no conflito em explorar um novo ambiente e evitar uma situação de perigo em potencial durante esta exploração. Ao longo da exposição, os animais esquivam-se dos braços abertos, preferindo explorar os braços fechados. Esta preferência pelos braços

fechados tem sido atribuída ao baixo nível de luminosidade do braço fechado (ORLANDI PEREIRA, et al., 2005) e à presença de superfície vertical que permite o comportamento tigmotático nos braços fechados do labirinto (TREIT et al., 1993).

No LCE, algumas variáveis comportamentais têm sido consideradas como indicativas do nível de ansiedade dos animais. A porcentagem de entradas nos braços abertos e a porcentagem de tempo que o animal permanece nos braços abertos são consideradas variáveis comportamentais representativas da exploração dos braços abertos e são negativamente relacionadas ao nível de ansiedade do animal (FILE, 1992).

Desse modo, quanto maior o nível de ansiedade do animal, menor a exploração dos braços abertos do labirinto, e vice e versa. O número de entrada nos braços fechados tem sido considerado uma variável representativa da atividade locomotora do animal (FILE, 1992).

Além do nível de ansiedade do animal, o LCE também tem incorporado variações metodológicas que permitem avaliar a ocorrência de aprendizagem. Uma delas é a análise temporal (avaliação minuto a minuto) na qual se avalia como uma variável comportamental específica se comporta ao longo do tempo (RODGERS et al, 1996; ORLANDI PEREIRA et al., 2005; ROSA et al., 2000). Quando o comportamento exploratório de roedores é fracionado em blocos de 1 minuto, observa-se que o animal exhibe, ao final da exposição, um aumento da esquia dos braços abertos em comparação com o início da exposição (HOLMES e RODGERS, 1998; RODGERS et al., 1996; ROSA et al., 2000),

mostrando que a experiência em um dado minuto no LCE altera a exploração no minuto seguinte. Portanto, a esquivas dos braços abertos aumenta do início para o final do teste.

Outra variação metodológica no LCE que permite avaliar aprendizagem/memória é a dupla exposição ao labirinto, é a incorporação de uma sessão re-teste (usualmente 24h após a primeira exposição;  $E_1$ ). Quando re-exposto ao LCE ( $E_2$ ), o animal exibe elevada esquivas dos braços abertos em relação à  $E_1$ , com um significativo encurtamento das variáveis comportamentais representativas da exploração dos braços abertos (GHIZONI et al., 2006; HOLMES & RODGERS, 1998; RODGERS et al., 1996; ROSA et al., 2000). Este fato indica que a experiência prévia altera significativamente a exploração subsequente ao LCE, com o animal adquirindo um aumento do nível de ansiedade (efeito ansiogênico) durante a primeira exposição que é evocada durante a segunda exposição ao labirinto (FILE, 1993; FILE e ZANGROSSI, 1993). Ambas as análises, temporal e re-teste, tornaram-se ferramentas usuais para a avaliação das mudanças de comportamento, dependentes da experiência prévia, ou seja, do processo de aprendizagem decorrente da exploração do LCE. Uma vez que a esquivas dos braços abertos é motivada pela aversão que o animal demonstra pelos espaços abertos e ou iluminados, é possível assumir que ratos desenvolvem aprendizagem emocional durante a exposição ao LCE.

Estados emocionais são expressos através de respostas comportamentais e fisiológicas. Como resposta fisiológica existe a liberação de adrenalina da medula adrenal que induz hiperglicemia, preparando o

organismo para a reação de luta ou fuga. Visto que o controle da estratégia defensiva a ser adotada depende de processos de natureza cognitiva (GRAEFF, 1994), um estado hiperglicêmico pode, adicionalmente, dar suporte para a aprendizagem acerca do contexto no qual o estímulo aversivo está presente (GHIZONI et al., 2006).

Nesse viés, tem sido proposto que memória emocional deve estar facilitada na presença de estresse induzido pela ativação simpática, não somente pela elevação do suprimento de oxigênio para o sistema nervoso central, mas também pela hiperglicemia que provê substrato metabólico para as mudanças celulares que fundamentam o processo de plasticidade neural (McGAUGH, 1989). O aumento da oferta de glicose no sangue pode modular a aprendizagem, atravessando a barreira hemato-encefálica e agindo diretamente no cérebro, e/ou indiretamente, ativando aferências vagais (MESSIER, 2004) com resultante alteração na atividade neural das regiões que são fundamentais para o processo de aprendizagem (GHIZONI et al., 2006).

### **1.8 Ansiedade, Núcleo Accumbens e LCE**

O medo é um componente adaptativo de respostas a estímulos potencialmente ameaçadores. É vantajoso responder com ansiedade ou medo a certas situações ameaçadoras porque a ansiedade/medo alerta para os perigos e leva a tomar decisões e colocá-las em prática (HETEM, et al., 2004). Entretanto, o medo exagerado, capaz de afetar a rotina diária de uma pessoa é considerado patológico. Ansiedade em humanos está associada a medos

inexplicáveis ou medo excessivo, terror e tormentos, ou ainda emoções inadequadas e inclui transtornos psiquiátricos distintos, tais como ansiedade generalizada, pânico, agorafobia, fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo, estresse pós-traumático e dentre outros (KALUEFF, 2007).

Os mecanismos cerebrais que promovem as reações de medo em humanos e animais são similares (Le DOUX, 1998). Visando a compreensão dos mecanismos envolvidos nos transtornos de ansiedade, diferentes modelos animais têm sido utilizados. Esses modelos animais de ansiedade são importantes porque permitem analisar variáveis raramente controladas em humanos, tais como doses da droga, nutrição, variáveis ambientais, de adaptação e diferenças individuais numa mesma espécie (PEZZE e FELDON, 2004; HETEM, et al., 2004). Nesse sentido, modelos animais de ansiedade são utilizados como testes pré-clínicos para drogas ansiolíticas e como ferramenta para estudar os substratos neurais que participam das reações de defesa de animais diante de estímulos que representam perigo ou ameaça (KALUEFF, 2007).

A literatura não tem fornecido dados consistentes acerca do papel do NAcc na regulação da ansiedade, especialmente considerando as sub-regiões centro e concha do NAcc. Por exemplo, foi demonstrado que o NAcc pode ser uma região importante para a expressão de estados de ansiedade em ratos machos, pois a administração intra-NAcc de antagonistas NMDA e AMPA no NAcc induziu efeito ansiolítico em ratos testados no LCE (MARTINEZ et al, 2002), sugerindo um papel ansiogênico para o glutamato no NAcc, embora uma distinção entre as duas sub-regiões não tenha sido realizada.

Por outro lado, tem sido demonstrado que a região concha do NAcc, mas não a região centro, exibe um gradiente de motivação aversiva no sentido rostro-caudal, quando submetida à microinjeção de um antagonista do receptor AMPA (REYNOLDS e BERRIDGE, 2003). Assim, quando o bloqueio dos receptores AMPA é feito em regiões mais caudais da concha do NAcc, observa-se a evocação de uma série de comportamentos defensivos, tais como fugas, mordidas defensivas e vocalizações durante a aproximação de perigo (REYNOLDS e BERRIDGE, 2003), o que sugere um papel ansiolítico para a ativação dos receptores AMPA na concha do NAcc. Essa discrepância entre papel ansiogênico ou ansiolítico para o glutamato no NAcc, exibida pela pesquisa básica, também está presente em estudos com humanos, visto que a estimulação cerebral profunda da região da concha do NAcc diminuiu os sintomas em pacientes com transtorno obsessivo-compulsivo (STURM et al, 2003) mas eliciou pânico em um paciente com transtorno compulsivo-obsessivo refratário (SHAPIRA et al, 2006).

Portanto, os dados da literatura não são conclusivos em relação a uma ação ansiolítica ou ansiogênica para a neurotransmissão do glutamato dentro do NAcc. Essa questão carece de maiores estudos, especialmente uma investigação visando estabelecer uma comparação entre as sub-regiões centro e concha do NAcc em um modelo animal de ansiedade.

Com relação à plasticidade neural, tem sido demonstrado que a aprendizagem e a memória emocional, especialmente para a aquisição e expressão de respostas condicionadas aversivamente, são influenciadas por aferências dopaminérgicas da ATV para o NAcc (PEZZE e FELDON, 2004).

Também tem sido demonstrado que a administração de antagonistas de receptores do tipo NMDA na região centro do NAcc de ratos machos saciados (SMITH-ROSE e KELLEY, 2000) ou privados de alimentação (KELLEY, 1999; KELLEY et al, 1997) prejudica a aquisição de aprendizagem instrumental. Além disso, a exposição de ratos a um ambiente novo (HORVITZ, 2002), situações aversivas e estressantes, incluindo aquelas induzidas pela administração de drogas que geram ansiedade (ansiogênicas), bem como o condicionamento aversivo (CHENG et al, 2003; SALAMONE, 1994), pode induzir elevada liberação de dopamina no NAcc (SALAMONE, 1994). Entretanto, embora existam dados na literatura relacionando o NAcc aos processos de plasticidade neural, a participação do NAcc na aprendizagem emocional no LCE ainda não foi avaliada, especialmente considerando-se as diferentes sub-regiões do NAcc.

Outro aspecto relevante, e que merece maiores estudos, é a relação ansiedade/ingestão de alimento. Alguns distúrbios de ansiedade são caracterizados por severo comprometimento da ingestão de alimento, tais como a bulimia e a anorexia nervosa (AN).

A AN é uma doença debilitante, freqüentemente fatal, que afeta, principalmente, pessoas do sexo feminino. Pacientes com AN apresentam severa perda de peso, distorção de sua imagem corporal (déficit cognitivo), medo intenso de ganhar peso (SIEGFRIED et al, 2003), hiperatividade física, além de depressão ou ansiedade (KAYE et al, 2000). Assim, uma combinação de hipofagia e hiperatividade física determina um balanço negativo de energia que pode culminar em morte por inanição (SIEGFRIED et al, 2003).

Portanto, torna-se necessário um estudo do papel da neurotransmissão glutamatérgica nas sub-regiões do NAcc sobre a ansiedade, aprendizagem/memória emocional e ingestão de alimentos. Desse modo, este estudo teve como objetivo investigar o papel da neurotransmissão glutamatérgica no centro e na concha do NAcc, em relação ao nível de ansiedade, à aquisição da ansiedade/aprendizagem emocional no LCE e em relação ao comportamento de ingestão de alimento em fêmeas de ratos. Optamos pela utilização de fêmeas porque os distúrbios de ansiedade são mais freqüentes em mulheres (JENKINS, 1985; SIMONDS e WHIFFEN, 2003).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar o efeito da microinjeção de antagonistas dos receptores AMPA nas sub-regiões centro e concha do núcleo accumbens sobre o nível de ansiedade, sobre a aprendizagem emocional e sobre a ingestão de alimento, em ratos Wistar fêmeas

### **2.2 Específicos**

Avaliar o efeito da administração local de antagonista competitivo do receptor glutamatérgico do tipo AMPA nas sub-regiões centro e concha do núcleo accumbens sobre o nível de ansiedade e sobre a aprendizagem emocional no Labirinto em cruz elevado.

Avaliar o efeito da microinjeção de antagonista competitivo do receptor glutamatérgico do tipo AMPA nas sub-regiões centro e concha do núcleo accumbens sobre o nível de ansiedade e sobre a ingestão de alimento na caixa de ingestão.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizadas 187 fêmeas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com dois meses de idade e peso corporal entre 200 e 250g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Do total de 187 fêmeas, 100 foram utilizadas para o Experimento 1, no Labirinto em cruz elevado e 87 foram utilizadas para o Experimento 2, na caixa de ingestão. Durante sete dias, os animais foram adaptados ao novo ambiente do laboratório e mantidos em caixa de polipropileno (49x34x16cm). Em cada caixa, forrada com maravalha, ficavam agrupadas cinco fêmeas, dispondo de água e alimento granulado (CR-1 Nuvilab) *ad libitum*. A temperatura da sala foi controlada em valores aproximados de  $21 \pm 2$  °C e ciclo de luz de 12 horas (luzes acesas das 06h às 18h). Após a cirurgia, as fêmeas foram mantidas individualmente por, no mínimo, sete dias, em caixas com as mesmas dimensões citadas acima. A manutenção do animal nestas caixas visava minimizar as condições de estresse, favorecendo a recuperação pós-cirúrgica.

No período em que permaneceram no biotério, os animais foram manipulados cuidadosamente, a cada dois dias, durante a limpeza das caixas.

A fim de diminuir as variações do ciclo circadiano, todos os experimentos foram conduzidos entre 9h e 14h. O manuseio dos animais seguiu as diretrizes da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, e o protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo nº. 340/CEUA/UFSC, Processo. 23080.008403/2005-72).

### **3.2 Drogas**

Para cada um dos procedimentos experimentais foram utilizados os seguintes tratamentos:

#### **3.2.1 Experimento 1:**

DNQX (6,7-Dinitroquinoxalina-2,3-diona, antagonista competitivo dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA/Kainato) foi obtido da Tocris (USA) e dissolvido em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 50% (DMSO dissolvido em salina 0,9%). A solução de DMSO 50% em salina 0,9% foi utilizada como controle dos grupos que receberam micro injeções de DNQX. Salina 0.9% foi utilizada como controle do grupo microinjetado com DMSO 50% em salina 0,9%. DNQX foi administrado localmente, nas doses de 330ng e 660ng, sendo que as doses foram selecionadas de acordo com a literatura (MALDONADO-IRIZARRY et al, 1995; REYNOLDS E BERRIDGE, 2003).

#### **3.2.2 Experimento 2:**

CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2-3-diona dissódica, antagonista do receptor glutamatérgico do tipo AMPA/Kainato) foi obtido da Tocris (USA) e dissolvido em uma solução de 0,25ml de Líquor artificial (147 mM Na<sup>+</sup>, 154 mM Cl<sup>-</sup>, 3,0 mM K<sup>+</sup>, 1,2 mM Ca<sup>2+</sup>, e 0,9 mM Mg<sup>2+</sup>; pH = 7,4), conforme a literatura

(MALDONADO-IRIZARRY et al, 1995). Líquor artificial foi utilizado como controle para os grupos microinjetados com CNQX, cujas doses foram selecionadas pela literatura (MALDONADO-IRIZARRY et al, 1995) e foram de 2,5 e 5,0 nmol.

### **3.3 Cirurgia estereotáxica**

A técnica cirúrgica foi realizada para a implantação das cânulas-guia. Os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal (i.p), com uma mistura de Xilazina/Ketamina (13mg/kg/87mg/kg; König). Após a perda total dos reflexos realizou-se a tricotomia do campo cirúrgico, e em seguida, os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico, tendo a cabeça fixada por intermédio de barras posicionadas no canal auditivo e na porção anterior da cabeça. Após assepsia feita com álcool iodado 1%, uma incisão longitudinal com cerca de 1 cm de comprimento foi realizada na parte superior da cabeça, de forma a expor a calota craniana. O periósteo foi removido com tesoura, sendo o restante raspado com espátula e água oxigenada (10 vol). Com o auxílio de uma broca ortodôntica (n<sup>o</sup> 6), foram feitos dois furos na calota craniana e, nesses, fixados os parafusos (do tipo relojoeiro) para fixação de acrílico auto-polimerizável (Dental VIPI Ltda., Pirassununga, SP). A porção exposta do crânio foi seca para garantir a adesão do acrílico.

A seguir, duas cânulas-guia, confeccionadas a partir de um segmento de agulha hipodérmica (0,7mm de diâmetro externo e 15mm de comprimento), foram bilateralmente posicionadas a 2mm acima da região do NAcc, de acordo com as coordenadas descritas por Paxinos e Watson (2006), referentes às porções da concha (AP+1,4mm do bregma, anterior a linha interaural; L ±

0,8mm para cada lado da sutura sagital; DV – 5,5mm abaixo da dura máter) ou do centro (AP +1,2 mm, L  $\pm$  1,0 mm e DV -5,5mm). As cânulas foram colocadas uma de cada vez, em cada lado do cérebro. Após a fixação da primeira, foi colocado um pouco de acrílico auto-polimerizável e, depois da secagem, o braço estereotáxico foi deslocado lateralmente para a outra posição, previamente marcada. Em seguida, o segundo orifício foi realizado, sendo introduzida a segunda cânula, também fixada com acrílico polimerizável, para fixar as referidas cânulas aos parafusos. Após a secagem total do acrílico, para cada uma das cânulas, o braço do estereotáxico foi liberado e o mandril foi adaptado e fixado na extremidade em contato com o acrílico, mantendo as cânulas-guia fechadas, de forma que a sua remoção só ocorreu imediatamente antes do experimento.

Ao final do procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em local aquecido até a recuperação da anestesia e, posteriormente, retornaram para o biotério do laboratório sob temperatura controlada, sendo mantidos individualmente em caixas de polipropileno (49x34x16cm). Lá permaneceram com água e comida *ad libitum*, recebendo acompanhamento diário durante sete dias, sendo manipulados somente durante a limpeza das caixas, a cada dois dias. Após esse período, foram iniciados os procedimentos experimentais.

### **3.4 Injeções intracerebrais**

A microinjeção das drogas e do veículo foi realizada por meio de uma agulha injetora (0,3 mm de diâmetro), introduzida seqüencialmente em cada cânula-guia, estando conectada por um tubo de polietileno a uma micro-seringa Hamilton (capacidade de 1 $\mu$ l). A agulha injetora excedeu o tamanho da cânula-

guia em 2 mm. Os animais foram suavemente envolvidos em um pedaço de toalha e levemente contidos durante a administração das drogas, salina e veículo. Com o objetivo de minimizar variações na pressão intracerebral, as soluções foram administradas bilateralmente, no período entre 1 e 3 minutos para cada lado, sendo o volume injetado de 400  $\mu$ l, de acordo com dados da literatura (MALDONADO-IRIZARRY et al, 1995; STRATFORD, 1998; REYNOLDS E BERRIDGE, 2003).

### **3.5 Modelos experimentais**

#### **3.5.1 Labirinto em cruz elevado e registro comportamental**

O Labirinto em cruz elevado (Figura 4) é constituído de duas passarelas de madeira, dispostas perpendicularmente, formando assim uma cruz simétrica (quatro braços de 50 cm de comprimento por 10 cm de largura). Dois braços opostos são fechados por paredes laterais de vidro fume, de 40 cm de altura, enquanto os outros dois braços são abertos, circundados por uma pequena borda de acrílico (com 1 cm de altura) para reduzir a ocorrência de quedas dos animais. Na junção entre os quatro braços, delimita-se uma área central de 10  $\text{cm}^2$ . O labirinto é elevado a 50 cm do solo. Quatro lâmpadas fluorescentes (15W cada), dispostas igualmente em forma de cruz, a 100 cm acima do labirinto foram utilizadas como fonte de iluminação do experimento. O nível médio de iluminação nos braços abertos (BA) e nos braços fechados (BF) é 373 e 284 lux, respectivamente, com um gradiente de variação de iluminação de 89 lux entre o braço aberto e fechado.

Para a primeira exposição, cada animal foi colocado no centro do labirinto, com o focinho voltado para um dos braços fechados, e permitiu-se que os mesmos explorassem o labirinto por 5 minutos. Ao término do período de exploração, o animal foi retirado e o labirinto foi limpo com tecido umedecido em solução de álcool 20%, para evitar pistas odoríferas. No dia seguinte, cada animal foi re-exposto ao LCE por 5 minutos, sem administração de drogas – segunda exposição. Cada exposição ao LCE foi filmada em VHS e a transcrição das gravações foi realizada posteriormente com o auxílio do Programa Etholog 2.25 (OTTONI, 2000).



Figura 4. Fotografia do LCE  
Laboratório de Neurobiologia de Sistemas  
Emocionais e Motivacionais  
CFS/UFSC.

A análise comportamental foi realizada considerando-se as variáveis espacial-temporais tradicionais (PELLOW et al, 1985): número de entrada nos braços abertos (EA) e fechados (EF), bem como as porcentagens de entrada

nos braços abertos (%EA) e de tempo de permanência nos braços abertos (%TA). A %EA foi calculada considerando-se o número de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas (TE) efetuadas ( $\%EA = \frac{EA}{EA + EF} \times 100$ ). E a %TA foi calculada considerando-se o tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total do teste ( $\%TA = \frac{TA}{300\text{segundos}} \times 100$ ). A análise espacial-temporal foi complementada por uma análise etológica, envolvendo os seguintes comportamentos (SETEM et al., 1999):

- Auto-Limpeza: ato de limpar qualquer parte da superfície corporal com a língua, dentes e/ou patas dianteiras.
- Exploração Vertical: é o comportamento de exploração do ambiente em que o animal eleva o corpo sobre as patas traseiras. O animal também pode ficar ereto para explorar o ambiente como se estivesse tentando olhar por cima das paredes, com os quatro membros e o dorso em extensão.
- Imersão da cabeça: é o movimento de projeção da cabeça ou do mergulho da cabeça para fora e para baixo, quando o animal está nos braços abertos e/ou no centro do LCE. Em algumas situações, pode ser observado quando o animal está no braço fechado.

### **3. 5. 2 Caixa de ingestão e registro comportamental**

A caixa de registro de comportamento alimentar (caixa de ingestão – Figura 5) foi confeccionada em vidro transparente de quatro mm de espessura, apresentando medidas similares aos da caixa de hospedagem (49cm de

comprimento, 34cm de largura e 40cm de altura). O chão da caixa e três das quatro paredes laterais foram revestidos com plástico adesivo preto, permanecendo uma parede lateral com vidro transparente. Do lado de fora desse vidro foi colocado um espelho para possibilitar a visualização lateral do comportamento do animal e permitir o registro da filmagem em VHS.



Figura 5. Fotografia da caixa de ingestão  
Laboratório de Neurobiologia de Sistemas  
Emocionais e Motivacionais, CFS/UFSC.

Os registros em VHS foram analisados posteriormente com o auxílio do programa Etholog 2.25 (OTTONI, 2000). Os seguintes comportamentos na caixa de ingestão foram considerados para análise (HALFORD, 1998):

- **Ingestão do alimento:** é o ato apresentar movimentos de mastigação desde que este comportamento seja confirmado pela diferença da

pesagem da ração antes e depois do teste experimental (teste com duração de 1 hora) (HALFORD, 1998). A ingestão do alimento também foi avaliada 24h depois da micro infusão cerebral no centro e na concha do NAcc.

- **Exploração do alimento:** é dado pelo tempo em que o animal fica segurando o alimento, levando-o à boca, tocando-o com a boca, ou pelo tempo de aproximação da boca diretamente ao alimento, apresentando movimentos de mastigação da ração (HALFORD, 1998).
- **Exploração vertical:** é o ato de explorar o ambiente apoiado somente nas patas traseiras, estando com as patas dianteiras livres, não apoiadas no chão da caixa, ou seja, o animal permanece ereto. O animal também pode ficar ereto para explorar o ambiente, como se estivesse tentando olhar por cima das paredes, com os quatro membros e o dorso em extensão. Esse comportamento de estiramento vertical (escalando a parede – *Vertical Stretches*) também foi considerado (WALL e MESSIER, 2000).
- **Auto-Limpeza:** ato de limpar qualquer parte da superfície corporal com a língua, dentes e/ou patas dianteiras. (SETEM et al., 1999).
- **Locomoção:** é o ato de se deslocar, deambular pela caixa experimental (HALFORD, 1998). É o número de vezes que o animal se desloca para frente, para trás ou para os lados na caixa de ingestão.

- **Avaliação de risco:** trata-se do movimento de projeção do corpo do animal, retornando à posição inicial, realizado por esse para investigar o ambiente a sua volta, com a cabeça, observando ao redor. Na avaliação de risco, as patas traseiras ficam fixas na base da caixa; as dianteiras se movem para frente e, em seguida, retornam a posição original. Essa variável comportamental foi modificada do LCE para a caixa de ingestão, utilizando-se como referencial a definição de RODGERS (1996) e CRUZ (1994). A avaliação de risco tem sido investigada na caixa de ingestão pelo nosso laboratório desde 2005 (RODGERS et al., 1996; CRUZ et al., 1994).

Os procedimentos experimentais da caixa de registro de ingestão (Figura 5) foram realizados entre 9h e 14h. Decorridos sete dias após a cirurgia, os animais foram ambientados à caixa de registro do comportamento alimentar por aproximadamente 30 minutos ao dia, durante dois dias consecutivos. A quantidade de ração, pesada imediatamente antes do experimento e disponibilizada ao animal durante o experimento, foi sempre de 100g. Os testes experimentais tiveram a duração de 1 hora, sendo que após este tempo a ração foi pesada novamente, com vistas a avaliação quanto à quantidade ingerida. Após cada teste, os animais foram levados ao biotério, recebendo 100 g de ração. A ração foi pesada novamente, 24 horas depois. Utilizou-se essa metodologia uma vez que dados da literatura apontavam para o fato de que alguns animais iniciavam a ingestão do alimento bem depois dos procedimentos experimentais, fato relatado após um período de até 4 horas (MALDONADO-IRIZARRY et al., 1995).

Ao fim de cada teste, o aparato experimental foi limpo com tecido umedecido em uma solução de álcool 20%, para evitar pistas odoríferas. Imediatamente após ao término do experimento, a ração e a água foram pesadas e medidas, os respectivos valores anotados e posteriormente analisados.

### **3. 6 Procedimentos experimentais**

#### **3. 6. 1 Experimento 1**

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação bilateral das cânulas-guia no centro ou na concha do NAcc, conforme descrito no item 3.3. Sete dias após a recuperação cirúrgica, cada animal recebeu uma das seguintes microinjeções locais (de acordo com o item 3.2): Salina 0,9%, solução de DMSO 50% em Salina ou DNQX (330 e 660ng). Após 10 minutos da administração das drogas (conforme descrito no item 3.4), os animais foram submetidos a duas exposições ao LCE (como descrito no item 3.5.1).

#### **3. 6. 2 Experimento 2**

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação bilateral das cânulas-guia, no centro ou na concha do NAcc, conforme descrito no item 3.3. Sete dias após a recuperação cirúrgica, os animais receberam um dos seguintes tratamentos locais (como descrito no item 3.4): Líquor artificial, CNQX (2,5 e 5,0 nmol). Após 10 minutos da administração

das drogas, conforme descrito no item 3.4, esses animais foram submetidos à caixa de registro de ingestão de alimento (como descrito no item 3.5.2).

### **3. 7 Perfusão e Histologia**

Ao final dos experimentos 1 e 2, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg, i.p.) e através de uma agulha introduzida no ventrículo cardíaco esquerdo, foram perfundidos com solução salina 0,9%, seguido de formol 10%. O posicionamento das cânulas-guia no cérebro foi verificado por meio da microinjeção de 0,2 µl de azul de Evans através da cânula injetora. Depois de dissecados, os cérebros permaneceram imersos em formol 10% por um período de 14 dias, sendo posteriormente cortados em fatias de 100 µm de espessura em um vibrátomo. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e permaneceram secando aproximadamente por uma semana. Em seguida, foram coradas pelo método de Nissl, e permaneceram secando por igual período antes de serem analisadas ao Microscópio Óptico (MO). A reprodução gráfica dos cortes e dos pontos de injeção analisados ao MO foi realizada a partir da observação e comparação com diagramas coronais, obtidos do Atlas do cérebro de rato, de autoria de PAXINOS e WATSON (1998).

### **3. 8 Análise de dados**

Os dados relativos ao Experimento 1 foram analisados por análise de variância (ANOVA) de três vias. O tratamento com *droga* foi utilizado como fator

1; o *sítio de microinjeção* (centro ou concha) como fator 2; e a *exposição ao LCE* (primeira ou segunda exposição), como fator 3.

Os dados relativos ao Experimento 2 foram analisados por análise de variância de duas vias (ANOVA). O tratamento com *droga* foi utilizado como fator 1 e o *sítio de microinjeção* (centro ou concha) como fator 2. Quando tornaram-se apropriadas, as análises de variância foram seguidas pelo teste de Duncan para múltiplas comparações. Somente os valores de probabilidade, menores que 5%, foram considerados significativos.

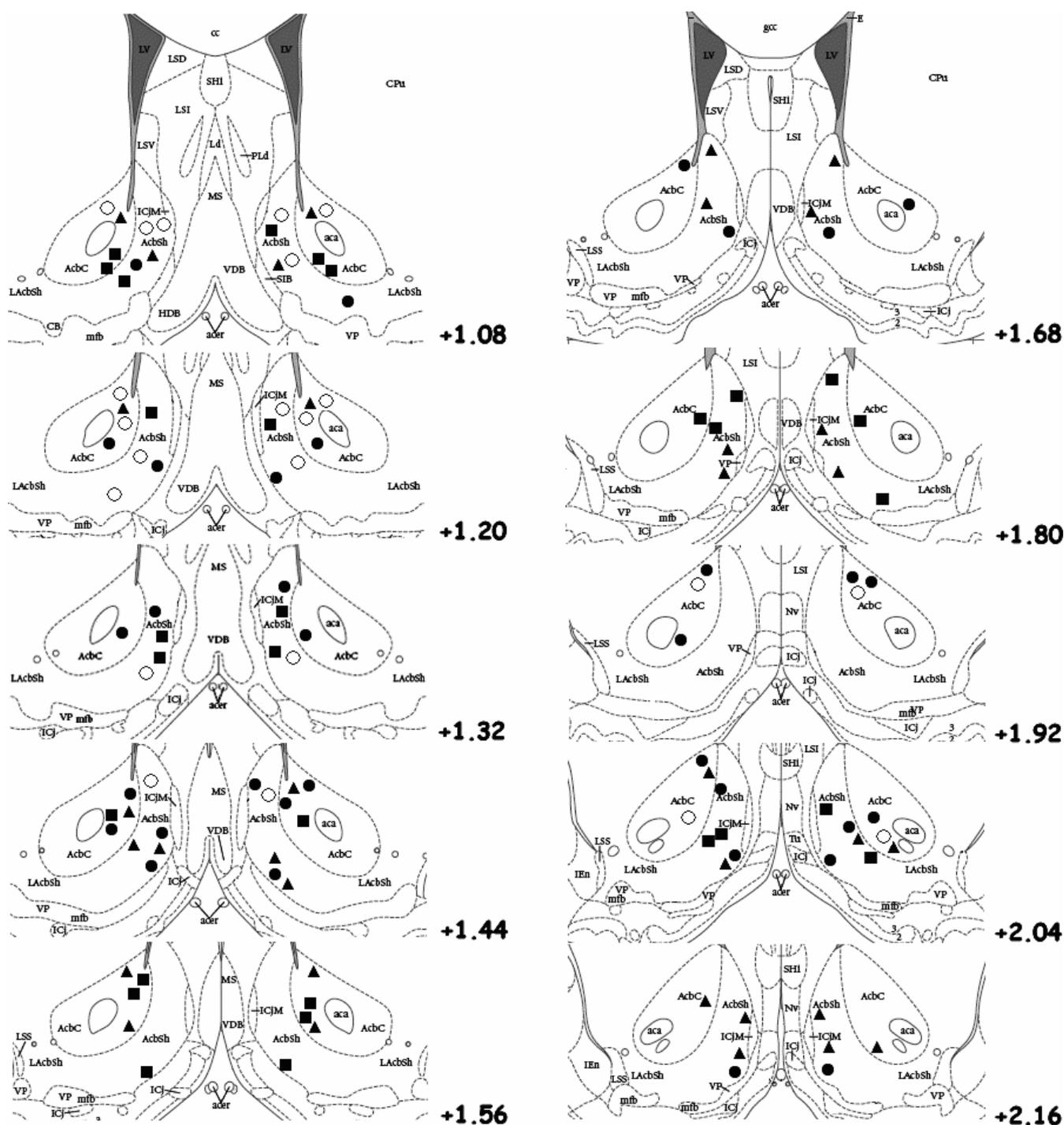
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Experimento 1

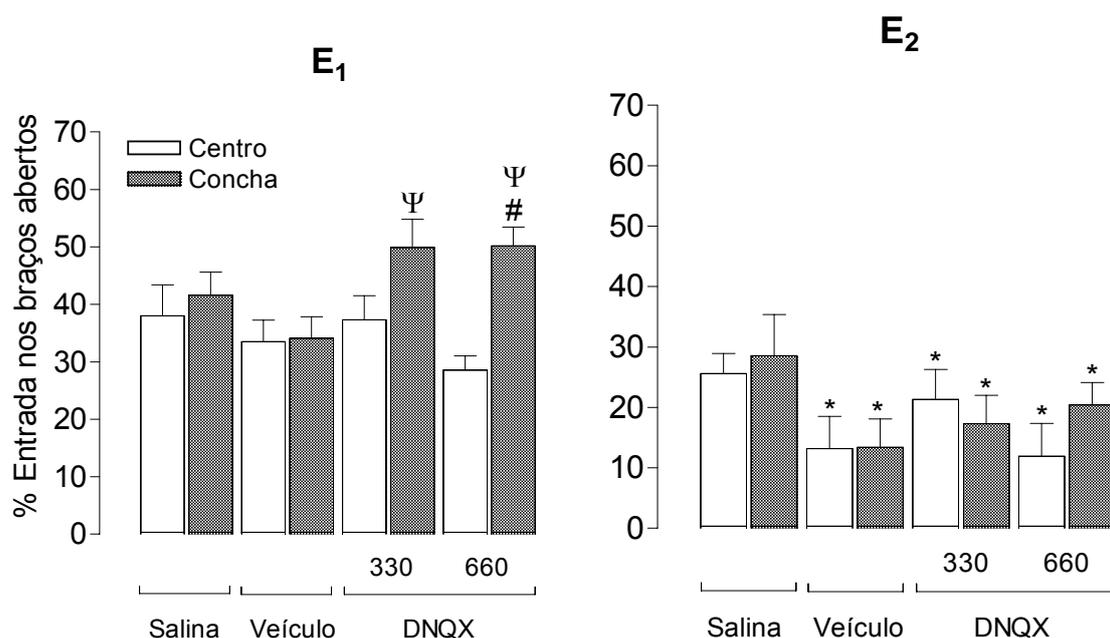
A análise histológica indicou que do total de 100 fêmeas utilizadas no Experimento 1, 60 tiveram a cânula-guia implantada precisamente nas regiões concha e centro do NAcc, ambas bilateralmente. Total de acertos bilaterais na concha do NAcc: n=34 microinjeções e no centro do NAcc: n=26 microinjeções. Os acertos foram distribuídos da seguinte forma: salina no centro (n=5) e na concha (n=6); veículo: centro (n=8) e concha (n=9); DNQX 330ng: centro (n=7) e concha (n=10); DNQX 660ng: centro (n=6) e concha (n=9). Não foram incluídos na análise estatística aqueles animais cuja histologia revelou outros sítios de microinjeção ou quando não houve acerto bilateral na região da concha e do centro do NAcc (Figura 6).

A análise de variância indicou um efeito principal, significativa para os fatores *droga*, *sítio de microinjeção* e *exposição ao LCE* para a variável %EA

(Tabela 1). O teste de Duncan indicou que as fêmeas que receberam microinjeção de 330ng e 660ng de DNQX na sub-região concha, mas não no centro do NAcc, exibiram aumento da %EA na primeira exposição, em relação aos ratos que receberam microinjeção de veículo ( $\psi$ ; Figura 7). Além disso, a microinjeção de 660ng de DNQX na concha do NAcc aumentou a %EA na primeira exposição em relação ao respectivo grupo que recebeu microinjeção no centro do NAcc ( $\#$ ). O teste de Duncan não indicou qualquer diferença entre os grupos durante a 2<sup>a</sup> exposição. Considerando a comparação entre as duas exposições ao LCE, os grupos que receberam microinjeção de veículo ou DNQX (330ng e 660ng) exibiram aumento da esquia dos braços abertos na segunda exposição em relação à primeira, o que foi caracterizado pela diminuição da % EA (\*), de acordo com a Figura 7.

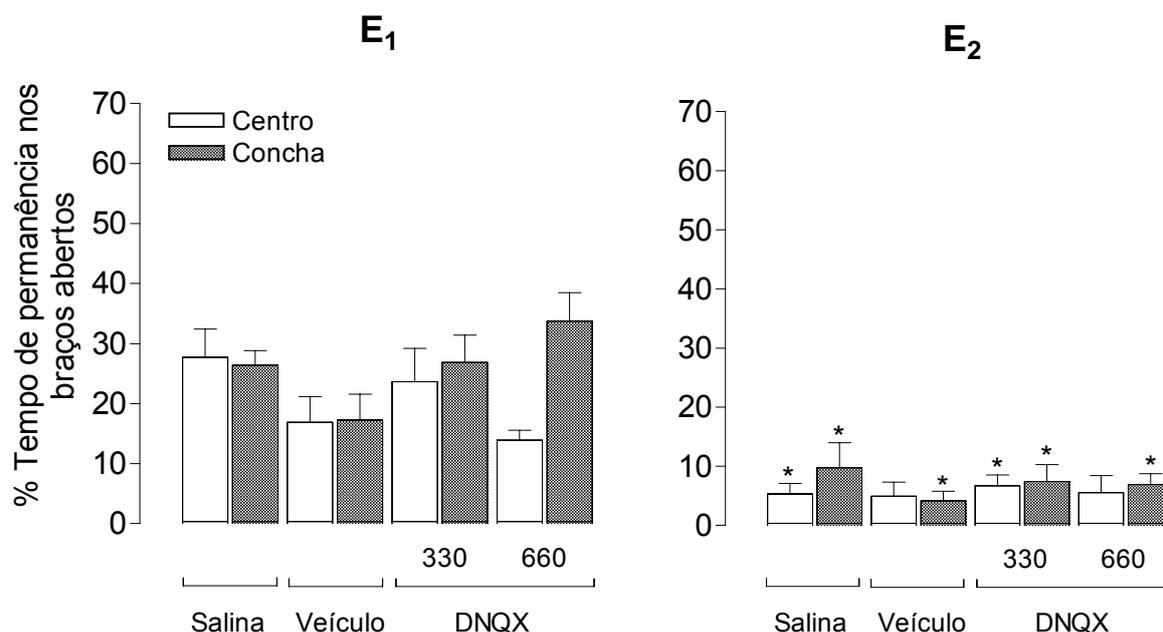


**Figura 6.** Representação das seções coronais, ilustrando os locais atingidos pela microinjeção de salina, veículo, DNQX 330ng e DNQX 660ng, nas sub-regiões do centro e da concha do NAcc, de acordo com o atlas do cérebro de ratos (PAXINOS e WATSON, 2006). AP entre +1,08 e +2,16mm anterior ao bregma. (○) Salina; (●) Veículo; (▲) DNQX 330; (■) DNQX 660. Total de acertos bilaterais: concha=34 e centro=26 microinjeções: AcbC: centro do núcleo accumbens; AcbSh:concha do núcleo accumbens; aca: parte anterior da comissura anterior; acer: artéria cerebral anterior; cc: corpo caloso; ICj: Ilhas Callejas; ICjM: Ilhas Callejas maior; LAcSh:concha lateral do NAcc; LSD: parte dorsal do núcleo septal lateral; LSI: parte intermediária do núcleo septal lateral; LSS: striatum lateral; LSV: parte ventral núcleo septal lateral; LV: ventriculo lateral; mfb: prosencéfalo medial; MS: núcleo septal medial; Shi: septo hippocampal; Tu: tubérculo olfatório; VDB: núcleo da banda diagonal e limbo vertical; VP: pálido ventral.



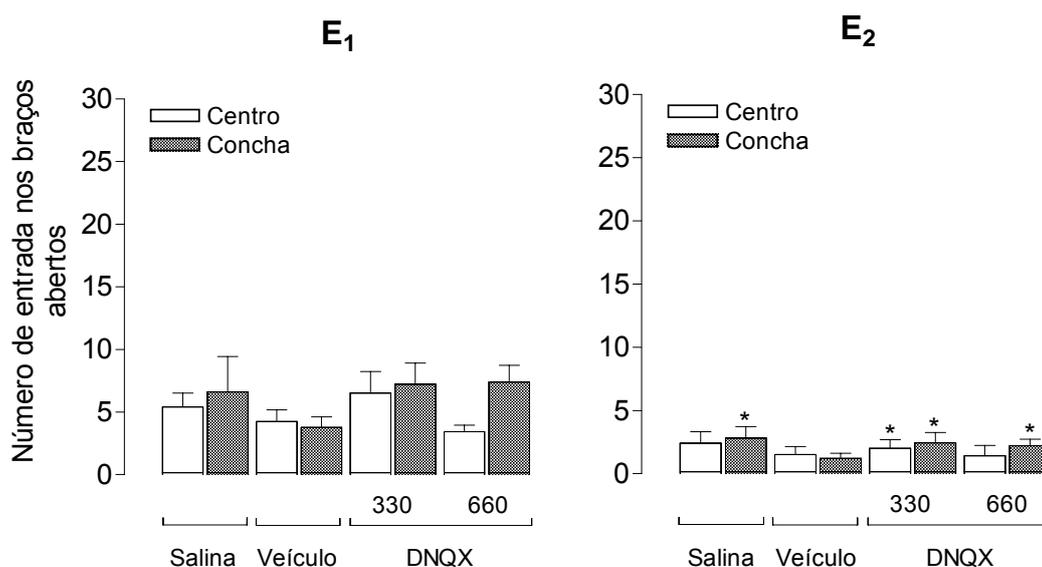
**Figura 7. Efeito ansiolítico induzido pela microinjeção de DNQX (antagonista do receptor do tipo AMPA) na sub-região concha do NAcc.** As fêmeas receberam microinjeções bilaterais de salina, veículo ou DNQX (330ng e 660ng) nas sub-regiões centro e concha do NAcc e foram submetidas a duas exposições consecutivas ao LCE. A segunda exposição foi realizada no dia seguinte, sem microinjeção de drogas. A primeira exposição (E<sub>1</sub>) está representada à esquerda, enquanto a segunda exposição (E<sub>2</sub>) está representada à direita na figura. Os dados são representados como a média ± erro padrão. \* $p < 0.05$  em relação à respectiva E<sub>1</sub>;  $\psi$   $p < 0.05$  em relação ao grupo que recebeu microinjeção de veículo; #  $p < 0.05$  em relação ao respectivo grupo submetido à microinjeção no centro do NAcc (ANOVA de três vias foi seguida pelo teste de Duncan para múltiplas comparações).

A ANOVA não revelou efeito principal, significativa para os fatores *droga* e *sítio de microinjeção* para a %TA, mas indicou efeito para o fator *exposição ao LCE* (Tabela 1). Considerando a comparação entre as duas exposições ao LCE, observou-se que todos os grupos exibiram aumento da esquia dos braços abertos na segunda exposição em relação à primeira, o que foi caracterizado pela diminuição da %TA (\* – Figura 8).



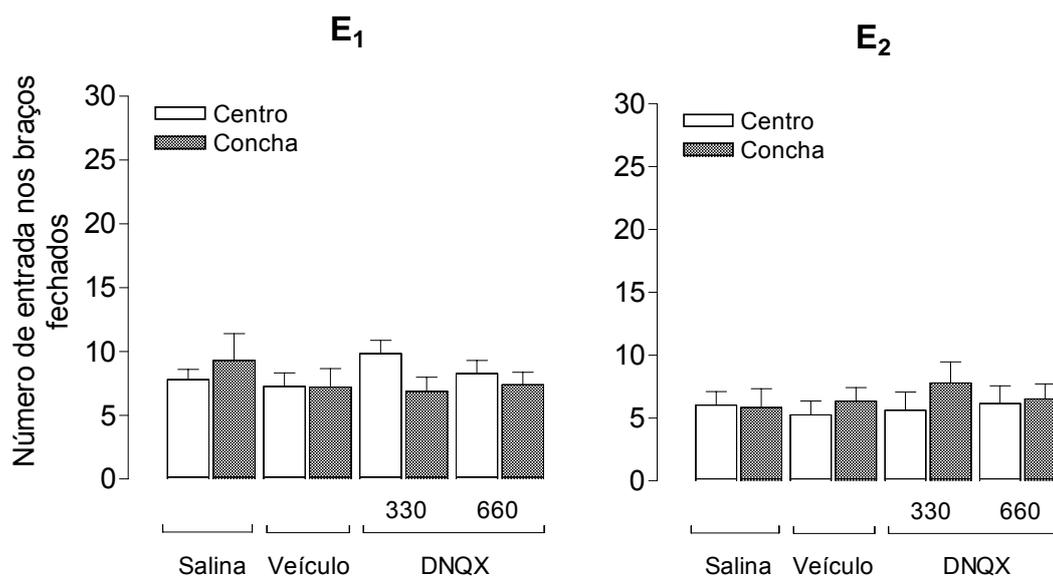
**Figura 8. Microinjeção de DNQX nas sub-regiões centro e concha do NAcc e seus efeitos sobre o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE.** As fêmeas receberam microinjeções bilaterais de salina, veículo ou DNQX (330ng e 660ng) nas sub-regiões centro e concha do NAcc e foram submetidas a duas exposições consecutivas ao LCE. A segunda exposição foi realizada no dia seguinte, sem microinjeção de drogas. A primeira exposição (E<sub>1</sub>) está representada à esquerda, enquanto a segunda exposição (E<sub>2</sub>) está representada à direita na figura. Os dados são representados como a média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0.05$  em relação à respectiva E<sub>1</sub> (ANOVA de três vias foi seguida pelo teste de Duncan para múltiplas comparações).

Em relação à variável EA, ANOVA revelou um efeito principal, significativo para o fator *exposição ao LCE*, mas não em relação aos fatores *droga* e *sítio de microinjeção* (Tabela 1). Comparando as duas exposições, o número de EA também diminuiu na segunda exposição nos grupos que receberam a microinjeção de 330ng de DNQX tanto no centro como na concha do NAcc, e nos grupos que receberam microinjeção de DNQX (660ng) e salina na concha do NAcc (Fig. 9).



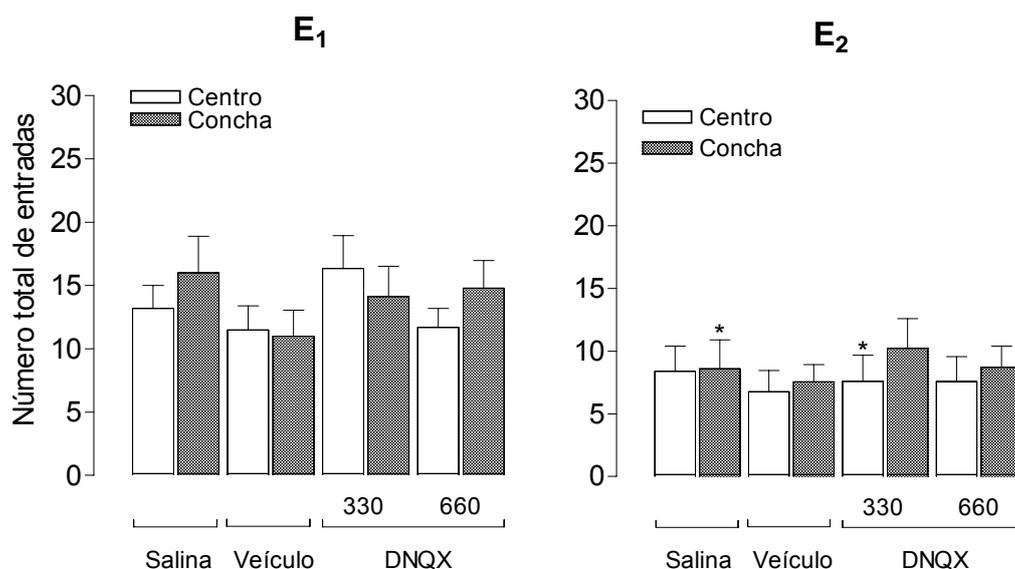
**Figura 9. Número de entrada nos braços abertos do labirinto em cruz elevado após a microinjeção de DNQX nas sub-regiões do NAcc.** As fêmeas receberam microinjeções bilaterais de salina, veículo ou DNQX (330ng e 660ng) nas sub-regiões centro e concha do NAcc e foram submetidas a duas exposições consecutivas ao LCE. A segunda exposição foi realizada no dia seguinte, sem microinjeção de drogas. A primeira exposição (E<sub>1</sub>) está representada à esquerda, enquanto a segunda exposição (E<sub>2</sub>) está representada à direita na figura. Os dados são representados como a média ± erro padrão. \* $p < 0.05$  em relação a respectiva E<sub>1</sub> (ANOVA de três vias foi seguida pelo teste de Duncan para múltiplas comparações).

ANOVA não revelou efeito principal significativo para os fatores *droga* e *sítio de microinjeção* em relação à variável EF. Houve efeito principal, significativo apenas no fator *exposição ao LCE* (Tabela 1). O teste de Duncan não revelou qualquer diferença no número de EF entre a primeira e segunda exposição ao LCE (Fig. 10).



**Figura 10. Número de entrada nos braços fechados do LCE após a microinjeção de DNQX nas sub-regiões do NAcc.** As fêmeas receberam microinjeções bilaterais de salina, veículo ou DNQX (330ng e 660ng) nas sub-regiões centro e concha do NAcc e foram submetidas a duas exposições consecutivas ao LCE. A segunda exposição foi realizada no dia seguinte, sem microinjeção de drogas. A primeira exposição (E<sub>1</sub>) está representada à esquerda, enquanto a segunda exposição (E<sub>2</sub>) está representada à direita na figura. Os dados são representados como a média ± erro padrão. Não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos na E<sub>1</sub> e na E<sub>2</sub>, bem como na comparação E<sub>1</sub> x E<sub>2</sub> (ANOVA de três vias foi seguida pelo teste de Duncan para múltiplas comparações).

A ANOVA não indicou efeito principal significativo para o fator *droga* e *sítio de microinjeção*, mas indicou efeito significativo em relação ao fator *exposição ao LCE* (Tabela 1). Os animais que receberam microinjeção de DNQX (330 ng) no centro e aqueles que receberam a microinjeção de salina na concha do NAcc exibiram diminuição do número de TE na segunda exposição em relação a 1<sup>a</sup> exposição (Fig. 11).



**Figura 11. Número total de entradas (braços abertos e braços fechados) no labirinto em cruz elevado após a microinjeção de DNQX nas sub-regiões do NAcc.** As fêmeas receberam microinjeções bilaterais de salina, veículo ou DNQX (330ng e 660ng) nas sub-regiões centro e concha do NAcc, e foram submetidas a duas exposições consecutivas ao LCE. A segunda exposição foi realizada no dia seguinte, sem microinjeção de drogas. A primeira exposição (E<sub>1</sub>) está representada à esquerda, enquanto a segunda exposição (E<sub>2</sub>) está representada à direita na figura. Os dados são representados como a média ± erro padrão. \* $p < 0.05$  em relação à respectiva E<sub>1</sub> (ANOVA de três vias foi seguida pelo teste de Duncan para múltiplas comparações).

Para as variáveis, mergulho da cabeça, exploração vertical e auto-limpeza, a ANOVA não revelou efeito principal, significante em relação aos fatores *droga* e *sítio de microinjeção*. Houve apenas efeito principal significativo em relação ao fator *exposição ao LCE* (Tabela 1). A frequência de exploração vertical diminuiu na segunda exposição somente no grupo que recebeu microinjeção de veículo na sub-região centro do NAcc, quando comparado à primeira exposição. Em todos os grupos experimentais a frequência de mergulho da cabeça foi menor na segunda exposição em relação à primeira, exceto no grupo que recebeu a microinjeção de DNQX (660ng) na sub-região

centro do NAcc, o qual exibiu a mesma frequência de mergulho da cabeça, demonstrada na primeira exposição (Tabela 2).

**4.1.7 TABELA 1: Análise de Variância (ANOVA) de três vias indicando valores de “F” para os efeitos principais e para as interações entre os fatores.**

Fator/Interação	GL	%EA	%TA	EA	EF	TE	MC	EV	AL
Droga	3,104	3.53; <i>p</i> <0.05	2.49; NS	2.64; NS	0.45; NS	1.43; NS	1.31; NS	0.22; NS	2.03; NS
Sítio	1,104	6.04; <i>p</i> <0.05	3.55; NS	2.60; NS	0.038; NS	0.81; NS	3.20; NS	1.43; NS	1.99; NS
Exposição	1,104	74.82; <i>p</i> <0.05	84.33; <i>p</i> <0.05	45.34; <i>p</i> <0.05	7.25; <i>p</i> <0.05	24.25; <i>p</i> <0.05	91.78; <i>p</i> <0.05	14.20; <i>p</i> <0.05	0.63; NS
Droga x Sítio	3,104	2.16; NS	1.94; NS	1.33; NS	0.16; NS	0.22; NS	1.35; NS	0.32; NS	0.14; NS
Droga x Exposição	3,104	1.05; NS	0.73; NS	0.64; NS	0.14; NS	0.22; NS	0.32; NS	0.10; NS	0.24; NS
Sítio x Exposição	1,104	2.70; NS	1.22; NS	0.93; NS	1.12; NS	0.033; NS	1.39; NS	0.40; NS	2.06; NS
Droga x Sítio x Exposição	3,104	0.82; NS	1.95; NS	0.57; NS	0.95; NS	0.57; NS	1.19; NS	0.76; NS	0.30; NS

Ratos Wistar fêmeas receberam a microinjeção bilateral de sal, veículo ou DNQX 330ng e 660ng, no centro e na concha do NAcc e foram submetidas duas vezes ao LCE (primeira e segunda exposição). NS indica valores de “F” não significativos. Não ocorreu efeito significativo na interação entre os fatores para qualquer uma das variáveis comportamentais consideradas. %EA (% entrada nos braços abertos); %TA (% de tempo nos braços abertos); EA (número de entradas nos braços abertos); EF (número de entradas nos braços fechados); ET (número total de entradas); MC (mergulho da cabeça); EV (exploração vertical); e AL (auto-limpeza).

**4.1.8 TABELA 2. Algumas variáveis etológicas exibidas no labirinto em cruz elevado após a microinjeção bilateral de salina; veículo ou DNQX no núcleo accumbens.**

Variável	LCE	Salina		Veículo		DNQX 330		DNQX 660	
		Centro (5)	Concha (6)	Centro (8)	Concha (9)	Centro (6)	Concha (9)	Centro (7)	Concha (10)
EV	E <sub>1</sub>	13.8 ± 3.4	13.6 ± 1.5	15.5 ± 2.2	12.0 ± 2.7	15.0 ± 1.8	12.2 ± 2.2	13.2 ± 2.1	10.9 ± 1.6
	E <sub>2</sub>	10.8 ± 4.5	8.0 ± 3.0	6.6 ± 2.2*	10.2 ± 1.6	10.6 ± 2.8	7.5 ± 1.9	8.7 ± 2.0	8.4 ± 1.0
AL	E <sub>1</sub>	1.2 ± 0.2	1.8 ± 0.6	1.6 ± 0.6	2.0 ± 0.6	1.1 ± 0.2	2.2 ± 0.4	0.8 ± 0.2	1.3 ± 0.3
	E <sub>2</sub>	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.6	1.6 ± 0.4	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.2
MC	E <sub>1</sub>	9.8 ± 3.9	9.0 ± 1.7	5.7 ± 1.5	7.3 ± 1.5	7.6 ± 1.3	8.7 ± 1.5	5.1 ± 1.1	11.7 ± 1.9
	E <sub>2</sub>	1.6 ± 0.2*	2.5 ± 1.0*	0.8 ± 0.5*	0.8 ± 0.3*	1.0 ± 0.5*	1.1 ± 0.6*	1.0 ± 0.6	1.7 ± 0.5*

Os dados são expressos como a média ± erro padrão. Os números em parênteses indicam o número de animais por grupo. As fêmeas de ratos receberam microinjeção bilateral de salina, veículo ou DNQX (330 e 660ng) nas sub-regiões centro e concha do NAcc; e foram submetidas à primeira (E<sub>1</sub>) e segunda (E<sub>2</sub>) exposição ao LCE. \*  $p < 0.05$  em relação à respectiva E<sub>1</sub> (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações). MC (mergulho da cabeça); EV (exploração vertical); AL (auto-limpeza).

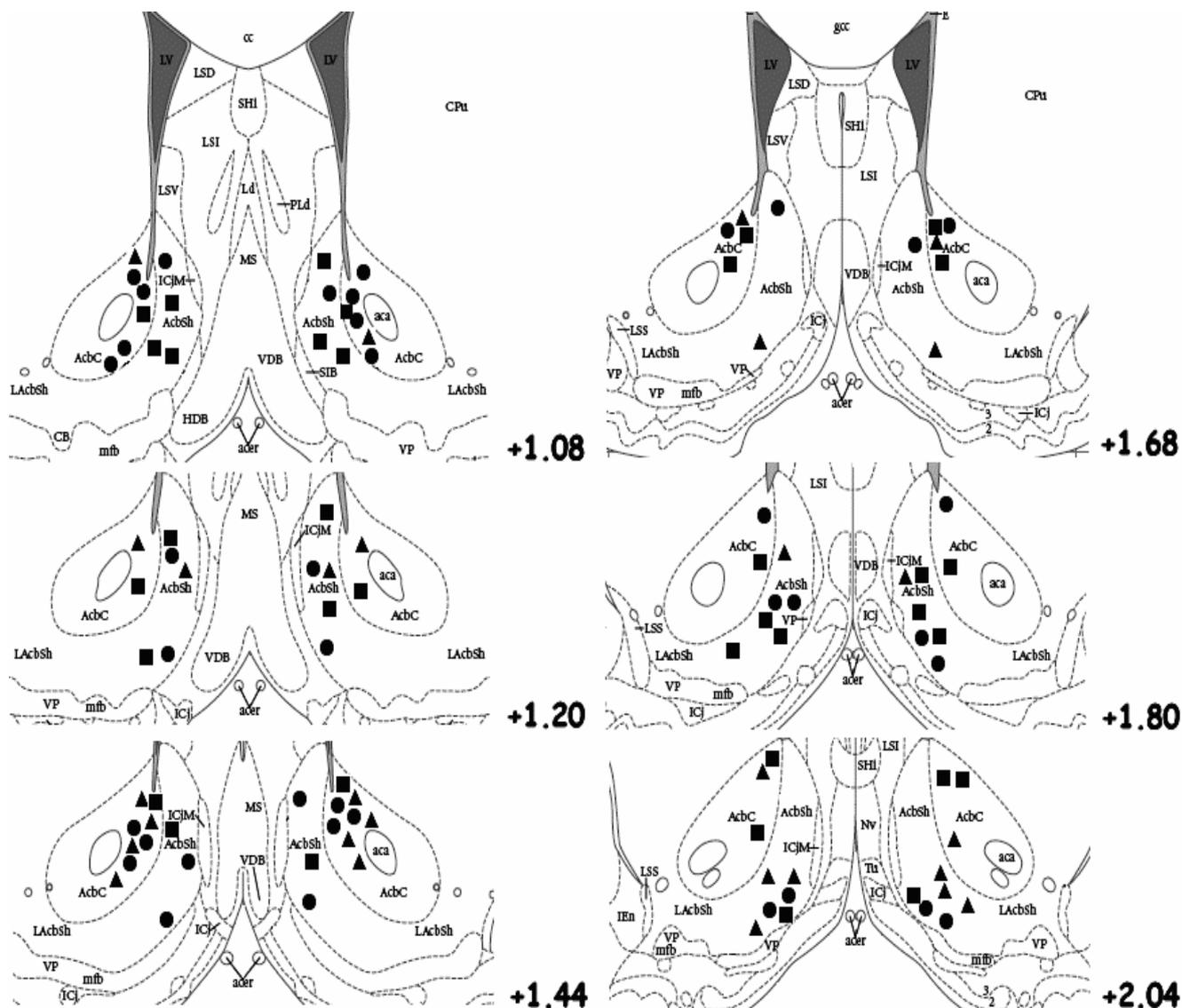
## 4.2 Experimento 2

A análise histológica indicou que do total de 87 fêmeas de ratos utilizadas no segundo experimento (experimento 2), 51 delas tiveram a cânula-guia implantada bilateralmente, nas regiões concha e centro do NAcc (AP variando entre +1,08 e +2,04). Total de acertos bilaterais na concha do NAcc: n=26 microinjeções e no centro do NAcc: n=25 microinjeções. Os acertos foram assim distribuídos: veículo no centro (n=9) e na concha (n=10); CNQX 2,5nmol: centro (n=8) e concha (n=6); CNQX 5,0 nmol: centro (n=8) e concha (n=10). Não foram incluídos na análise estatística aqueles animais cuja histologia revelou outros sítios de microinjeção ou quando não houve acerto bilateral, respectivamente na região da concha e do centro do NAcc (Figura 12).

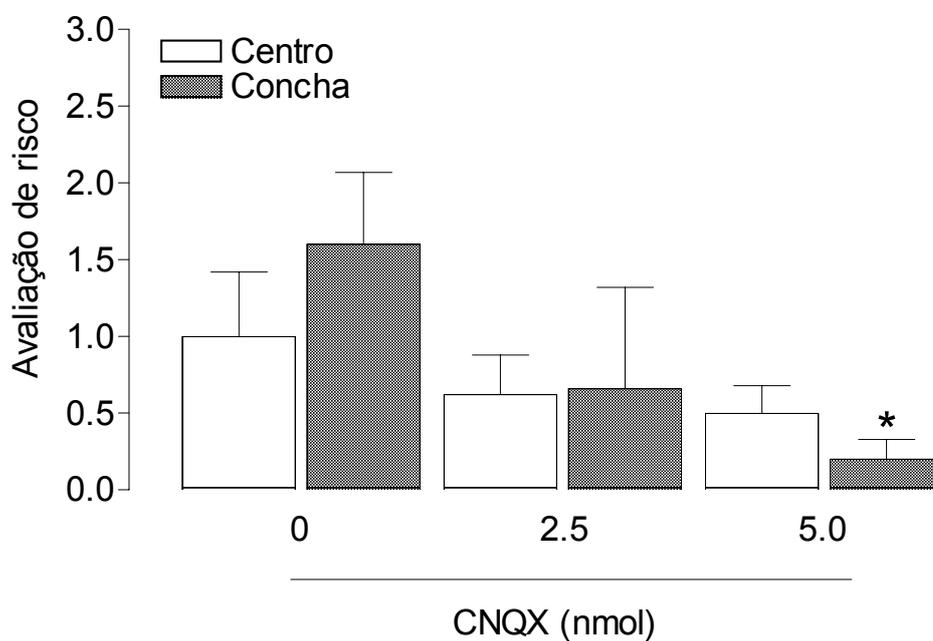
A ANOVA de duas vias indicou um efeito principal significativo para a variável “avaliação de risco” em relação ao fator *droga* (Tabela 3). O teste de Duncan indicou que o grupo o qual recebeu microinjeção bilateral de CNQX na dose de 5,0nmol na sub-região concha do NAcc exibiu uma frequência de avaliação de risco menor em relação ao respectivo grupo que recebeu a microinjeção bilateral de veículo (Figura 13). Com relação à ingestão de alimento após 1h e 24h, exploração do alimento, locomoção, exploração vertical e auto-limpeza, a ANOVA não indicou nenhum efeito principal significativo em relação aos fatores *droga* e *sítio de microinjeção*, nem alguma interação significativa entre os fatores, exceto para a variável exploração vertical (Tabela 3).

A Tabela 4 mostra que a microinjeção de CNQX, seja na sub-região centro, seja na sub-região concha do NAcc, não alterou a ingestão de alimento durante o teste de ingestão (1h) e após 24h, nem a exploração do alimento em

relação ao grupo microinjetado com veículo. As microinjeções de CNQX no centro e na concha do NAcc também não alteraram a locomoção, a exploração vertical e a auto-limpeza na caixa de ingestão.



**Figura 12.** Representação das seções coronais ilustrando os locais atingidos pela microinjeção de veículo e CNQX (2,5 e 5,0nmol) nas sub-regiões centro e concha do NAcc, de acordo com o atlas do cérebro de ratos (PAXINOS e WATSON, 2006). AP entre +1,08 e +2,04mm anterior ao bregma. Veículo (●); (▲) CNQX 2,5nmol; (■) CNQX 5,0nmol: Total de acertos bilaterais: concha do NAcc=26 microinjeções e centro do NAcc=25 microinjeções: AcbC: centro do núcleo accumbens; AcbSh: concha do núcleo accumbens; aca: parte anterior da comissura anterior; acer: artéria cerebral anterior; cc: corpo caloso; CPu: caudado putâmem; ICj: Ilhas Callejas; ICjM: Ilhas Callejas maior; LAcSh: concha lateral do NAcc; LSD: parte dorsal do núcleo septal lateral; LSI: parte intermediária do núcleo septal lateral; LSV: parte ventral do núcleo septal lateral; LV: ventriculo lateral; mfb: prosencéfalo medial; MS: núcleo septal medial; Shi: núcleo septo hippocampal; VP: pálido ventral.



**Figura 13. Efeito ansiolítico induzido pela microinjeção de CNQX nas sub-regiões do núcleo accumbens.** As fêmeas receberam microinjeções bilaterais de salina ou CNQX (2,5 e 5,0nmol) nas sub-regiões centro e concha do NAcc e foram submetidas ao teste de ingestão de alimento na caixa de ingestão. Os dados são representados como a média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo microinjetado com salina (ANOVA de duas vias foi seguida pelo teste de Duncan para múltiplas comparações).

**4.2.3 TABELA 3: Resultados da ANOVA de duas vias indicando os efeitos principais e as interações entre os fatores.**

	Fator 1	Fator 2	Interações
Variável comportamental	Droga (df = 2,45)	Local (df = 1,45)	Droga x Local (df = 2,45)
Ingestão de alimento após 1h (g)	0.64; NS	1.98; NS	0.65; NS
Ingestão de alimento após 24h (g)	0.55; NS	2.37; NS	0.78; NS
Exploração do alimento (sec.)	0.35; NS	0.01; NS	2.37; NS
Locomoção	0.51; NS	3.12; NS	2.76; NS
Avaliação de risco	3.65; $p < 0.05$	0.13; NS	0.80; NS
Exploração vertical	0.08; NS	1.24; NS	3.67; $p < 0.05$
Auto-limpeza	0.42; NS	1.22; NS	0.51; NS

As ratas foram microinjetadas bilateralmente com líquido artificial ou CNQX (2,5 e 5,0 nmol) nas regiões centro e concha do núcleo accumbens e foram submetidas ao teste de ingestão de alimento. NS indica valores de probabilidade não significantes.

**4.2.4 TABELA 4: Variáveis comportamentais exibidas por ratos durante a avaliação da ingestão de alimento após a microinjeção bilateral de CNQX no NAcc.**

Variável	Líquor		CNQX 2.5		CNQX 5.0	
	Centro (9)	Concha (10)	Centro (8)	Concha (6)	Centro (8)	Concha (10)
<b>Ingestão de alimento após 1h (g)</b>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.13 ± 0.1	0.0 ± 0.0
<b>Ingestão de alimento após 24h (g)</b>	11.4 ± 2.5	16.4 ± 0.9	12.5 ± 1.3	12.8 ± 1.1	11.1 ± 2.6	13.0 ± 1.8
<b>Exploração do alimento (seg.)</b>	84.9 ± 16.5	55.6 ± 15.4	55.9 ± 7.9	96.2 ± 22.0	66.5 ± 18.9	58.6 ± 12.4
<b>Locomoção</b>	87.4 ± 18.6	64.0 ± 12.8	38.1 ± 7.2	162.3 ± 35.1	46.4 ± 9.9	124.0 ± 39.5
<b>Exploração vertical</b>	126.4 ± 25.3	75.1 ± 12.1	56.6 ± 11.1	125.8 ± 36.2	67.4 ± 19.7	119.7 ± 33.2
<b>Auto-limpeza</b>	15.1 ± 2.5	15.0 ± 4.37	12.4 ± 1.2	84.2 ± 17.8	11.8 ± 1.1	14.0 ± 3.1

Os dados são apresentados como a média ± erro padrão. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. Os animais receberam microinjeções bilaterais de líquido artificial ou CNQX (2,5 e 5,0nmol) na região centro e concha do NAcc e foram submetidos à avaliação da ingestão de alimento. ANOVA de duas vias não detectou efeitos principais com valores de probabilidade significantes.

## **5 DISCUSSÃO**

Tem sido proposto que durante a primeira exposição ao LCE a exploração do animal é caracterizada por um conflito entre uma pulsão exploratória, motivada talvez por curiosidade; e uma pulsão para evitar a exploração, motivada pela aversão dos braços abertos do labirinto (MONTGOMERY, 1955). Assim, os animais tendem a explorar preferencialmente os braços fechados (PELLOW et al, 1985). Esse conflito interno tem sido considerado análogo à ansiedade (GRAY, 1982) e pode ser amenizado por drogas ansiolíticas clássicas, tais como os benzodiazepínicos (BDZ), as quais reduzem o nível de aversão dos animais pelos braços abertos do LCE e, conseqüentemente, o conflito de exploração. Desse modo, animais tratados com drogas do tipo BDZ tendem a exibir elevada porcentagem de entrada nos braços abertos - %EA e/ou elevada porcentagem de tempo nos braços abertos - %TA (PELLOW et al, 1985).

O presente estudo demonstrou que os animais tratados com DNQX, antagonista glutamatérgico do tipo AMPA, na região da concha do NAcc, apresentaram maior %EA durante a primeira exploração ao LCE em relação aos animais tratados com veículo, ou seja, passaram a exibir menor esquiwa dos braços abertos do labirinto. Portanto, o aumento na %EA e/ou %TA induzida pelo bloqueio dos receptores AMPA na concha do NAcc caracteriza um efeito do tipo ansiolítico nas fêmeas testadas no labirinto (Fig. 7 – E<sub>1</sub>).

De forma similar, a microinjeção de DNQX (660ng) na concha do NAcc aumentou a %EA na primeira exposição, em relação ao respectivo grupo que recebeu a mesma microinjeção no centro do NAcc (Fig. 7- E<sub>1</sub>). Isso indica que o bloqueio dos receptores AMPA é ansiolítico apenas quando o antagonista é administrado na concha do NAcc. De fato, os animais tratados com DNQX (660ng) no centro do NAcc apresentaram a mesma esquia dos braços abertos, exibida pelo grupo tratado com veículo (Fig. 7 – E<sub>1</sub>).

O efeito ansiolítico induzido pela microinjeção de DNQX na concha do NAcc não pode ser atribuído a algum efeito lesivo do DMSO, o veículo utilizado para dissolver a droga. Embora o DMSO seja dotado de propriedade detergente, o que poderia lesionar os neurônios localizados no NAcc, os resultados demonstraram que os animais tratados com DMSO exibiram o mesmo padrão comportamental apresentado pelo grupo tratado com salina. Portanto, ainda que a microinjeção de DMSO tenha induzido alguma lesão neuronal, esta não foi de magnitude suficiente para alterar o comportamento dos animais no LCE. Os resultados experimentais, portanto, sugerem que a maior exploração dos braços abertos, observada no grupo tratado com DNQX na sub-região da concha do NAcc, é decorrente do bloqueio dos receptores AMPA nessa região, reduzindo a aversão dos animais pelos braços abertos e eliminando o conflito de exploração do LCE.

Nossos resultados indicam um papel potencial dos receptores AMPA na concha do NAcc em modular a ansiedade nas fêmeas de ratos Wistar, em concordância com um estudo prévio, mostrando que a microinjeção de NBQX (2,3 dioxo-6-nitro-1,2,3,4,tetrahydrobenzo-quinolina-7-sulfonamida dissódica),

um outro antagonista do receptor AMPA, no NAcc, diminuiu significativamente a esquivas do BA em ratos machos testados no LCE (MARTÍNEZ et al., 2002). Porém, não foi realizada no referido estudo, uma distinção entre os sítios concha e centro do NAcc. Na literatura tem sido proposto que o centro e a concha apresentam funções diferentes, sendo que o centro estaria envolvido na regulação de funções motoras (PULVIRENTI et al., 1994; ZAHM e BROG, 1992), enquanto a concha do NAcc estaria relacionada à regulação de funções límbicas. Portanto, o presente estudo mostrou, pela primeira vez, um envolvimento diferenciado entre as duas sub-regiões do NAcc sobre a modulação da ansiedade no LCE, em fêmeas de ratos.

Tem sido discutido na literatura a importância do centro do NAcc para a locomoção animal em diferentes tarefas, mediando os efeitos de psicoestimulantes sobre a atividade locomotora (BOYE, 2001; PARKINSON et al., 1999a). Porém, alguns estudos indicam que lesões excitotóxicas e eletrolíticas do centro do NAcc não alteraram a atividade locomotora (PARKINSON et al., 1999b) enquanto outros indicam aumento da atividade locomotora (WEINER et al., 1996).

No presente estudo, a administração de DNQX no centro e na concha do NAcc não foi capaz de modificar o número de entradas no BF, um índice aceito como representativo da atividade motora do animal, nem a exploração vertical do animal no LCE. Além do mais o número total de entradas nos braços (TE), uma outra variável que grosseiramente representa a atividade locomotora, também permaneceu inalterada durante a primeira exposição após a administração de DNQX no centro e na concha do NAcc.

Estes resultados estão de acordo com dados prévios da literatura mostrando que nem o número de entradas nos braços fechados nem a exploração vertical foram alterados pelo bloqueio dos receptores AMPA no NAcc (MARTÍNEZ, 2002).

Portanto, o presente estudo indica que a maior exploração dos braços abertos do LCE, induzida pela microinjeção de DNQX na concha do NAcc, não foi decorrente do aumento da atividade locomotora dos animais. Se assim fosse, os animais exibiriam aumento da exploração dos braços abertos e dos braços fechados do labirinto, o que não foi confirmado pelos resultados, ou seja, o número absoluto de entrada em ambos os tipo de braços durante a primeira exposição não foi alterado em relação ao grupo tratado com veículo (Fig. 9 e 10 – E<sub>1</sub>), mas sim a preferência pelos braços.

Recentemente, um estudo no qual foi usado lesão eletrolítica do NAcc mostrou que ratos com lesão na concha do NAcc, mas não no centro, exibiram locomoção reduzida, mas emocionalidade inalterada no LCE (HORSLEY, 2007). Estes resultados contraditórios podem ser explicados por diferenças metodológicas, como o intervalo de tempo entre cirurgia e teste experimental (por exemplo, 7 meses no trabalho de Horsley, e cerca de sete dias, no presente estudo). Além do mais, tratamentos com lesões podem não ser, necessariamente, funcionalmente equivalente ao tratamento farmacológico, uma vez que podem ocorrer danos de fibras de passagem no NAcc.

Com relação ao comportamento de imersão da cabeça, outro comportamento relacionado com o nível de ansiedade dos animais, observamos que este não foi alterado pela microinjeção de DNQX na concha do NAcc durante a primeira exposição ao LCE (Tabela 2).

Sugerimos que a ativação dos receptores AMPA na concha do NAcc talvez não seja necessária para a expressão desse tipo de comportamento, o que poderia explicar esse resultado contraditório.

No presente estudo, não foi efetuada a análise do ciclo ovariano dos animais. Porém, é improvável que o aumento da %EA no LCE, induzido pela microinjeção de DNQX na sub-região concha do NAcc, seja decorrente de flutuações dos níveis hormonais ao longo das diferentes fases do ciclo ovariano. Tem sido demonstrado que quando fêmeas de ratos são testados no LCE sob alto nível de iluminação (200Lux), a %EA não é alterada em qualquer fase do ciclo (MORA et al, 1996). Em uma pesquisa cujo nível de iluminação do LCE não é informado, a %EA também não se altera em nenhuma fase do ciclo estral (NOMIKOS e SPYRAKI, 1988). Em outros dois estudos, os quais também não informam os níveis de luminosidade utilizados, a %EA também não se altera nas fases de proestro e diestro (MARCONDES et al, 2001; BITRAN et al, 1991). A %EA só se mostra alterada (elevada nas fases de proestro e estro) quando os animais são testados sob baixo nível de iluminação (10 Lux; MORA et al, 1996; DÍAZ-VÉLIZ et al, 1997), o que não é o caso do presente estudo (373 Lux nos braços abertos e 284 Lux nos braços fechados).

Portanto, é provável que o efeito ansiolítico induzido pela microinjeção de DNQX na concha do NAcc seja decorrente do bloqueio dos receptores AMPA, e não de alterações comportamentais induzidas pelas diferentes fases do ciclo ovariano.

O presente estudo mostrou que o bloqueio do receptor AMPA na concha do NAcc foi capaz de reduzir comportamento motivado pelo medo, tal como esquiva dos braços abertos no LCE. Na literatura, tem sido demonstrado que a microinjeção de DNQX (na dose 850ng) em sítios mais caudais da concha do NAcc (1,1mm a 0,5mm anterior ao bregma) induz comportamentos defensivos em ratos de ambos os sexos, tais como: cavar defensivamente, fugas, mordidas defensivas e vocalizações durante a aproximação de perigo (REYNOLDS e BERRIDGE, 2003).

Quando o DNQX foi administrado em sítios mais rostrais da concha (1,2mm a 2,2mm anterior ao bregma), pequena soma de comportamento defensivo ainda esteve presente, ou mesmo ausente (REYNOLDS e BERRIDGE, 2003). Uma vez que o bloqueio dos receptores AMPA em regiões rostrais, e especialmente caudais da concha do NAcc induz comportamentos defensivos, é possível concluir que a ativação de tais receptores pelo glutamato na concha do NAcc de ratos machos ou fêmeas seja ansiolítica.

Ao contrário, o presente estudo indica que o bloqueio dos receptores AMPA em sítios rostrais (1,08mm a 2,16mm anterior ao bregma) da concha do NAcc é capaz de inibir o comportamento defensivo de esquiva dos braços abertos do LCE, indicando que a ativação de receptores do tipo AMPA, pelo

glutamato, em sítios rostrais da concha do NAcc, é ansiogênica em ratos. É difícil explicar esses dados contraditórios relacionados ao efeito da microinjeção de antagonistas AMPA na concha do NAcc sobre a emocionalidade do animal (ansio gênese ou ansiólise).

Em humanos, o mesmo contraste é apresentado, pois a estimulação cerebral profunda da região da concha do NAcc reduziu a severidade de sintomas em pacientes com distúrbios de ansiedade (STURM et al, 2003), mas provocou pânico em paciente idoso com distúrbio obsessivo-compulsivo refratário (SHAPIRA et al, 2006). Assim, ambos os resultados da pesquisa básica e clínica são contraditórios, indicando que o papel do NAcc sobre a regulação do nível de ansiedade é ainda controverso e necessita de maiores estudos, especialmente utilizando outros modelos animais de ansiedade.

Tem sido demonstrado na literatura que o NAcc é uma região importante para a aprendizagem e memória espacial, em decorrência de suas conexões com regiões corticais e hipocâmpais (SARGOLINI, et al., 2003). Recentemente, foi demonstrado que tanto a ativação dos receptores do tipo AMPA, quanto os do tipo NMDA, são importantes para a aprendizagem espacial (FERRETI et al., 2007).

No tocante ao LCE, os resultados deste estudo demonstram que animais tratados com salina, seja na concha, seja no centro do NAcc, apresentaram elevada esquiva dos braços abertos (Fig. 8 – E<sub>2</sub>) e menor imersão de cabeça (Tabela 2) na segunda exposição, quando comparados com as respectivas primeiras exposições. Esses resultados estão de acordo com a literatura,

demonstrando que a experiência prévia ao LCE altera de forma significativa o comportamento dos animais na segunda exposição, caracterizado por elevada esquiva dos braços abertos (FILE, 1992).

Tem sido proposto que durante a exploração o animal recebe informações sensoriais sobre o LCE (tátil, visual, olfativa), as quais são integradas no sistema nervoso central, criando um contexto real e representativo da experiência. Assim, é possível assumir que o comportamento do animal, em um dado minuto de exploração, é dependente da experiência obtida no minuto anterior. De fato, quando o comportamento dos animais, na primeira exposição ao LCE, é fracionado em blocos de um minuto, verifica-se que a esquiva dos braços abertos aumenta durante o tempo de exploração, sendo que, no final da sessão, é estatisticamente superior àquela exibida no início da sessão (ROSA et al., 2000; GUIZONI et al, 2006). No dia seguinte, quando o animal é re-exposto ao LCE, a memória da exploração anterior é evocada, e o animal inicia a segunda exploração com elevada esquiva, já no primeiro minuto (ROSA et al., 2000). Como a esquiva dos BA é motivada pelo medo de espaços abertos e/ou iluminados, é possível assumir que ratos desenvolvem aprendizagem emocional durante a exposição ao LCE, a qual depende da duração da primeira exposição (DÁL-CÓL et al, 2003), do fornecimento de glicose ao sistema nervoso central e da ativação de aferências vagais (GHIZONI et al, 2006).

Os resultados demonstraram, ademais, que semelhantemente ao grupo tratado com salina, os grupos tratados com veículo e DNQX também apresentaram elevada esquiva dos braços abertos (Fig. 7 e Fig. 8 – E<sub>2</sub>) e

menor ocorrência de imersão de cabeça (Tabela 2) na segunda exposição, quando comparadas com a primeira. Além disso, nenhum tratamento, seja com veículo, seja com DNQX, alterou o padrão exploratório dos animais ou as variáveis etológicas na segunda exposição ao LCE em relação ao grupo tratado com salina. Os resultados sugerem que essa menor exploração dos braços abertos na segunda exposição não é decorrente de habituação locomotora ou depressão motora, visto que o número de entrada nos braços fechados e o número de comportamentos de auto-limpeza (Tabela 2) se mantiveram iguais àqueles exibidos na primeira exposição (Fig. 10 – E<sub>2</sub>).

Os dados do presente estudo, mostrando a ocorrência de elevada esquia dos braços abertos na segunda exposição, em animais pré-tratados com veículo ou DNQX, indicam que nem a propriedade detergente do DMSO, tampouco o bloqueio dos receptores do tipo AMPA no NAcc foram capazes de prejudicar tal aprendizagem. Portanto, é possível concluir que a ativação dos receptores do tipo AMPA, seja na sub-região centro, seja na concha do NAcc não é a condição mais importante para a ocorrência de aprendizagem emocional no LCE.

Sob o ponto de vista evolutivo, tem sido proposto que o NAcc evoluiu no sentido de controlar comportamentos críticos para a sobrevivência da espécie, por exemplo, comportamentos defensivos e de ingestão (KELLEY, 2004). Ou seja, há uma relação benéfica entre ansiedade e comportamento ingestivo. De fato, alimentar-se e proteger-se de ameaças potenciais são aspectos importantes para sobrevivência do animal, especialmente considerando-se um contexto presa/predador.

Nesse sentido, seria vantajoso para o animal exibir motivação para comer enquanto nenhum perigo em potencial estiver presente e, ao mesmo tempo, ser capaz de substituir rapidamente a ingestão de alimento por comportamentos defensivos, tais como fuga ou esquiva, quando um perigo em potencial se apresenta. Os dados da literatura mantêm a idéia de que o NAcc pode ser o substrato neural de tal processo.

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que a inibição da sub-região da concha do NAcc pela ativação dos receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub> suprimiu a ocorrência de comportamentos defensivos (ansiólise) e induziu hiperfagia em ratos (LOPES et al., 2007). Portanto, levando-se em consideração a neurotransmissão GABAérgica no NAcc, é possível supor que a ocorrência de ansiólise e hiperfagia, ou ainda ansiogênese e hipofagia, pode ter elevado valor adaptativo para a sobrevivência animal. Caso essa predição seja verdadeira, a motivação do animal para comer e se defender deve emergir da modulação do GABA na sub-região da concha do NAcc.

Com relação ao glutamato, seria possível estabelecer que a mesma relação pudesse estar ocorrendo na concha do NAcc, visto que a literatura tem demonstrado que o bloqueio dos receptores AMPA na concha do NAcc induz hiperfagia em ratos (KELLEY e SWANSON, 1997) e os resultados do experimento 1 apontam para um efeito ansiolítico induzido pelo bloqueio dos receptores AMPA na concha do NAcc (Da CUNHA et al, 2008). Entretanto, os resultados do experimento 2 contradizem tal predição.

No experimento 2 os resultados mostraram que a microinjeção de 5,0 nmol de CNQX (outro antagonista dos receptores AMPA) na concha do NAcc reduziu significativamente a ocorrência de avaliação de risco na caixa de ingestão (Figura 13).

Na literatura, o comportamento de avaliação de risco tem sido interpretado como um comportamento específico de coleta de informações do ambiente quando o animal encontra-se em situações potencialmente ameaçadoras ou perigosas (PINEL e MANA, 1993). A avaliação de risco também é considerada um comportamento indicativo de um conflito entre explorar e evitar a exploração um determinado ambiente (VAN der POEL, 1979). Esse conflito pode ser evocado pelo animal em uma diversidade de situações ameaçadoras, incluindo contextos sociais, não sociais e predatórios (BLANCHARD e BLANCHARD, 1989; BLANCHARD et al, 1995; KAESERMAN, 1986; VAN der POEL, 1979).

Além disso, o comportamento de avaliação de risco está altamente relacionado com a liberação de corticosterona (RODGERS et al, 1999), e é sensível ao efeito de drogas ansiolíticas e ansiogênicas (GRIEBEL et al, 1997; SETEM et al, 1999). Uma vez que o experimento 2 demonstrou que a microinjeção de CNQX no interior da concha do NAcc diminuiu a ocorrência da avaliação de risco, é possível estabelecer que o bloqueio dos receptores AMPA na concha do NAcc é ansiolítico em ratos, confirmando os resultados do experimento 1, mostrando que o bloqueio dos receptores AMPA na concha do NAcc é ansiolítica em ratos Wistar fêmeas. Além disso, os resultados do experimento 2 corroboram os dados do experimento 1, na medida em que

demonstram que o efeito ansiolítico induzido por CNQX é seletivo para a sub-região concha, e não ocorre quando o CNQX é microinjetado no centro do NAcc (Figura 13).

Entretanto, os resultados relativos à ingestão de alimento do experimento 2 não estão em consonância com a literatura. Tem sido proposto na literatura que o glutamato exerce uma ativação tônica dos receptores AMPA localizados nos neurônios médios espinhais da concha do NAcc, os quais são GABAérgicos e projetam-se para o hipotálamo, inibindo a ingestão de alimento pelo animal (KELLEY et al, 2005). Essa teoria é fundamentada no fato da microinjeção de antagonista de receptores AMPA na concha do NAcc induzir hiperfagia em ratos não privados de alimento (MALDONADO-IRIZARRY et al, 1995; KELLEY e SWANSON, 1997; STRATFORD et al, 1998). Assim, a ausência das influências inibitórias da concha do NAcc sobre a circuitaria hipotalâmica relacionada à alimentação resultaria em um estado motivacional para ingestão de alimento (KELLEY et al, 2005).

Ao contrário da teoria de Kelley, também tem sido demonstrado que a microinjeção de um agonista AMPA na concha do NAcc aumenta, de forma dose/dependente, a ingestão de alimento em ratos (ECHO et al, 2001), em semelhança à microinjeção do mesmo agonista no hipotálamo lateral (KHAN et al, 1999; STANLEY et al, 1996; STANLEY et al, 1993). Além disso, a microinjeção de AMPA na concha do NAcc foi capaz de aumentar o efeito hiperfágico, induzido por DAMGO ( RAGNAUTH et al, 2000), um agonista opióide seletivo do receptor  $\mu$  (ECHO et al, 2001), reforçando o papel do

glutamato e dos opióides endógenos na concha do NAcc, em aumentar a ingestão de alimento.

No presente estudo, o bloqueio do receptor AMPA na concha do NAcc pelo antagonista CNQX não modificou o comportamento de ingestão. Não houve aumento da ingestão de alimento durante o teste na caixa de ingestão (1h), nem 24 horas após a microinjeção da droga. Além do mais, a exploração do alimento, determinada pelo tempo que o animal permanece com o alimento na boca, tanto segurando quanto mastigando uma porção de ração, não foi alterada pela microinjeção de CNQX na concha do NAcc.

É possível que este resultado contraditório possa ser explicado por diferenças metodológicas, tais como: a utilização de animais alojados individualmente (isolados) contra animais alojados em grupo (agrupados); número de habituações prévias para a caixa experimental, a fim de alcançar a estabilização da linha de base para a ingestão de alimento; animais, recebendo mais de uma microinjeção de droga ou veículo, contra animais que receberam somente uma microinjeção de droga. Também é possível que esses resultados contraditórios possam ser explicados pela influência dos níveis hormonais ao longo das diferentes fases do ciclo ovariano, o qual não foi considerado neste estudo, e tampouco em estudos prévios usando fêmeas de ratos como sujeitos experimentais (REYNOLDS e BERRIDGE, 2001; REYNOLDS e BERRIDGE, 2003).

Portanto, se o glutamato pode aumentar a ingestão de alimento pela ativação do receptor AMPA na concha do NAcc (ECHO et al., 2001), é factível

que a microinjeção de antagonistas dos receptores AMPA na concha do NAcc não altere a ingestão de alimentos nos animais, especialmente se a influência do glutamato sobre o comportamento alimentar na sub-região concha do NAcc, não for nem tônica, nem inibitória sobre a ingestão de alimento.

## **6 CONCLUSÕES**

- A administração bilateral de DNQX na sub-região da concha do NAcc induziu um efeito do tipo ansiolítico em ratos fêmeas submetidas ao LCE, caracterizado por um aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto.
- A maior exploração dos braços abertos induzida pela microinjeção bilateral de DNQX na sub-região da concha do NAcc não parece ser decorrente de alteração na atividade locomotora dos animais.
- O efeito ansiolítico no LCE, induzido pela microinjeção bilateral de DNQX no NAcc, é seletivo para a sub-região da concha, pois não ocorre após a microinjeção da droga na sub-região do centro do NAcc.
- A ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA no NAcc (no centro ou na concha) não está envolvida com a ocorrência de aprendizagem emocional no LCE.

- A microinjeção de CNQX (outro antagonista AMPA) na sub-região da concha do NAcc, mas não na sub-região do centro, induziu um efeito do tipo ansiolítico em ratos fêmeas na caixa de ingestão, caracterizado por uma supressão do comportamento de avaliação de risco.
- A microinjeção de CNQX nas sub-regiões do centro e da concha do NAcc, não alterou a ingestão de alimento em ratos fêmeas na caixa de ingestão.

## 7 REFERÊNCIAS:

BALDO, B. A. & KELLEY, A. E. **Discrete neurochemical coding of distinguishable motivational processes: insights from nucleus accumbens control of feeding.** *Psychopharmacology*. 191: 439–459, 2007.

BASSAREO, V; DI CHIARA, G. **Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments.** *Neuroscience*. 89: 637– 641, 1999.

BERENDSE, H. K; GALIS, D. E.; GRAAF, Y.; GROENEWEGEN, H. J. **Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat.** *J Comp Neurol*. 316: 314–367, 1992.

BERGINK, V; HAROLD, J.G.M van M; HERMAN, G.M.W. **Glutamate and anxiety** *Europ Neuropsychopharmacol*. 14: 175-183, 2004.

BERNARD, V; SOMOGYI, P; BOLAM, J.P. **Cellular, subcellular, and subsynaptic distribution of AMPA-type glutamate receptor subunits in the neostriatum of the rat.** *J Neurosci*. 17: 819–833, 1997.

BERRIDGE, K.C.; VALENSTEIN, E.S. **What psychological process mediates feeding evoked by electrical stimulation of the lateral hypothalamus?** *Behav Neurosci*. (1) 105: 3– 14, 1991.

BITRAN, D.; HILVERS, R.J.; KELLOG, C.K. **Ovarian endocrine status modulates the anxiolytic potency of diazepam and the efficacy of  $\gamma$ -aminobutyric acid-benzodiazepine receptor-mediated chloride ion transport.** *Behav Neurosci*. 105: 653-662, 1991.

BLANCHARD, R.J; BLANCHARD, D.C. **Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system.** *J Comp Psychol*. 103: 70–82, 1989.

BLANCHARD, R.J; PARMIGIANI, S; BJORNSON, C; MASUDA, C; WEISS, S.M; BLANCHARD, D.C. **Antipredator behavior of Swiss–Webster mice in a visible burrow system.** *Aggress Behav*. 21: 123–36, 1995.

BOTTJER, S.W. **Neural strategies for learning during sensitive periods of development.** *J Comp Physiol. A*, 188: 917– 928, 2002.

BOULTER, J; HOLLMANN, M; O'SHEA-GREENFIELD, A; HARTLEY, M; DENERIS, E; MARON, C; HEINEMANN, S. **Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes.** *Science*. 249 (4972): 1033-7, 1990.

BOYE, S.M; GRANT, R.J; CLARKE, P.B. **Disruption of dopaminergic neurotransmission in nucleus accumbens core inhibits the locomotor stimulant effects of nicotine and d-amphetamine in rats.** *Neuropharmacology*. 40:792–805, 2001.

BREDT, D.S; NICOLL, R.A. **AMPA receptor trafficking at excitatory synapses,** *Neuron* 40: 361– 379, 2003.

BROG, J.S; SALYAPONGSE, A; DEUTCH, A.Y; ZAHM, D.S. **The patterns of afferent innervation of the core and shell in the ‘accumbens’ part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold.** *J Comp Neurol*. 338 (2): 255 – 278, 1993.

CARDINAL, R.N.; PARKINSON, J.A.; HALL, J.; EVERITT, B.J. **Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex.** *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26: 321–352, 2002.

CARLEZON, W. A; WISE, R A. **Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex.** *J Neurosci*. 16: 3112–3122, 1996.

CHEN, Q; VEENMAN, L; KNOPP, K; YAN, Z; MEDINA, L; SONG, W.J; SURMEIER, D.J; REINER, A. **Evidence for the preferential localization of glutamate receptor-1 subunits of AMPA receptors to the dendritic spines of medium spiny neurons in rat striatum.** *Neuroscience*. 83: 749– 761, 1998.

CHENG, J.J.; De BRUIN, J.P.C.; FEENSTRA, M.G.P. **Dopamine efflux in nucleus accumbens shell and core in response to appetitive classical conditioning.** *Eur J Neurosci*. 18: 1306-1314, 2003.

CHURCHILL, L. & KATIVAS, P.W. A topographically organized gamma-aminobutyric acid projection from the ventral pallidum to the nucleus accumbens in the rat. *J. Comp. Neurol*. 345: 579-595, 1994.

COSTALL, B.; NAYLOR, R.J.; TYERS, M.B. **The psychopharmacology of 5-HT<sub>3</sub> receptors.** *Pharmacol. Ther.* 47: 181–202, 1990.

COTMAN, C.W; KAHLE, J.S; MILER, S.E. **Excitatory amino acid Neurotransmission.** In: BLOOM, F.E., KUPFER, D.J. *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress.* Raven Press. New York, 1995.

CRUZ, A. P. M; FREI, F; GRAEFF, F. G. **Ethopharmacological Analysis of rat behavior on the Elevated Plus-Maze.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 49, Nº 1: 171-176, 1994.

DA CUNHA, I.C.; JOSÉ, R.F.; ORLANDI PEREIRA, L.; PIMENTA, J.A; OLIVEIRA DE SO UZA, I.A.; REISER, R.; MORENO JUNIOR, H.; MARINO NETO, J.; PASCHOALINI, M.A; FARIA, M.S. **The role of nitric oxide in the emotional learning of rats in the plus maze.** *Physiol Behav*. 83: 351-358, 2005.

DA CUNHA, I.C., LOPES, A.P.F., STEFFENS, S.M., FERRAZ, A., VARGAS, J.C., DE LIMA, T.C.M., MARINO NETO, J., PASCHOALINI, M.A., FARIA, M.S. **The microinjection of AMPA receptor antagonist into the accumbens shell, but not into the accumbens core, induces anxiolysis in an animal model of anxiety.** *Behav. Brain Res.* 188: 91-99, 2008.

DAVID, J. D; ZAHNISTER, N.R; HOFFER, B.J; GERHARDT, G. A. **In vivo electrochemical studies of dopamine clearance in subregions of rat nucleus accumbens: differential properties of the core and shell.** *Exp Neurol.* 153: 277–286, 1998.

DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSEL, M. **Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety.** *Trends Neurosci.* 17: 208– 214, 1994.

DI CHIARA, G; IMPERATO, A. **Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 5274 –5278, 1998.

DI CHIARA, G; TANDA, G; FRAU, R; CARBONI, E. **On the preferential release of dopamine in the nucleus accumbens by amphetamine: further evidence obtained by vertically implanted concentric dialysis probes.** *Psychopharmacology Berl.* 112: 398–402, 1993.

DINGLEDINE, R; BORGES, K; BOWIE, D; TRAYNELIS, S.F. **The glutamate receptor ion channels.** *Pharmacol Ver.* 51(1): 7-61, 1999.

DUGAL, J.R., HOFFMAN, J., MORGANE, P.J., GELLER, J.R., MOKLER, D.J. **Interactions between the median (MRN) and dorsal (DRN) raphe nuclei as studied by dual probe microdialysis.** *Experimental Biology*, 643 - 8, 2003.

DUVA, M.A.; TOMKINS, E.M.; MORANDA, L.M.; KAPLAN, R.; SUKHASEUM, A.; JIMENEZ, A.; STANLEY, B.G. **Reverse microdialysis of N-methyl-D-aspartic acid into the lateral hypothalamus of rats: effects on feeding and other behaviors.** *Brain Res.* 921(1–2): 122 –32, 2001.

ECHO, J.A.; LAMONTE, N.; CHRISTIAN, G.; ZNAMENSKY, V.; ACKERMAN, T.F.; BODNAR, R.J. **Excitatory amino acid receptor subtype agonists induce feeding in the nucleus accumbens shell in rats: opioid antagonist actions and interactions with  $\mu$ -opioid agonists.** *Brain Res.* 921: 86-97, 2001.

FERRETTI, V; DE LEONIBUS, E; COSTANTINI, VJA; CASTELLANO, C; OLIVERIO, A; MELE, A. **Effects of intra-accumbens NMDA and AMPA receptor antagonists on short-term spatial learning in the Morris water maze task.** *Behav Brain Res.* 179: 43-49, 2007.

FILE, S. E. **Behavioural detection of anxiolytic action.** In J. M. Elliott, D. J. Heal, & C. A. Marsden (Eds.), *Experimental approaches to anxiety and depression.* New York: John Willey & Sons. 25-44, 1992.

FILE, S.E. **The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze.** Behav Brain Res. 58: 199-202, 1993.

FILE, S.E.; ZANGROSSI, H. **“One trial tolerance” to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state?** Psychopharmacology. 110: 240-244, 1993.

FRENCH, S.J; TOTTERDELL, S. **Individual nucleus accumbens projection neurons receive both basolateral amygdala and ventral subicular afferents in rats.** Neurosci. 119: 19-31, 2003.

GARGIULO, P.A. **Thyrotropin releasing hormone injected into the nucleus accumbens septi selectively increases face grooming in rats.** Bras J Med Biol Res., 29: 805- 810, 1996.

GHIZONI, D.M; MORO, JOÃO L; MORATELLI NETO, L; DA CUNHA, I.C; PEREIRA, L.O; BORGES, F.R.M; BATTISTI, R; GUEDES DE OLIVEIRA, L; MENEGHINI, L; LUCINDA, A.M; MARINO NETO, J; PASCHOALIN, M.A; FARIA, M.S. **The effects of metabolic stress and vagotomy on emotional learning in an animal model of anxiety.** Neurobiol Learn Mem. 86: 107–116, 2006.

GRAEFF, F.G. **Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviours and related emotions in mammals.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 27: 811 - 829, 1994.

GRAY, J.A. **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system.** New York: Oxford University Press, 1982.

GRIEBEL, G; RODGERS, R.J; PERRAULT, G; SANGER, D.J. **Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test.** Pharmacol Biochem Behav. 57: 817–27, 1997.

GROENEWEGEN, H. J; WRIGHT, C; BEIJER, A.V. **The nucleus accumbens: Gateway for limbic structures to reach the motor system.** Prog Brain Res. 107: 485–511, 1996.

GROENEWEGEN, H.J.; UYLINGS, H.B.M. **The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information.** Prog Brain Res. 126: 3-28, 2000.

HAINES, D.E. **Neurociência Fundamental para aplicações básicas e clínicas.** 3ª edição. Editora Elsevier. RJ. 297-301, 2006.

HALFORD, J.C.G.; WANNINAYAKE,S.C.D.;BLUNDELL,J.E. **Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake.** Pharmacol Biochem Behav. 61(2): 159-168, 1998.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. **Effects of  $\alpha$ 2-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of fear- motivated behavior.** N S Arch Pharmacol. 327: 1-5, 1984.

HEIDBREder, C.A.; GROENEWEGEN, H.J. **The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorsoventral distinction based upon functional and anatomical characteristics.** Neurosci Biobehav Rev. 27: 555-579, 2003.

HEIMER, L.; ZAHM, D.S; CHURCHILL, L; KALIVAS, P.W; WOHLTMANN, C. **Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat.** Neuroscience. 41: 89 –125, 1991.

HEIMER, L. **The human brain and spinal cord: functional neuroanatomy and dissection guide.** Springer Verlag. 2nd ed. 1995.

HEIMER, L.; SWITZER, R.C.; VAN HOESEN, G.V. **Ventral striatum and ventral pallidum.** *Trends Neurosci*, 1982, 5:83-7. In: HEIMER L. A new anatomical framework for neuropsychiatric disorders and drug abuse. Am J Psychiatry. 160 (10): 1726-39, 2003.

HEIMER. L.; VAN HOESEN, G.W. **The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior.** Neurosci Biobehav Rev. 30 (2): 126-47, 2006.

HETEM, L.A.B; GRAEFF, F. G; NARDI, A.E. **Transtornos de ansiedade.** São Paulo: Editora Atheneu. cap. 10: 231-259, 2004.

HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. **Cloned glutamate receptors.** Annu. Rev. Neurosci. 17: 31–108, 1994.

HOLMES, A; RODGERS, R.J. **Responses of Swiss Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state?** Pharmacol Biochem Behav. 60: 473-488, 1998.

HORSLEY, R.R; NORMAN, C; CASSADAY, H.J. **Lesions of the nucleus accumbens shell can reduce activity in the elevated plus-maze.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych. 31: 906–14, 2007.

HORVITZ, J.C. **Dopamine gating of glutamatergic sensorimotor and incentive motivational input signals to the striatum.** Behav Brain Res. 137: 65-74, 2002.

HUETTNER, J.E. **Kainate receptors and synaptic transmission.** Prog Neurobiol., 70(5): 387-407, 2003.

JACOBS, B. L.; AZMITIA, E.C. **Structure and function of the brain serotonin system.** Physiol. Rev. 72: 165–229, 1992.

JENKINS, R. **Sex differences in minor psychiatric disorder.** Psychol Med. 7: 1-53, 1985.

JONES, S.R; O'DELL, S.J; MARSHALL, J.F; WIGHTMAN, R.M. **Functional and anatomical evidence for different dopamine dynamics in the core and shell of the nucleus accumbens in slices of rat brain.** Synapse. 23: 224 – 231, 1996.

KAESERMANN, H.P. **Stretched attend posture, a non-social form of ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drug action.** Psychopharmacology (Berlin). 89: 31–37, 1986.

KALUEFF, A.V.; WHEATON, M; MURPHY, D.L. **What's wrong with my mouse model?** Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. Behavioural Brain Research. 179: 1-18, 2007.

KAYE, W.H.; KLUMP, K.L.; FRANK, G.K.; STROBER, M. **Anorexia and bulimia nervosa.** Annu Rev Med. 51: 299-313, 2000.

KAWAGUCHI, Y.; WILSON, C.J.; AUGOOD, S.J. & EMSON, P.C. **Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization.** Trends Neurosci. 18: 527-535, 1995.

KELLEY, A.E.; DOMESICK, V.B. **The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: an anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study.** Neuroscience. 7: 2321–2335, 1982.

KELLEY, A.E.; SMITH-ROE, S.L.; HOLAHAN, M.R. **Response-reinforcement learning is dependent on N-methyl-D-aspartate receptor activation in the nucleus accumbens core.** Proc Nat. Acad Sci USA. 94: 12174-12179, 1997.

KELLEY, A.E.; SWANSON, C.J. **Feeding induced by blockade of AMPA and kainite receptor within ventral striatum: a microinfusion mapping study.** Behav Brain Res. 89: 107-113, 1997.

KELLEY, A.E. **Functional specificity of ventral striatal compartments in appetitive behaviors.** Ann. N Y Acad Sci. 977: 71-90, 1999.

KELLEY, A.E. **Neural integrative activities of nucleus accumbens subregions in relation to motivation and learning.** Psychobiology. 27: 198–213, 1999 b.

KELLEY, A. E; BERRIDGE, K.C. **The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs.** J Neurosci. 22(9): 3306-3311, 2002.

KELLEY, A.E. **Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward- related learning.** Neurosci Biobehav Rev. 27: 765-776, 2004.

KELLEY, A.E.; BALDO, B.A.; PRATT, W.E.; WILL, M.J. **Cortico-striatal-hypothalamic circuitry and food motivation: Integration of energy, action and reward.** Physiol Behav. 86: 773 – 795, 2005.

KHAN, A.M.; CURRAS, M.C.; DAO, J.; JAMAL, F.A.; TURKOWSKI, C.A.; GOEL, R.K. GILLARD, E.R.; WOLFSOHN, S.D.; STANLEY, B.G. **Lateral hypothalamic NMDA receptor subunits NR2A and/or NR2B mediate eating: immunohistochemical/behavioral evidence.** Am. J. Physiol. 276: R880-R891, 1999.

KOOB, G.F. **Neurobiology of addiction: Toward the development of new therapies.** Ann. N. Y. Acad. Sci. 909: 170–185, 2000.

KÖTTER, R., MEYER, N. **The limbic system: a review of its empirical foundation.** Behav. Brain Res. 52: 105–127, 1992.

KRYSTAL, J.H; D'SOUZA, D.C; ISMENE, L. **NMDA agonists and antagonists as probes of glutamergic dysfunction and pharmacotherapies in neuropsychiatric disorders.** Harv. Rev. Psychiatry. 7 (3): 125– 143, 1999.

LEDOUX, J.E. **Emotion, memory and the brain.** Sci. Am. 4: 32– 39, 1994.

LEDOUX, J.E. **O cérebro emocional.** 2ª edição. Editora Objetiva. RJ. 8: 206-243, 1998.

LOPES, APF; Da CUNHA, IC; STEFFENS, SM; FERRÁZ, A; VARGAS, JC., De LIMA, TCM; MARINO NETO, J; FARIA, MS; PASCHOALINI, MA. **GABAA and GABAB agonist microinjections into medial accumbens shell increase feeding and induce anxiolysis in an animal model of anxiety,** Behav Brain Res. 184: 142-149, 2007.

MALDONADO-IRIZARRY, C.S.; SWANSON, C.J.; KELLEY, A.E. **Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control of feeding behavior via the lateral hypothalamus.** J Neurosci. 15: 6779-6788, 1995.

MARCONDES FK, MIGUEL KJ, MELO LL, SPADARI-BRATFISCH RC. **Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test.** Physiol Behav. 74: 435-440, 2001.

MAREN, S. **Synaptic transmission and plasticity in the amygdala.** Mol. Neurobiol. 13:1– 22, 1996.

MARTÍNEZ, G.; ROPERO, C.; FUNES, A.; FLORES, E.; BLOTTA,C.; LANDA,A.I.; GARGIULO, P.A. **Effects of selective NMDA and non-NMDA blockade in the nucleus accumbens on the plus-maze test.** Physiol Behav. 76: 219-224, 2002.

Mc DONALD, A. J.; JACKSON, T. R. **Amygdaloid connections with posterior insular and temporal cortical areas in the rat.** J Comp Neurol. 262(1): 59-77, 1987.

McGAUGH, J. **Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage.** Annual Review of Neuroscience. 12: 255–287, 1989.

MELLO, E.; VILLARES, J. Neuroanatomy of the basal ganglia. *Psychiatr Clin North Am.* 20(4): 691-704, 1997.

MEREDITH, G.E. The synaptic framework for chemical signaling in nucleus accumbens. *Ann. NY Acad. Sci.* 877, 140- 156, 1999.

MESSIER, C. **Glucose improvement of memory: A review.** *European Journal of Pharmacology.* 490: 33–57, 2004.

MOGENSEN, G. J; JONES, D.L; YIM, C.Y. **From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system.** *Prog Neurobiol.* 14: 69-97, 1980.

MONTGOMERY, K.C. **The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour.** *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48: 254-260, 1955.

MORA, S; DUSSAULBAT, N; DÍAZ-VÉLIZ, G. **Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats.** *Psychoneuroendocrinol.* 21: 609-620, 1996.

MORGANE, P. J; GALLER, J.R; MOKLER, D.J. **A review of systems and networks of the limbic forebrain/ limbic midbrain.** *Progress in Neurobiol.* 75 (2): 143-160, 2005.

NAKANISHI, S. **Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function.** *Science.* 258: 597– 603, 1992.

NOMIKOS, GG; SPYRAKI, C. **Influence of oestrogen on spontaneous and diazepam-induced exploration of rats in an elevated plus maze.** *Neuropharmacology.* 27 691-696, 1988.

ORLANDI PEREIRA, L.; DA CUNHA, I.C.; MARINO NETO, J.; PASCHOALINI, M. A.; & FARIA, M. S. **The gradient of luminosity between open/ enclosed arms, and not the absolute level of lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze.** *Behavioural Brain Research.* 159: 55–61, 2005.

PARKINSON, J.A; OLMSTEAD, M.C; BURNS, L.H; ROBBINS, T.W; EVERITT, B.J. **Dissociation in effects of lesions of nucleus accumbens core and shell in appetitive Pavlovian approach behavior and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by D-amphetamine.** *J Neurosci.* 19: 2401–2411, 1999a.

PARKINSON, J. A; ROBBINS, T.W; EVERITT, B.J. **Selective excitotoxic lesions of the nucleus accumbens core and shell differentially affect aversive Pavlovian conditioning to discrete and contextual cues.** *Psychobiology.* 27: 256–66, 1999b.

PARKINSON, J.A; WILLOUGHBY, P.J; ROBBINS, T.W; EVERITT, B.J **Disconnection of the anterior cingulate cortex and nucleus accumbens core impairs Pavlovian approach behavior: further evidence for limbic cortical-ventral striatopallidal systems.** Behav Neurosci. 114: 42– 63, 2000.

PATRICK L. **Eating disorders:** a review of the literature with emphasis on medical complications and clinical nutrition. Altern Med Rev. 7: 184-202, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, 4a ed., Academic Press, 1998.

PAXINOS, G; WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, Academic Press, 2006.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E. & BRILEY, M. **Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.** Neurosci. Meth. 14: 149-167, 1985.

PEZZE, A.; FELDON, J. **Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning.** Prog Neurobiol. 74: 310-320, 2004.

PINEL, J.P.J; MANA, M.J. **Adaptive interactions of rats with dangerous inanimate objects:** Support for a cognitive theory of defensive behavior. In: Blanchard RJ, Brain PF, Blanchard DC, Parmigiani S, editors. *Ethoexperimental Approaches to the Study of Behavior*. Dordrecht: Kluwer Academic Publications. 137–150, 1993.

PONTIERI, F.E; TANDA, G; DI CHIARA, G. **Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the “shell” as compared with the “core” of the rat nucleus accumbens.** Proc Natl Acad Sci USA. 92: 12304 –12308, 1995.

PUBMED - **www.entrezpubmed.com** – pesquisa - palavra chave “*plus maze*”. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entr> >. Acesso em 28 Fevereiro de 2008.

PULVIRENTI, L; BERRIER, R; KREIFELDT, M; KOOB, GF. **Modulation of locomotor activity by NMDA receptors in the nucleus accumbens core and shell regions of the rat.** Brain Res. 664: 231-236, 1994.

RAGNAUTH, A; MOROZ, M; BODNAR, R.J. **Multiple opioid receptors mediate feeding elicited by mu and delta opioid receptor subtype agonists in the nucleus accumbens shell in rats.** Brain Res. 876: 76-87, 2000.

RAMNANI, N.; LEE, L.; MECHELLI, A.; PHILLIPS,C.; ROEBROECK, A.; FORMISIANO, E. **Exploring brain connectivity: a new frontier in systems neuroscience.** Trends Neurosci. 25: 496-497, 2002.

REYNOLDS, S.M; BERRIDGE, K.C. **Fear and feeding in the nucleus accumbens shell:** rostrocaudal segregation of GABA-elicited defensive behavior versus eating behavior. J Neurosci. 21(9): 3261-70, 2001.

REYNOLDS, S.M.; BERRIDGE, K.C. **Glutamate motivational ensembles in nucleus accumbens: rostral caudal shell gradients of fear and feeding.** Eur J Neurosci. 17: 2187-2200, 2003.

RIBAS, G.C. **Neuroanatomical basis of behavior: history and recent contributions.** Rev Bras Psiquiatr. 29 (1); 63-71, 2007.

RICARDO, J.A.; KOH, E. T. **Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat.** Brain Res. 153(1): 1-26, 1978.

ROBERTS, D. R. **Functional organization of the limbic systems.** J. Neuropsychiatry. 2: 279-292, 1966.

RODGERS, R.J; JOHNSON, N.J.T; COLE, J.C; DEWAR, C.V; KIDD, G.R; KIMPSON, P.H. **Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade.** Pharmacol Biochem Behav. 54:41-50, 1996.

ROSA, V.P; VANDRESEN, N; CALIXTO, A.V; KOVALESKI, D.F; FARIA, M.S. **Temporal analysis of the rat's behaviour in the plus-maze: Effect of midazolam.** Pharmacol Biochem Behav. 67: 177-182, 2000.

RUMPEL, S.; LEDOUX, J.; ZADOR, A.; MALINOW, R. **Postsynaptic Receptor Trafficking Underlying a Form of Associative Learning.** Science. 308 (5718): 83-88, 2005.

SALAMONE, J.D. **The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation.** Behav Brain Res. 61: 117-133, 1994.

SALAMONE, J.D; COUSINS, M.S; SNYDER, B.J. **Behavioral functions of nucleus accumbens dopamine: empirical and conceptual problems with the anhedonia hypothesis.** Neurosci Biobehav Rev. 21: 341-359, 1997.

SALAMONE, J.D.; CORREA, M.; MINGOTE, S.; WEBER, S.M. **Nucleus accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 305, 1-8, 2003.

SAPER, C.B. **Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat.** J Comp Neurol. 210: 163-73, 1982.

SARGOLINI, F; ROULLET, P; OLIVERIO, A; MELE, A. **Effects of intra-accumbens focal administrations of glutamate antagonists on object recognition memory in mice.** Behav Brain Res. 138: 153-163, 2003.

SETEM, J; PINHEIRO, AP; MOTTA, VA; MORATO, S; CRUZ APM. **Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze.** Pharmacol Biochem Behav. 62: 515-521, 1999.

SHAPIRA, NA; OKUN, MS; WINT, D; FOOTE, KD; BYARS, JA; BOWERS, D; SPRINGER, US; LANG, PJ; GREENBERG, BD; HABER, SN; GOODMAN, WK. **Panic and fear induced by deep brain stimulation.** J Neurol Neurosurg Psychiatry. 77: 410-412, 2006.

SHINONAGA, Y.; TAKADA, M.; MIZUNO, N. **Topographic organization of collateral projections from the basolateral amygdaloid nucleus to both the prefrontal cortex and the nucleus accumbens in the rat.** Neuroscience. 58:389-397, 1994.

SIEGFRIED, Z.; BERRY, E.M.; HAO, S.; AVRAHAM, Y. **Animal models in the investigation of anorexia.** Physiol Behav. 79: 39-45, 2003.

SIMONDS, VM; WHIFFEN, VE. **Are gender differences in depression explained by gender differences in co-morbid anxiety?** J Affective Dis. 77: 197-202, 2003.

SMITH-ROSE, S.L.; KELLEY, A.E. **Coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the nucleus accumbens core is required for appetitive instrumental learning.** J Neurosci. 20: 7737-7742, 2000.

STANLEY, B.G.; HA, L.K.; SPEARS, L.C.; DEE, M.G. **Lateral hypothalamic injections of glutamate, kainic acid, D, L-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole propionic acid or N-methyl-D-aspartic acid rapidly elicit intense transient eating in rats.** Brain Res. 613: 88-95, 1993.

STANLEY, B.G.; WILLET III, V.L.; DONIAS, H.W.; HA, L.H.; SPEARS, L.C. **The lateral hypothalamus: a primary site mediating excitatory aminoacid-elicited eating.** Brain Res. 630: 41-49, 1993.

STANLEY, B.G.; WILLET, V.L.; DONIAS, H.W.; DEE, M.G.; DUVA, M.A. **Lateral hypothalamic NMDA receptors and glutamate as physiological mediators of eating and weight control.** Am. J. Physiol. 270: R443-R449, 1996.

STRATFORD, T.R.; KELLEY, A.E. **GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior.** J Neurosci. 17: 4434-40, 1997.

STRATFORD, T.R.; SWANSON, C.J.; KELLEY, A. **Specific changes in food intake elicited by blockade or activation of glutamate receptors in the nucleus accumbens shell.** Behav Brain Res. 93: 43-50, 1998.

STRATFORD, T. R. **Activation of feeding-related neural circuitry after unilateral injections of muscimol into the nucleus accumbens shell.** Brain Res. 1048: 241-250, 2005.

STURM, V; LENARTZ, D; KOULOUSAKIS, A; TREUER, H; HERHOLZ, K; KLEIN, JC; KLOSTERKOTTER, J. **The nucleus accumbens: a target for deep**

brain stimulation in obsessive-compulsive- and anxiety-disorders. *J Chem Neuroanat.* 26: 293-299, 2003.

SUN, N. & CASSELL, M.D. **Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala.** *J. Comp. Neurol.* 330: 381-404, 1993.

TANDA, G.L; DI CHIARA, G. **A dopamine-mu(1) opioid link in the rat ventral tegmentum shared by palatable food (Fonzies) and nonpsychostimulant drugs of abuse.** *Eur J Neurosci.* 10: 1179 –1187, 1998.

TANDA, G; PONTIERI, F.E; DI CHIARA, G. **Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu 1 opioid receptor mechanism.** *Science.* 276: 2048 –2050, 1997.

TREIT, D.; MENARD, J.; & ROYAN, C. **Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 44:463–469, 1993.

USIELLO, A; SARGOLINI, F; ROULLET, P; AMASSARI-TEULE, M; PASSINO, E; OLIVERIO, A; MELE, A. **N-Methyl-D-aspartate receptors in the nucleus accumbens are involved in detection of spatial novelty in mice.** *Psychopharmacology.* 137: 175- 183, 1998.

USUDA, I; TANAKA, K; CHIBA, T. **Efferent projections of the nucleus accumbens in the rat with special reference to subdivision of the nucleus: biotinylated dextran amine study.** *Brain Res.* 797(1):73-93, 1998.

VAN BOCKSTAELE, E. J. & PICKEL, V. M. **GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain.** *Brain Res.* 682: 215-221, 1995.

VAN DER POEL, A.M. **A note on “stretched attention,” a behavioural element indicative of an approach–avoidance conflict in rats.** *Anim Behav.* 27: 446–450, 1979.

VEENMAN, C. L; WILD J. M; REINER, A. **Organization of the avian “cortico-striatal” projection system, a retrograde and anterograde pathway tracing study in pigeons.** *J Comp Neurol.* 354: 87-126, 1995.

WALL, P. M; MESSIER, C. **Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze.** *Behavioral Brain Research.* 114: 199-212, 2000.

WEINER, I; GAL, G; RAWLINS, J.N.P; FELDON, J. **Differential involvement of the shell and core subterritories of the nucleus accumbens in latent inhibition and amphetamine induced activity.** *Behav Brain Res.* 81: 123–33, 1996.

WIRTSHAFTER, D.; KREBS, J.C. **Control of food intake by kainate/quisqualate receptors in the median raphe nucleus.** *Psychopharmacology.* 101: 137-141, 1990.

WOOD, DA; BUSE, JE; WELLMAN, C L; REBEC, GV. **Differential environmental exposure alters NMDA but not AMPA receptor subunit expression in nucleus accumbens core and shell.** Brain Research. 176 - 183, 2005.

WRIGHT, C.L.; BEIJER, A.V.; GROENEWEGEN, H.J. **Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized.** J Neurosci. 16 (5): 1877-93, 1996.

ZAHM, D.S; HEIMER, L. **Two transpallidal pathways originating in the rat nucleus accumbens.** J Comp Neurol. 302: 437– 446, 1990.

ZAHM, D. S; BROG, J.S. **On the significance of subterritories in the 'accumbens' part of the rat ventral striatum.** Neurosci. 50: 751-767, 1992.

ZAVITSANOU, K; MITSACOS, A; GIOPRES, P; KOUVELAS, ED. **Changes in [3H]AMPA and [3H]kainate binding in rat caudate-putamen and nucleus accumbens after 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle: an autoradiographic study.** Brain Res. 731:132-140, 1996.

ZHOU, Q; XIAO, M; NICOLL, R.A. **Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98: 1261– 1266, 2001.

## **8 ANEXOS:**

### **Artigos**

Research report

# The microinjection of AMPA receptor antagonist into the accumbens shell, but not into the accumbens core, induces anxiolysis in an animal model of anxiety

Isabel Cristina da Cunha<sup>a,c</sup>, Ana Paula Fraga Lopes<sup>a</sup>, Sergio Murilo Steffens<sup>a</sup>, Adriana Ferraz<sup>a</sup>, Juliano Cordova Vargas<sup>a</sup>, Thereza Christina Monteiro de Lima<sup>b</sup>, José Marino Neto<sup>a</sup>, Marta Aparecida Paschoalini<sup>a</sup>, Moacir Serralvo Faria<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiological Sciences, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), 88.040-900 Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), 88.040-900 Florianópolis, SC, Brazil

<sup>c</sup> Centre of Biological Sciences and Health, University of the South of Santa Catarina (UNISUL), 88.132-000 Palhoça, SC, Brazil

Received 15 August 2007; received in revised form 22 October 2007; accepted 25 October 2007

Available online 1 November 2007

## Abstract

This study investigated the effect of the AMPA receptor antagonist 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) microinjected into the core and shell sub-regions of the accumbens nucleus (Acb), on the level of fear/anxiety and emotional learning, in female rats submitted to the elevated plus-maze (EPM), an animal model of anxiety. Bilateral microinjections of DNQX (330 and 660 ng) into the Acb shell (AP, +1.08 to +2.16) induced an anxiolytic-like effect in relation to rats microinjected with vehicle, since there was an increased percentage of entries in the open arms of the maze. The 660 ng DNQX microinjection into the Acb shell also increased the percentage of entries into the open arms in relation to 660 ng DNQX microinjection into the Acb core. Prior DNQX microinjections in both core and shell sub-regions of the Acb failed to impair the emotional learning, since the animals exhibited an increase of the open arm avoidance on EPM Trial 2 in relation to EPM trial 1. DNQX microinjections into both sub-regions of the Acb did not change the number of entries into the enclosed arms, either in the EPM Trial 1 or in the EPM Trial 2, which indicates an absence of drug-induced locomotor impairment. Similarly, DNQX microinjections into both sub-regions of the Acb failed to alter the total arm entries, rearing, grooming and head-dipping frequency. The anxiolytic-like effect induced by DNQX suggests that the AMPA receptor in the Acb shell, but not in the Acb core, may underlie anxiety regulation in the EPM.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Accumbens; Anxiety; Fear; Elevated plus-maze; AMPA; Glutamate; Rat

## 1. Introduction

The nucleus accumbens (Acb) is an important area of the basal forebrain involved in several behavioural processes such as motor activity [14,25], motivation and reward [41,68], cognitive functions [3,18,72,75,82], sexual behaviour [17], stress [1] and appetitive and aversive related functions [60] as well.

The Acb may be also important to elicit appropriate emotional behaviour [29,49], since glutamatergic projections emerging from the medial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and

hippocampal formation, important regions for emotional processing and behavioural regulation [51], converge on spiny neurons of the Acb [31]. In fact, it has been shown that the Acb is involved with defensive behavioural responses elicited by noxious or threatening stimuli [7,8,27,36,43,69]. Regarding fear/anxiety-related behaviours, it has been shown that dopaminergic projection from the ventral tegmental area to the Acb may be related to different aspects of fear conditioning [58]. The over expression of the inducible cAMP early repressor (ICER) into the Acb, an important mechanism for cAMP response element-mediated transcription modulation, increases anxiety measures in rats [28].

However, the Acb is an anatomically heterogeneous structure divided in two sub-regions: the core and the shell. The core

\* Corresponding author. Fax: +55 48 3721 9672.

E-mail address: [serralvo@ccb.ufsc.br](mailto:serralvo@ccb.ufsc.br) (M.S. Faria).

and the shell subregions, in turn, are characterized by distinct connective, neurochemical [32,86] and regulatory properties. The Acb core regulates, preferentially, motor functions whereas the Acb shell regulates, preferentially, limbic functions [86]. In fact, it has been shown that the Acb shell, but not the Acb core, exhibits a gradient of aversive motivation when followed by the microinjection of AMPA glutamate receptor antagonist [64].

Concerning animal models of anxiety, the literature does not provide consistent data about the role of the Acb on anxiety regulation, especially regarding the core and shell sub-regions. For example, in spite of having been shown that the microinjection of glutamate receptor antagonists into the Acb induces anxiolysis in rats, a distinction between the core and shell sub-regions was not carried out [48]. On the other hand, the microinjection of the AMPA glutamate receptor antagonist into the Acb core, and especially into the Acb shell, was able to induce some fearful behaviours such as burying or treading defensive behaviour, as well as defensive bites, distress calls, and escape dashes in rats [64]. Thus, the literature data are inconclusive regarding an anxiolytic or anxiogenic action for the glutamate neurotransmission within the Acb. This indicates that the role of glutamate in the Acb on fear/anxiety deserves further investigation. More specifically, an investigation that tries to establish a comparison between the core and shell sub-regions in animal models of anxiety. Since the Acb is an important region for neural plasticity processes that underlie emotional learning [58], it would be also important to evaluate the role of the Acb core and the Acb shell on fear/anxiety acquisition in animal models of anxiety.

Therefore, the present study aimed at evaluating the effects of the AMPA receptor antagonist microinjections into the core and shell sub-regions of the Acb on the level of fear/anxiety of female rats tested in the elevated plus-maze (EPM) [30], an animal model of anxiety [33]. The Trial 1/Trial 2 EPM procedure was used in order to address the emotional learning in the EPM [12,16,22,23,26,42]. Female rats were chosen due to the fact that common mental disorders, such as anxiety, are more prevalent among women [2,6,37,77].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Adult female Wistar rats weighing approximately 200–250 g (2-month age) were supplied by the animal breeding division of the Federal University of Santa Catarina. The animals were housed in individual cages and submitted to a 7-day period of adaptation with free access to food and water under a light/dark cycle of 12 h (lights on at 6 a.m.). The animals were only handled for weighing, drug administration, and cage cleaning. All the experimental procedures were conducted in compliance with the recommendations of the Ethics Commission for the use of experimental animals of the Federal University of Santa Catarina, SC, Brazil.

### 2.2. Cannulae implantations

At least 7 days before the experiments, each animal was intraperitoneally anaesthetized with a ketamine hydrochloride (87 mg kg<sup>-1</sup>) and xylazine (13 mg kg<sup>-1</sup>) mixture, and bilateral stainless steel guide cannulae (30G) were implanted using stereotaxic techniques. The guiding cannulae were aimed at sites located 1 mm close to either the Acb core or the Acb shell according to the coordinates derived from Paxinos and Watson Atlas [56]. The cannulae

were anchored in the skull with jeweller screw, fixed with dental cement, and maintained patent by an inner removable stylet between the experiments.

### 2.3. Drug microinjections

Injections were made through inner cannulae (33 G) extending 1 mm beyond the ventral tip of the guiding cannulae connected by polyethylene tubing to a Hamilton microsyringe (1 µl) fitted to an injection pump. The injected volume (0.4 µl) was administered bilaterally over a period of 60 s and a further 60 s was allowed for the solution to diffuse from the cannulae. 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) was purchased from Tocris (USA) and freshly dissolved in 50% DMSO:50% isotonic saline solution before the experiments. The control group was microinjected with vehicle (50% DMSO:50% isotonic saline solution; vehicle group). Another group, microinjected with isotonic saline (0.9%; SAL group), was used to evaluate any influence of vehicle microinjection upon the animal behaviour in the EPM. The doses of DNQX were estimated according to the literature.

### 2.4. Elevated plus-maze (EPM) test

The elevated plus-maze was made of varnished wood and consisted of four arms of the same size (50 cm × 10 cm) arranged in the form of a cross; arms pointing towards the center (10 × 10 cm) and raised 50 cm above the floor. Two opposed arms were surrounded by a short (1 cm) Plexiglas edge (open arms) while the other two by 40 cm high opaque glass walls, except for the entrance (enclosed arms). Four 15 W fluorescent lights arranged as a cross 100 cm above the maze were used as source of illumination and provided different levels of lux incident on the open and enclosed arms. The mean illumination level in the open and enclosed arms was 373 and 284 lx, respectively, with an 89 lx gradient of illumination between the open and enclosed arms. Each animal was placed on the central square of the maze facing an enclosed arm and was allowed to explore the maze for 5 min (Trial 1). Twenty-four hours later, each animal was retested in the elevated plus-maze for another five minutes, with no drug microinjection (Trial 2). In order to avoid odoriferous cues between animals [85], the maze was cleaned with wet (alcohol 20%, v/v) and dry cloths. Any animal that fell off the maze was excluded from the experiment. All the experiments were carried out during the light phase of the cycle between 11 a.m. and 2 p.m. Each trial was recorded by a digital video camera in an adjacent room and, subsequently, transcribed through the Etholog 2.25 software [53].

The standard spatial-temporal variables, such as the number of entries into either the open or enclosed arms, as well as the total number of entries were recorded. Arm entry and arm exit were defined as all four paws into and out of an arm, respectively. The exploratory behaviour upon the open arms was expressed as the mean percentage of entries into the open arms (by taking into account the total number of entries into both the open and the enclosed arms; %open arm entries) and the time spent inside the open arms (by taking into account the 5 min duration of the test; %open arm time). Additionally, other ethologically derived measures were also evaluated (according to [73]) as following: (a) rearing (rising on the hind limbs); (b) head-dipping (protruding the head over the edge of an open arm and scrutinizing towards the floor); and (c) grooming (cleaning any part of the body surface with the tongue, teeth, and/or forepaws).

### 2.5. Procedure

Each animal received a bilateral microinjection of saline, vehicle, 330 or 660 ng DNQX into the core and shell sub-regions of the Acb, as described in Section 2.3. Following the drug administrations, each animal was submitted to Trial 1/Trial 2 EPM procedure, as described in Section 2.4.

### 2.6. Histological analysis

At the end of the experiments, the animals were deeply anaesthetized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 0.9% saline followed by 10% formalin. The brains were removed and subsequently cut (vibratome) in the transverse plane (100 µm). Sections were stained with cresyl violet and the cannulae loci were examined and documented through a camera lucida attached to a light microscope. Cannulae placements were mapped onto the

corresponding atlas drawings of Paxinos and Watson [56]. Data from rats with misplaced cannulae in the Acb core and Acb shell were not included in the analyses.

### 2.7. Statistical analysis

The data were analysed by three-way analysis of variance (ANOVA) with “Drug Treatment” as factor 1, “Microinjection Site” as factor 2, and “EPM Trial” as factor 3. When appropriate, ANOVA was followed by Duncan’s test for multiple comparisons. Only probability values less than 5% were considered significant.

## 3. Results

The histological analysis indicated that the 34 injection cannulae tips reached the medial region of the Acb shell, while 26 injection cannulae tips reached the Acb core (AP varying between +1.08 and +2.16; Fig. 1). Table 1 presents the results of the three-way ANOVA from rats submitted to the EPM immediately after saline, vehicle and DNQX microinjections into the core and shell sub-regions of the accumbens nucleus. ANOVA revealed a significant main effect for %open arm entries in rela-

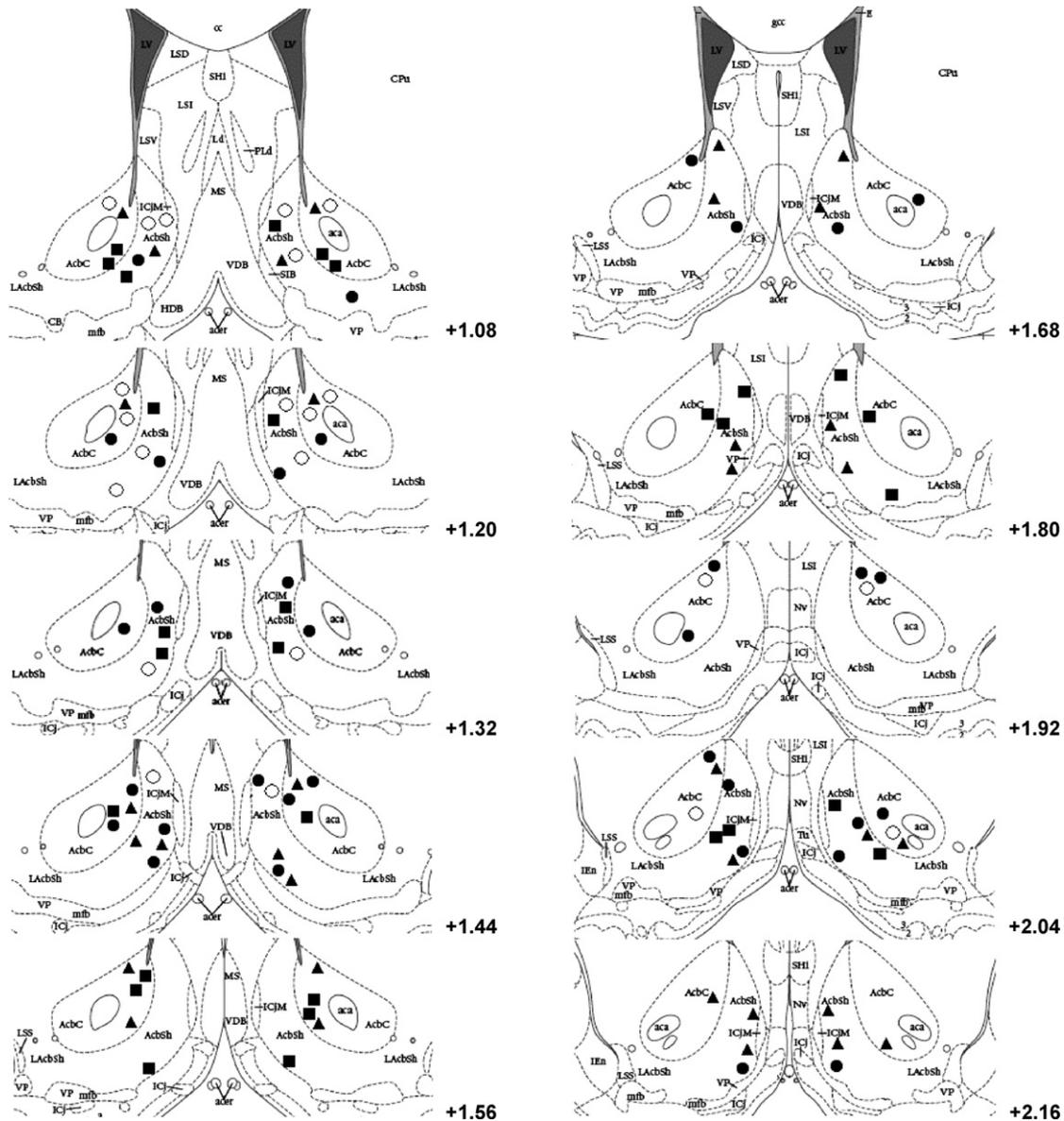


Fig. 1. Semi-schematic drawings of coronal sections (100  $\mu$ m) of the rat brain, according to Paxinos and Watson Atlas [56], illustrating the distribution of the accumbens core and accumbens shell sites in which saline (SAL), vehicle and DNQX were microinjected. DNQX was microinjected at the doses of 330 and 660 ng/side: (○) SAL, (●) vehicle; (▲) DNQX 330; (■) DNQX 660. 2: layer 2 of cortex; 3: layer 3 of cortex; AcbC: accumbens nucleus, core; AcbSh: accumbens nucleus, shell; aca: anterior commissure, anterior part; acer: anterior cerebral artery; cc: corpus callosum; CB: cell bridges of the ventral striatum; CPu: caudate putamen (striatum); E: ependyma and subependymal layer; gcc: genu of the corpus callosum; ICj: islands of Calleja; ICjM: islands of Calleja, major island; IEn: intermediate endopiriform nucleus; HDB: nucleus of the horizontal limb of the diagonal band; LAcbSh: lateral accumbens shell; lofr: lateral orbitofrontal artery; LSD: lateral septal nucleus, dorsal part; LSI: lateral septal nucleus, intermediate part; LSS: lateral stripe of the striatum; LSV: lateral septal nucleus, ventral part; LV: lateral ventricle; mfb: medial forebrain bundle; MS: medial septal nucleus; PlD: paralambdoid septal nucleus; Ld: lambdoid septal zone; Shi: septo hippocampal nucleus; SIB: Substantia innominata, basal part; Tu: olfactory tubercle; VDB: nucleus of the vertical limb of the diagonal band; VP: ventral pallidum.

Table 1  
Three-way ANOVA results indicating the main effects and between factor interactions

Factors/interactions	d.f.	%Open entries	%Open time	Open entries	Enclosed entries	Total entries	Head dipping	Rearing	Grooming
Drug	3,104	3.53; $p < 0.05$	2.49; NS	2.64; NS	0.45; NS	1.43; NS	1.31; NS	0.22; NS	2.03; NS
Site	1,104	6.04; $p < 0.05$	3.55; NS	2.60; NS	0.038; NS	0.81; NS	3.20; NS	1.43; NS	1.99; NS
Trial	1,104	74.82; $p < 0.05$	84.33; $p < 0.05$	45.34; $p < 0.05$	7.25; $p < 0.05$	24.25; $p < 0.05$	91.78; $p < 0.05$	14.20; $p < 0.05$	0.63; NS
Drug $\times$ site	3,104	2.16; NS	1.94; NS	1.33; NS	0.16; NS	0.22; NS	1.35; NS	0.32; NS	0.14; NS
Drug $\times$ trial	3,104	1.05; NS	0.73; NS	0.64; NS	0.14; NS	0.22; NS	0.32; NS	0.10; NS	0.24; NS
Site $\times$ trial	1,104	2.70; NS	1.22; NS	0.93; NS	1.12; NS	0.033; NS	1.39; NS	0.40; NS	2.06; NS
Drug $\times$ site $\times$ trial	3,104	0.82; NS	1.95; NS	0.57; NS	0.95; NS	0.57; NS	1.19; NS	0.76; NS	0.30; NS

Rats were bilaterally microinjected with saline, vehicle or DNQX (330 and 660 ng/site) into the core and shell sub-regions of the accumbens nucleus and were submitted to Trial 1/Trial 2 elevated plus-maze procedure. NS indicates not significant.

tion to the “Drug” factor. There was also a significant main effect for %open arm entries in relation to the “Microinjection Site”. ANOVA revealed a significant main effect for the %open arm entries, %open arm time, Open entries, enclosed entries, total entries, head-dipping, and rearing variables in relation to the “EPM Trial” factor. There were no significant between factor interactions for any behavioural variable (Table 1).

The data showed that the rats microinjected with 330 or 660 ng DNQX into the Acb shell, but not in the Acb core, exhibited increased %open arm entries in Trial 1, in relation to the rats receiving vehicle microinjection (Duncan’s test; Fig. 2). In addition, the microinjection of 660 ng DNQX into the Acb shell increased the %open arm entries in Trial 1 in relation to respective group microinjected into the Acb core (Fig. 2).

During Trial 1, rats microinjected with 330 or 660 ng DNQX into the Acb shell, as well as into the Acb core, displayed the same %open arm time, number of entries into the open and enclosed arms, as well as total number of arm entries in relation to the group microinjected with vehicle (Fig. 3). Also, animals microinjected with 330 or 660 ng DNQX into the Acb shell exhibited the same number of entries into the open and enclosed, as well as the total number of arm entries in relation to respective group which underwent Acb core microinjection. Duncan’s test did not indicate any difference between the groups during EPM Trial 2 (Fig. 3). There was no difference between the groups microinjected with saline and vehicle in any behavioural variable.

Regarding the comparisons between EPM trials, all the experimental groups exhibited increased open arm avoidance in Trial 2 in relation to Trial 1, which was characterized by low %open arm entries and/or low %open arm time (Fig. 2). The number of entries into the open arm also decreased in Trial 2 in the groups microinjected with 330 ng DNQX into the Acb core and the Acb shell and in the groups microinjected with 660 ng DNQX and saline into the Acb shell (Fig. 3, right upper panel). Duncan’s test failed to reveal any difference in the number of entries into the enclosed arm between EPM Trial 1 and EPM Trial 2 (Fig. 3, right middle panel). The animals microinjected with 330 ng DNQX into the Acb core, and those microinjected with saline into the Acb shell, exhibited decreased total number of entries in Trial 2, in relation to Trial 1 (Fig. 3, right bottom panel).

The rearing, grooming, and head-dipping frequency in Trial 1 and Trial 2 was not altered by any treatment, either in the core or in the shell sub-regions of the Acb (Table 2). The rearing frequency decreased in Trial 2 only in the group microinjected

with vehicle into the Acb core, when compared to Trial 1. In all experimental groups, the head-dipping frequency was decreased in Trial 2 in relation to Trial 1, except in the group microinjected with 660 ng DNQX into the Acb core, which exhibited the same head-dipping frequency displayed in Trial 1 (Table 2). There were no significant within and between group differences in relation to the grooming frequency (Table 2).

#### 4. Discussion

In the EPM, the animal fear/anxiety level is evaluated by taking into account the open arm exploration (%open arm entries and %open arm time). When DNQX, a glutamate AMPA receptor antagonist, was microinjected into the Acb shell, the animals exhibited decreased open arm avoidance, characterized by higher exploration towards to the open arms of the maze in Trial 1 (increased %open arm entries). In addition, rats receiving DNQX into the Acb shell also displayed increased open arm exploration in relation to rats treated with Acb core DNQX microinjection. Taken together, the present study showed that the microinjection of DNQX into the Acb shell induced an anxiolytic-like effect in female rats tested in the EPM. Also, the anxiolytic-like effect induced by DNQX microinjection is selective to Acb shell, since the Acb core DNQX microinjection failed to change the arm preference of the animals. That is to say, the animals exhibited the same level of open arm avoidance in relation to the group microinjected with vehicle. Also, vehicle microinjection into both core and shell sub-regions of the Acb did not change the animal behaviour in the EPM in relation to the group microinjected with saline. Thus, the present study addresses a putative role of AMPA receptors in Acb shell for anxiety modulation in female rats.

This assumption corroborates a prior study showing that the NBQX microinjection into the Acb, another AMPA receptor antagonist, significantly decreased the open arm avoidance in male rats tested in the EPM [48]. However, a distinction between the core and shell sub-regions was not carried out in this study. Thus, the present study showed, for the first time, a differential involvement of sub-regions of the Acb on anxiety modulation in female rats.

In spite of an evaluation of the animals estrous cycle has not been carried out in the present study, the increased %open arm entries induced by Acb shell DNQX microinjection can not be ascribed to influence of the hormonal levels along the different phases of the ovarian cycle. Firstly, some previous studies have

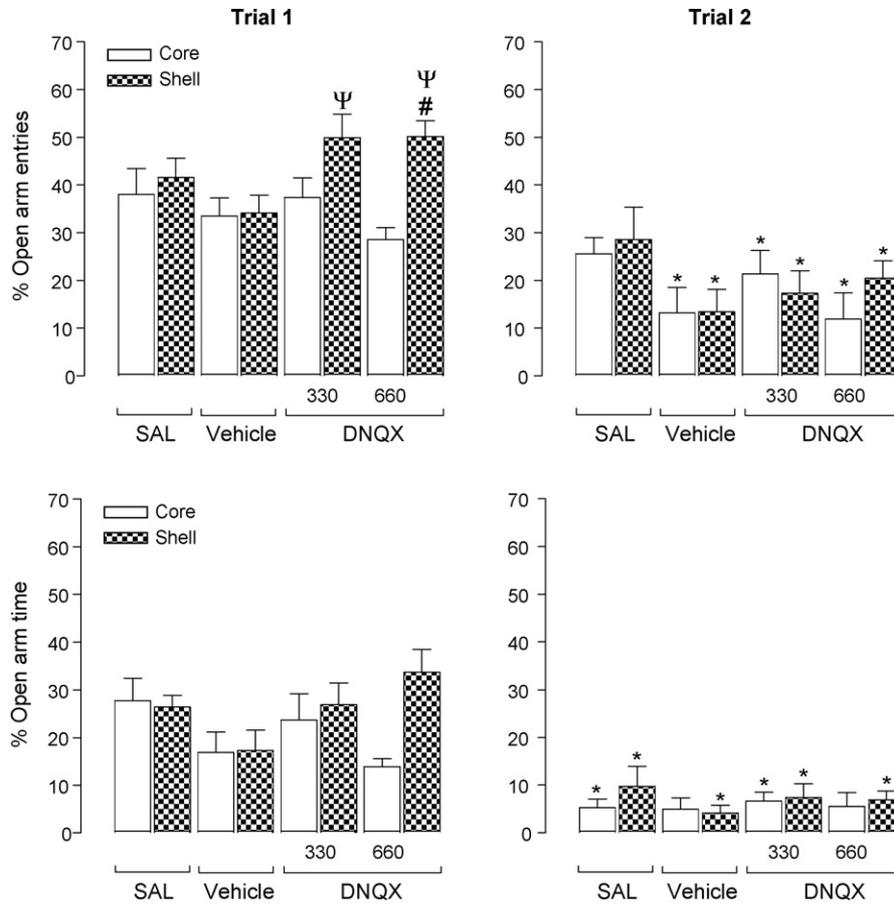


Fig. 2. Anxiolytic-like effect induced by AMPA antagonist microinjections into the accumbens shell. Rats were bilaterally microinjected with saline, vehicle or DNQX (330 and 660 ng/side) into the core and shell sub-regions of the accumbens nucleus and tested twice in the elevated plus-maze. Trial 1 is depicted on the left while Trial 2 is depicted on the right. Data are represented as the mean ± S.E.M. \**p* < 0.05 in relation to respective trial 1; Ψ *p* < 0.05 in relation to the group microinjected with vehicle; # *p* < 0.05 in relation to respective group submitted to Acb core microinjection (three-way ANOVA followed by Duncan’s test for multiple comparisons).

demonstrated that the %open arm entries is not altered by any phase of the estrous cycle [9,47,52]. Secondly, it has been shown that the %open arm entries remains the same irrespective of the estrous cycle phase when animals are tested under high level (200 lx) of illumination [50]. In the present study, the animals were also tested under a high level of EPM illumination (373 and 284 lx in the open and enclosed arms, respectively). Thus, the data suggest that the increased %open arm entries induced by

Acb shell DNQX microinjection may not be ascribed to ovarian hormone fluctuations underlying the estrous cycle, but to AMPA receptors blockade into the Acb shell.

The present study showed that the AMPA receptor blockade in the Acb shell was able to reduce fear-motivated behaviours such as open arm avoidance in the EPM. However, it has also been shown that the microinjections of AMPA antagonist microinjection into the Acb shell elicited defensive burying (a

Table 2

Some ethological variables exhibited by rats in the elevated plus-maze: the animals received bilateral microinjections of saline, vehicle or DNQX into the core and shell sub-regions of the accumbens nucleus before maze exposure

Behaviour	Trial	Saline		Vehicle		DNQX 330		DNQX 660	
		Core (5)	Shell (6)	Core (8)	Shell (9)	Core (6)	Shell (9)	Core (7)	Shell (10)
Rearing	1	13.8 ± 3.4	13.6 ± 1.5	15.5 ± 2.2	12.0 ± 2.7	15.0 ± 1.8	12.2 ± 2.2	13.2 ± 2.1	10.9 ± 1.6
	2	10.8 ± 4.5	8.0 ± 3.0	6.6 ± 2.2*	10.2 ± 1.6	10.6 ± 2.8	7.5 ± 1.9	8.7 ± 2.0	8.4 ± 1.0
Grooming	1	1.2 ± 0.2	1.8 ± 0.6	1.6 ± 0.6	2.0 ± 0.6	1.1 ± 0.2	2.2 ± 0.4	0.8 ± 0.2	1.3 ± 0.3
	2	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.6	1.6 ± 0.4	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.2
Head-dipping	1	9.8 ± 3.9	9.0 ± 1.7	5.7 ± 1.5	7.3 ± 1.5	7.6 ± 1.3	8.7 ± 1.5	5.1 ± 1.1	11.7 ± 1.9
	2	1.6 ± 0.2*	2.5 ± 1.0*	0.8 ± 0.5*	0.8 ± 0.3*	1.0 ± 0.5*	1.1 ± 0.6*	1.0 ± 0.6	1.7 ± 0.5*

The data are expressed as the mean ± standard error. Numerals between parentheses indicate the number of animals per group. Rats were microinjected with saline, vehicle or DNQX (330 and 660 ng/side) into the core and shell sub-regions of the accumbens and were submitted to Trial 1/Trial 2 elevated plus-maze procedure. \**p* < 0.05 in relation to respective Trial 1 (three-way ANOVA followed by Duncan’s test for multiple comparisons).

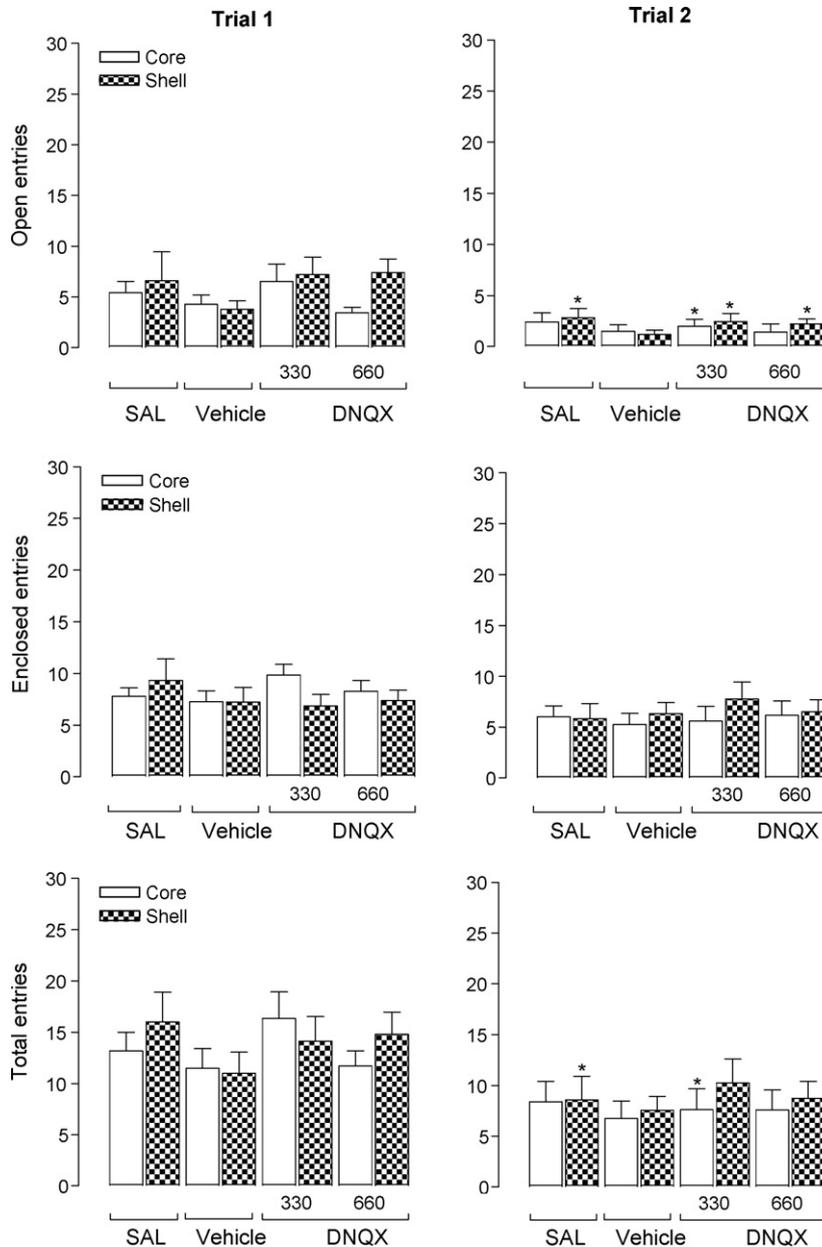


Fig. 3. Number of entries into the open and enclosed arms, as well as the total number of arm entries in rats microinjected with AMPA receptor antagonist into the core and shell sub-regions of the accumbens nucleus. Rats were bilaterally microinjected with saline, vehicle or DNQX (330 and 660 ng/side) into the Acb core and the Acb shell and tested twice in the elevated plus-maze. Trial 1 is depicted on the left while Trial 2 is depicted on the right. Data are represented as the mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  in relation to respective Trial 1 (three-way ANOVA followed by Duncan's test for multiple comparisons).

fear-motivated behaviour) in both male and female rats [64]. It is difficult to explain the contrasting effect of the Acb shell AMPA antagonist microinjection upon the animal emotionality (anxiolysis in the present study and anxiogenesis in the Reynolds's study [64]). Regarding human studies, the same dichotomy is exhibited. Deep brain stimulation of the Acb shell reduced the severity symptoms in patients with obsessive-compulsive and anxiety-disorder [80] whereas the same procedure carried out at the anterior limb of the internal capsule and at the Acb region elicited panic in an old man with refractory obsessive-compulsive disorder [76]. Thus, both basic and clinical research results are contradictory in the literature and the role of the glutamate neurotransmission into the Acb shell, as

well as the whole Acb, on fear/anxiety modulation remains open for further investigation.

In the literature, it has been proposed a beneficial relationship between anxiety and feeding behaviour in the Acb. For example, it may be advantageous for the animal to engage in feeding behaviour under a wide range of environmental situations, such as novelty or unfamiliar cues and still be able to replace feeding by defensive behaviour in the face of imminent threat detection [39]. This assumption has been supported by studies which demonstrated that functional inhibition of the Acb shell by GABA<sub>B</sub> or GABA<sub>A</sub> receptor activation induces hyperphagia [44,78] and anxiolysis in free-feeding rats [44]. Even though the present study has not carried out an evaluation of the

animal feeding behaviour, by showing that the AMPA receptor blockade in the Acb shell suppressed the animal fear, allied to other studies which had showed the hyperphagic effect of the AMPA blockade in the Acb shell [40,79], the present study suggests that, similar to GABA neurotransmission, the AMPA receptor blockade into the Acb shell may also increase feeding and decrease the occurrence of defensive behaviour. Thus, the animal motivation for feeding and defence could emerge from GABA and glutamate modulation upon the Acb shell output.

Regarding locomotion, it has been well accepted that the Acb core is involved, preferentially, in regulating motor functions whereas the Acb shell is involved, preferentially, in regulating limbic functions [86], even though the literature data are contradictory. While some data have shown that the Acb core underlie locomotion in different task [45,46,61] and mediates the effects of psychostimulants on locomotor activity [10,54], electrolytic and excitotoxic lesions to the Acb core have failed to change the locomotor activity [55,83]. On the other hand, studies which covered both excitotoxic and electrolytic lesions to the Acb shell have shown either no effect [55,63] or increased locomotor activity [38,62,83].

In the present study, the number of entries into the enclosed arms, a reliable index of the animal motor activity in the EPM [21], and rearing were not altered by the AMPA receptor antagonist microinjection into both the core and shell sub-regions of the Acb. In addition, the total arm entries, another variable that roughly represents locomotor activity, also remained unchanged during Trial 1 after the core and shell DNQX microinjection. These data of the present study are in accordance with prior data of the literature, which showed that neither the number of entries into the enclosed arms nor the number of rearing was affected by the AMPA receptor antagonist microinjection into the Acb [48]. Thus, in the present study, it is possible to exclude some bias of the locomotion on the anxiolytic-like effect induced by the AMPA receptor blockade in the Acb shell. Recently, a study which has used electrolytic lesion of the Acb showed that rats with lesion in the Acb shell, but not in the Acb core, exhibited reduced locomotion and unchanged emotionality in the EPM [35]. These contradictory results may be explained by different methodological procedures, such as the interval of time between surgery and test (7 months in the Horsley's study [35] and around 7 days in the present study). In addition, it is important to keep in mind that lesion treatments are not necessarily functionally equivalent to pharmacological treatment due to the damage of fibres passing through.

It has been proposed that the Acb is important for spatial learning and memory due to its connections with cortical and hippocampal regions [71,74,75,81]. Several studies have provided evidences that the Acb manipulations may impair spatial learning [3,24,46,67,70]. Recently, it was demonstrated that both the NMDA and the AMPA receptor activation were important for short-term spatial learning in the Morris water maze task [20]. Regarding emotional learning in the EPM, it has been proposed that as the animal engage EPM exploration, it would be able to encode information about the maze (i.e. its position within the maze, arms previously visited, location of areas with more or less aversive properties, and so on), by using different sen-

sory systems, such as vibrissal and visual sense [57], in such a way that this information would be integrated in its central nervous system to create a representative and reliable context of the experience. Thus, it is possible to assume that after some time, the animal ongoing behavior in a certain minute would be dependent on the experience obtained in the previous minute. In fact, when the exploratory behavior of rats and mice in the EPM is fractioned into 1-min blocks (temporal analysis), a noteworthy exploratory pattern emerges, with the animals exhibiting, at the end, increased open arm avoidance, in comparison with the beginning of the exposure [26,34,65,66]. Additionally, when the animal is re-exposed to the maze, it displays higher open arm avoidance in relation to the first exposure and this finding indicates that prior-experience significantly alters the subsequent EPM exploration, with the animals acquiring increased level of fear/anxiety during Trial 1, which could be reinstated during Trial 2 [22]. Since the open arm avoidance is motivated by the fear of open and/or illuminated spaces, it is possible to assume that rats and mice develop emotional learning during the EPM exposure. It has been shown that the increased anxiety exhibited by rats along EPM Trial 2 is dependent on the trial 1 length [16] and may be facilitated by increased blood glucose level induced by maze exploration, an effect that could be mediated by increased glucose gift for the central nervous system or due to central integration of sensory inputs traveling through the vagus nerve [26].

In the present study, the AMPA receptor antagonist microinjection into both the core and shell sub-regions of the Acb failed to prevent the occurrence of increased open arm avoidance along Trial 2 EPM. This indicates that the AMPA receptor activation into the Acb is not important for encoding the information underlying the emotional learning in the EPM, in contrast with the basolateral nucleus of the amygdala and the septo-hippocampal formation. In these two regions, either the reversible bilateral lesion with lidocaine [23] or the selective destruction of the cholinergic neurons of the medial septum that project to hippocampus with 192-IgG-saporin immunotoxin [42], impair and prevent the emotional learning in the EPM, respectively. However, it has been shown that the AMPA receptor activation into the Acb core may be important for the acquisition and expression of inhibitory avoidance [19], another fear-motivated task, just like the open arm avoidance in the EPM.

There are, yet, few studies in the literature that address the role of the Acb in animal models of anxiety, in spite of the several emerging evidences from the molecular biology [13,28] as well as from behavioural [58] and neuroanatomical studies [4,5,11,15,59,84] that support a potential role of the Acb on anxiety. Thus, in order to clarify the role of the Acb on emotionality, a more systematic evaluation of the glutamate neurotransmission within the Acb should be carried out, especially including other animal models of anxiety.

## Acknowledgment

We are grateful to Marimar da Silva for the revision of the manuscript.

## References

- [1] Abercrombie ED, Keefe KA, DiFrischia DS, Zigmond MJ. Differential effect of stress on *in vivo* dopamine release in striatum, nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *J Neurochem* 1989;52:1655–8.
- [2] Afifi M. Gender differences in mental health. *Singapore Med J* 2007;48:385–91.
- [3] Annett LM, McGregor A, Robbins TW. The effects of ibotenic acid lesions of the nucleus accumbens on spatial learning and extinction in the rat. *Behav Brain Res* 1989;31:231–42.
- [4] Aston-Jones G, Harris GC. Brain substrates for increased drug seeking during protracted withdrawal. *Neuropharmacology* 2004;47:167–79.
- [5] Bannerman DM, Rawlins JN, Mchug SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, et al. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28:273–83.
- [6] Bebbington PE. Sex and depression. *Psychol Med* 1998;28:1–8.
- [7] Beck CH, Fibiger HC. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene *c-fos*: with and without diazepam pretreatment. *J Neurosci* 1995;15:709–20.
- [8] Berridge CW, Mitton E, Clark W, Roth RH. Engagement in a non-escape (displacement) behavior elicits a selective and lateralized suppression of frontal cortical dopaminergic utilization in stress. *Synapse* 1999;32:187–97.
- [9] Bitran D, Hilvers RJ, Kellog CK. Ovarian endocrine status modulates the anxiolytic potency of diazepam and the efficacy of  $\gamma$ -aminobutyric acid-benzodiazepine receptor-mediated chloride ion transport. *Behav Neurosci* 1991;105:653–62.
- [10] Boye SM, Grant RJ, Clarke PB. Disruption of dopaminergic neurotransmission in nucleus accumbens core inhibits the locomotor stimulant effects of nicotine and D-amphetamine in rats. *Neuropharmacology* 2001;40:792–805.
- [11] Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the “accumbens” part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol* 1993;338:255–78.
- [12] Calzavara MB, Patti CL, Lopez GB, Abílio VC, Silva RH, Frussa-Filho R. Role of learning of open arm avoidance in the phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in mice. *Life Sci* 2005;76:2235–46.
- [13] Carlezon WA Jr, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 2005;28:436–45.
- [14] Carlsson M, Carlsson A. Schizophrenia: a subcortical neurotransmitter imbalance syndrome? *Schizophr Bull* 1990;16:425–32.
- [15] Charney DS. Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. *Acta Psychiatr Scand* 2003;417:38–50.
- [16] Dal-Col MLC, Pereira LO, Rosa VP, Calixto AV, Carobrez AP, Faria MS. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;74:395–400.
- [17] Damsma G, Pfaus JG, Wenkstern D, Phillips AG, Fibiger HC. Sexual behavior increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. *Behav Neurosci* 1992;106:181–91.
- [18] Davidson RJ, Irwin W. The functional neuroanatomy of emotion and affective style. *Trends Cognit Sci* 1999;3:11–21.
- [19] De Leonibus E, Costantini VJA, Castellano C, Ferretti V, Oliverio A, Mele A. Distinct roles of the different ionotropic glutamate receptors within the nucleus accumbens in passive-avoidance learning and memory in mice. *Eur J Neurosci* 2003;18:2365–73.
- [20] Ferretti V, et al. Effects of intra-accumbens NMDA and AMPA receptor antagonists on short-term spatial learning in the Morris water maze task. *Behav Brain Res* 2007;179:43–9.
- [21] File SE. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliot JM, Heal CA, Marsden CA, editors. *Experimental approaches to anxiety and depression*. Amsterdam: Elsevier; 1992. p. 25–44.
- [22] File SE. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 1993;58:199–202.
- [23] File SE, Gonzalez LE, Gallant R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology* 1998;19:397–405.
- [24] Floresco SB, Seamans JK, Phillips AG. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J Neurosci* 1997;17:1880–90.
- [25] Gargiulo PA. Thyrotropin releasing hormone injected into the nucleus accumbens septi selectively increases face grooming in rats. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:805–10.
- [26] Ghizoni DM, Moro João L, Moratelli Neto L, Da Cunha IC, Pereira LO, Borges FRM, et al. The effects of metabolic stress and vagotomy on emotional learning in an animal model of anxiety. *Neurobiol Learn Mem* 2006;86:107–16.
- [27] Gray JA. Dopamine release in the nucleus accumbens: the perspective from aberrations of consciousness in schizophrenia. *Neuropsychologia* 1995;33:1143–53.
- [28] Green TA, Alibhai IN, Hommel JD, DiLeone RJ, Kumar A, Theobald DE, et al. Induction of inducible cAMP early repressor expression in nucleus accumbens by stress or amphetamine increases behavioural responses to emotional stimuli. *Neuroscience* 2006;26:8235–42.
- [29] Groenewegen HJ, Wright C, Beijer AV. The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system. *Prog Brain Res* 1996;107:485–511.
- [30] Handley SL, Mithani S. Effects of  $\alpha$ 2-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of fear-motivated behaviour. *N S Arch Pharmacol* 1984;327:1–5.
- [31] Heidbreder CA, Groenewegen HJ. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 2003;27:555–79.
- [32] Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 1991;41:89–125.
- [33] Hoog S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:21–30.
- [34] Holmes A, Rodgers RJ. Responses of Swiss Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol Biochem Behav* 1998;60:473–88.
- [35] Horsley RR, Norman C, Cassaday HJ. Lesions of the nucleus accumbens shell can reduce activity in the elevated plus-maze. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 2007;31:906–14.
- [36] Inoue T, Tsuchiya K, Koyama T. Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49:911–20.
- [37] Jenkins R. Sex differences in minor psychiatric disorder. *Psychol Med* 1985;7:1–53.
- [38] Jongen-Rêlo A, Kauffinan S, Feldon J. A differential involvement of the shell and core subterritories of the nucleus accumbens of rats in attentional processes. *Neuroscience* 2002;111:95–109.
- [39] Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav* 2005;86:773–95.
- [40] Kelley AE, Swanson CJ. Feeding induced by blockade of AMPA and kainate receptor within ventral striatum: a microinfusion mapping study. *Behav Brain Res* 1997;89:107–13.
- [41] Koob GF. Neural mechanisms of drug reinforcement. In: Kalivas PW, Samson HH, editors. *The neurobiology of drug and alcohol addiction*, 654. New York: Ann NY Acad Sci; 1992. p. 171–91.
- [42] Lamprea MR, Cardenas FP, Silveira R, Morato S, Walsh TJ. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: Forebrain cholinergic mechanisms. *Behav Brain Res* 2000;117:97–105.
- [43] Liberzon I, Taylor SF, Amdur R, Jung TD, Chamberlain KR, Minoshima S, et al. Brain activation in PTSD in response to trauma-related stimuli. *Biol Psychiatry* 1999;45:817–26.
- [44] Lopes APF, et al. GABAA and GABAB agonist microinjections into medial accumbens shell increase feeding and induce anxiolysis in an animal model of anxiety. *Behav Brain Res* 2007;184:142–9.

- [45] Maldonado-Irizarry CS, Kelley AE. Differential behavioural effects following microinjection of an NMDA antagonist into nucleus accumbens subregions. *Psychopharmacology* 1994;116:65–72.
- [46] Maldonado-Irizarry CS, Kelley AE. Excitatory amino acid receptors within nucleus accumbens subregions differentially mediate spatial learning in the rat. *Behav Pharmacol* 1995;6:527–39.
- [47] Marcondes FK, Miguel KJ, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav* 2001;74:435–40.
- [48] Martínez C, Ropero C, Funes A, Flores E, Blotta C, Landa AI, et al. Effects of selective NMDA and non-NMDA blockade in the nucleus accumbens on the plus-maze test. *Physiol Behav* 2002;76:219–24.
- [49] Mogenson GL, Jones DL, Yim CY. From motivation to action: functional interface between the limb system and the motor system. *Prog Neurobiol* 1980;14:69–97.
- [50] Mora S, Dussaulbat N, Díaz-Véliz G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 1996;21:609–20.
- [51] Morgane PJ, Galler JR, Mokler DJ. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol* 2005;75:143–60.
- [52] Nomikos GG, Spyraiki C. Influence of oestrogen on spontaneous and diazepam-induced exploration of rats in an elevated plus maze. *Neuropharmacology* 1988;27:691–6.
- [53] Ottoni EB. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behaviour observation sessions. *Behav Res Methods Instrum Comput* 2000;32:446–9.
- [54] Parkinson JA, Olmstead MC, Burns LH, Robbins TW, Everitt BJ. Dissociation in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive Pavlovian approach behaviour and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by D-amphetamine. *J Neurosci* 1999;19:2401–11.
- [55] Parkinson JA, Robbins TW, Everitt BJ. Selective excitotoxic lesions of the nucleus accumbens core and shell differentially affect aversive Pavlovian conditioning to discrete and contextual cues. *Psychobiology* 1999;27:256–66.
- [56] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press; 2006.
- [57] Pereira LO, Da Cunha IC, Marino Neto J, Paschoalini MA, Faria MS. The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Behav Brain Res* 2005;159:55–61.
- [58] Pezze MA, Feldon J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog Neurobiol* 2004;74:301–20.
- [59] Picciotto MR, Brunzell DH, Caldarone B. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *J NeuroReport* 2002;13:1097–106.
- [60] Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL, Konradi C, Nestler EJ, Carlezon Jr WA. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J Neurosci* 2001;21:7397–403.
- [61] Pothuizen HHJ, Jongen-Rêlo A, Feldon J. The effects of temporary inactivation of the core and shell subregions of the nucleus accumbens on prepulse inhibition of the acoustic startle reflex and activity in rats. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:683–96.
- [62] Pulvirenti L, Berrier R, Kreifeldt M, Koob GF. Modulation of locomotor activity by NMDA receptors in the nucleus accumbens core and shell regions of the rat. *Brain Res* 1994;664:231–6.
- [63] Reidel G, Harrington NR, Hall G, Macphail EM. Nucleus accumbens lesions impair context, but not cue, conditioning in rats. *Neuroreport* 1997;8:2477–81.
- [64] Reynolds SM, Berridge KC. Glutamate motivational ensembles in nucleus accumbens: rostrocaudal shell gradients of fear and feeding. *Eur J Neurosci* 2003;17:2187–200.
- [65] Rodgers RJ, Johnson NJT, Cole JC, Dewar CV, Kidd GR, Kimpson PH. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:41–50.
- [66] Rosa VP, Vandresen N, Calixto AV, Kovaleski DF, Faria MS. Temporal analysis of the rat's behaviour in the plus-maze: Effect of midazolam. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;67:177–82.
- [67] Rouillet P, Sargolini F, Oliverio A, Mele A. NMDA and AMPA antagonist infusions into the ventral striatum impair different steps of spatial information processing in a nonassociative task in mice. *J Neurosci* 2001;21:2143–9.
- [68] Salamone JD. The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behav Brain Res* 1994;61:117–33.
- [69] Salamone JD, Cousins MS, Snyder BJ. Behavioral functions of nucleus accumbens dopamine: empirical and conceptual problems with the anhedonia hypothesis. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:341–59.
- [70] Sargolini F, Rouillet P, Oliverio A, Mele A. Effects of lesions to the glutamatergic afferents to the nucleus accumbens in the modulation of reactivity to spatial and non-spatial novelty in mice. *Neuroscience* 1999;93:855–67.
- [71] Sargolini F, Rouillet P, Oliverio A, Mele A. Effects of intra-accumbens focal administrations of glutamate antagonists on object recognition memory in mice. *Behav Brain Res* 2003;138:153–63.
- [72] Seamans JK, Phillips AG. Selective memory impairments produced by transient lidocaine-induced lesions of the nucleus accumbens in rats. *Behav Neurosci* 1994;108:456–68.
- [73] Setem J, Pinheiro AP, Motta VA, Morato S, Cruz APM. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;62:515–21.
- [74] Setlow B. The nucleus accumbens and learning and memory. *J Neurosci Res* 1997;49:515–21.
- [75] Setlow B, McGaugh JL. Sulpiride infused into the nucleus accumbens post-training impairs memory of spatial water maze training. *Behav Neurosci* 1998;112:603–10.
- [76] Shapira NA, Okun MS, Wint D, Foote KD, Byars JA, Bowers D, et al. Panic and fear induced by deep brain stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:410–2.
- [77] Simonds VM, Whiffen VE. Are gender differences in depression explained by gender differences in co-morbid anxiety? *J Affective Dis* 2003;77:197–202.
- [78] Stratford TR, Kelly AE. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci* 1997;17:4434–40.
- [79] Stratford TR, Swanson CJ, Kelley AE. Specific changes in food intake elicited by blockade or activation of glutamate receptors in the nucleus accumbens shell. *Behav Brain Res* 1998;93:43–50.
- [80] Sturm V, Lenartz D, Koulousakis A, Treuer H, Herholz K, Klein JC, et al. The nucleus accumbens: a target for deep brain stimulation in obsessive-compulsive- and anxiety-disorders. *J Chem Neuroanat* 2003;26:293–9.
- [81] Sutherland RJ, Rodriguez AJ. The role of the fornix/fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. *Behav Brain Res* 1989;32:265–77.
- [82] Usiello A, Sargolini F, Rouillet P, Amassari-Teule M, Passino E, Oliverio A, et al. N-Methyl-D-aspartate receptors in the nucleus accumbens are involved in detection of spatial novelty in mice. *Psychopharmacology* 1998;137:175–83.
- [83] Weiner I, Gal G, Rawlins JNP, Feldon J. Differential involvement of the shell and core subterritories of the nucleus accumbens in latent inhibition and amphetamine induced activity. *Behav Brain Res* 1996;81:123–33.
- [84] Walker DL, Toufexis DJ, Davis M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur J Pharmacol* 2003;463:199–216.
- [85] Wallace DG, Gorny B, Whishaw IQ. Rats can track odours, other rats, and themselves: implications for the study of spatial behaviour. *Behav Brain Res* 2002;131:185–92.
- [86] Zahm DS, Brog JS. On the significance of subterritories in the "Accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience* 1992;50:751–67.



Contents lists available at ScienceDirect

## Behavioural Brain Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbr](http://www.elsevier.com/locate/bbr)



### Research report

# The microinjection of AMPA receptor antagonist into the accumbens shell failed to change food intake, but reduced fear-motivated behaviour in free-feeding female rats

Isabel Cristina da Cunha<sup>a,b</sup>, Aparecida Marcelino de Nazareth<sup>a</sup>, Juliano Cordova Vargas<sup>a</sup>, Adriana Ferraz<sup>a</sup>, José Marino Neto<sup>a</sup>, Marta Aparecida Paschoalini<sup>a</sup>, Moacir Serralvo Faria<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiological Sciences, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Campus Trindade, 88.040-900 Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Centre of Biological Sciences and Health, University of the South of Santa Catarina (UNISUL), 88.132-000 Palhoça, SC, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 May 2008

Received in revised form 29 May 2008

Accepted 2 June 2008

Available online xxx

#### Keywords:

Accumbens

Anxiety

Food intake

AMPA

Glutamate

Rat

### ABSTRACT

This study investigated the effect of the AMPA receptor antagonist 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; 2.5 and 5.0 nmol/side) microinjected into the core and shell sub-regions of the accumbens (Acb) nucleus, on food intake and the level of anxiety in female rats. Bilateral microinjections of CNQX (5.0 nmol/side) into the Acb shell (AP, +1.08 to +2.04), but not into the Acb core, induced an anxiolytic-like effect in relation to rats microinjected with vehicle, since the animals exhibited low level of SAP in the feeding test. The anxiolytic-like effect induced by 5.0 nmol CNQX microinjection into the Acb shell may not be ascribed to changes in the motor activity of the animals, because the frequency of locomotion, rearing and grooming remained unchanged after the drug microinjection. However, neither Acb shell nor Acb core CNQX microinjections were able to change the animals food intake along 1 h feeding behaviour evaluation. Food intake remained unchanged 24 h after the drug microinjections either into the Acb shell or into the Acb core. The data suggest that AMPA receptor blockade in the Acb nucleus may differentially change the ingestive and defensive behaviours in female rats.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The accumbens (Acb) nucleus is an important region of the basal forebrain involved in appetitive and aversive related functions [34,35,37]. In the Acb, the feeding behaviour is regulated by multiple neurotransmitter systems, such as glutamate, GABA, opioids, and dopamine [15]. Regarding the glutamate neurotransmission, it has been shown that the microinjection of AMPA receptor antagonist into the shell region of the Acb in rats increases food intake [16], while the Acb shell AMPA microinjection decreases feeding in food-restricted rats. Increased food intake has also been induced following the microinjection of GABA agonists into Acb shell [1,15]. Taken together, the literature indicates that hyperphagic response may be induced in rats either removing the excitatory input to AMPA receptors located in the shell region of the Acb or inhibiting the Acb neural activity by GABA receptor stimulations [15].

Despite feeding behaviour, the Acb nucleus is also involved with defensive behavioural responses elicited by noxious or threatening stimuli [2,3,9,12,18,34]. In contrast to feeding behaviour, which

appears to be organized along the more rostral sites of the Acb shell, defensive behaviours appear to be organized along the more caudal sites of the Acb shell [34,35]. For example, hyperphagia has been induced by AMPA antagonist and GABA agonist microinjections at the rostral regions of the Acb shell, while fear-related behaviours, such as burying or paw-treading, appear to be evoked by both AMPA antagonist and GABA agonist microinjection at the caudal regions of the Acb shell [34,35].

Conversely, it has also been shown that the microinjection of GABA receptors agonist into the Acb shell increased food intake and decreased the level of fear/anxiety in free-feeding female rats tested in the plus-maze, an animal model of anxiety [19]. In addition, the microinjection of AMPA receptor antagonist into the Acb shell induced anxiolytic-like effect in the plus-maze [7]. However, the possible occurrence of hyperphagia and anxiolysis has not been evaluated with regard to the blockade of AMPA receptor in the Acb nucleus, yet. The fear/feeding/Acb relationship has important clinical implications and deserves further investigation, since these different motivational states are disrupted in some psychiatric disorders, such as anorexia and bulimia [25].

The present study aimed at evaluating the effect of AMPA antagonist microinjections into both core and shell regions of the Acb nucleus on food intake and defensive behaviour in free-feeding

\* Corresponding author. Fax: +55 48 3721 9672.

E-mail address: [serralvo@ccb.ufsc.br](mailto:serralvo@ccb.ufsc.br) (M.S. Faria).

female rats. Female rats were used because anxiety and eating disorders occurrence predominate in women [24].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Adult female Wistar rats, weighing approximately 200–250 g (2-month age), were supplied by the animal breeding division of the Federal University of Santa Catarina. The animals were housed in individual cages and submitted to a 7-day period of adaptation with free access to food and water under a light/dark cycle of 12 h (lights on, at 6 a.m.). The animals were only handled for weighing, drug administration, and cage cleaning. All the experimental procedures were conducted in compliance with the recommendations of the Ethics Commission for the use of experimental animals of the Federal University of Santa Catarina, SC, Brazil.

### 2.2. Cannulae implantations

At least 7 days before the experiments, each animal was intraperitoneally anaesthetized with a ketamine hydrochloride ( $87 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and xylazine ( $13 \text{ mg kg}^{-1}$ ) mixture, and bilateral stainless steel guide cannulae (30 G) were implanted using stereotaxic techniques. The guiding cannulae were aimed at sites located 1 mm close to either the Acb core or the Acb shell according to the coordinates (derived from Paxinos and Watson Atlas [28]). The cannulae were anchored in the skull with jeweller screw, fixed with dental cement, and maintained patent by an inner removable stylet between the experiments. Shell placements were AP 1.4 mm anterior to bregma, ML  $\pm 0.8$  mm lateral to midline and DV to 5.5 mm below the surface of the skull. Shell microinjections were distributed across the following rostrocaudal levels: +1.08 ( $n=4$ ), +1.2 ( $n=5$ ), +1.44 ( $n=3$ ), +1.68 ( $n=2$ ), +1.8 ( $n=6$ ) and +2.04 ( $n=6$ ). Core placements were AP 1.2 mm anterior to bregma, ML  $\pm 1.0$  mm lateral to midline and DV to 5.5 mm below the surface of the skull. Shell microinjections were distributed across the following rostrocaudal levels: +1.08 ( $n=6$ ), +1.2 ( $n=2$ ), +1.44 ( $n=8$ ), +1.68 ( $n=4$ ), +1.8 ( $n=2$ ) and +2.04 ( $n=3$ ).

### 2.3. Drug microinjections

Injections were made through inner cannulae (33 G) extending 1 mm beyond the ventral tip of the guiding cannulae connected by polyethylene tubing to a Hamilton microsyringe ( $1 \mu\text{l}$ ) fitted to an injection pump. The injected volume ( $0.4 \mu\text{l}$ ) was administered bilaterally over a period of 60 s and a further 60 s was allowed for the solution to diffuse from the cannulae. 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) was purchased from Tocris (USA) and freshly dissolved in artificial cerebrospinal fluid (aCSF; 147 mM  $\text{Na}^+$ , 154 mM  $\text{Cl}^-$ , 3.0 mM  $\text{K}^+$ , 1.2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , and 0.9 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ; pH 7.4). The doses of CNQX were estimated according to the literature.

### 2.4. Food intake evaluation

Previously to the test for food intake evaluation, each animal was submitted to two consecutive (24 h interval) habituation sessions in the feeding cage for 30 min. The food intake evaluation was carried out 24 h after the last habituation session. Each animal was placed in a test cage constructed with transparent glass ( $49 \text{ cm} \times 34 \text{ cm} \times 32 \text{ cm}$ ), containing a pre-weighed amount of food (standard rat chow pellets) and tap water (in a bottle placed outside the test cage with a spout projected through the wall of the cage). Each animal was allowed to explore the environment freely for 1 h (length of the session). The session was recorded by a video camera perpendicularly located 60 cm above the cage floor, for subsequent detailed behavioural analysis through Etholog 2.2 [23]. The back and lateral walls, as well as the floor cage, were coated with a black adhesive plastic paper. In order to facilitate behavioural recording, the front wall of the cage had a mirror with the same dimensions of the transparent glass, which was arranged in a  $45^\circ$  angle in relation to the vertical plane. This mirror arrangement also prevented the animal to see its reflex on the mirror. At the end of the session, the difference between food and water weight at the beginning and at the end of the session was taken as the amount of food or water consumed. Food intake was also evaluated 24 h after Acb shell and Acb core microinjections.

Throughout the session, five variables were evaluated. First, the feeding length, defined as the amount of time the animal mouth was either touching or chewing a food pellet. Second, locomotion, defined as the number of front to back cage crossings. Third, the number of rearing, defined as the front paws raised from the tank floor and either placed on the side of the tank or placed in front of the body. Fourth, the number of grooming, defined as paw strokes over the face or licking of the paws or body. Fifth, the number of stretched-attend postures (SAPs), defined as an exploratory posture in which the body is stretched forward, then, retracted to the original position without any forward locomotion [38]. All procedures were carried out between 11 a.m. and 4 p.m.

### 2.5. Procedure

Each animal received a bilateral microinjection of either aCSF (core,  $n=9$  and shell,  $n=10$ ) or CNQX (2.5 and 5.0 nmol) into the core (2.5 nmol CNQX,  $n=8$  and 5.0 nmol CNQX,  $n=8$ ) and shell (2.5 nmol CNQX,  $n=6$  and 5.0 nmol CNQX,  $n=10$ ) sub-regions of the Acb, as described in Section 2.3. Following the drug administrations, each animal was submitted to food intake evaluation, as described in Section 2.4.

### 2.6. Histological analysis

At the end of the experiments, the animals were deeply anaesthetized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 0.9% saline followed by 10% formalin. The brains were removed and subsequently cut (vibratome) in the transverse plane ( $100 \mu\text{m}$ ). Sections were stained with cresyl violet and the cannulae loci were examined and documented through a camera lucida attached to a light microscope. Cannulae placements were mapped onto the corresponding atlas drawings of Paxinos and Watson [28]. Data from rats with misplaced cannulae in the Acb core and Acb shell were not included in the analyses.

### 2.7. Statistical analysis

The data were analysed by two-way analysis of variance (ANOVA) with “Drug Treatment” as factor 1 and “Microinjection Region” as factor 2. When appropriate, ANOVA was followed by Duncan’s test for multiple comparisons. Only probability values less than 5% were considered significant.

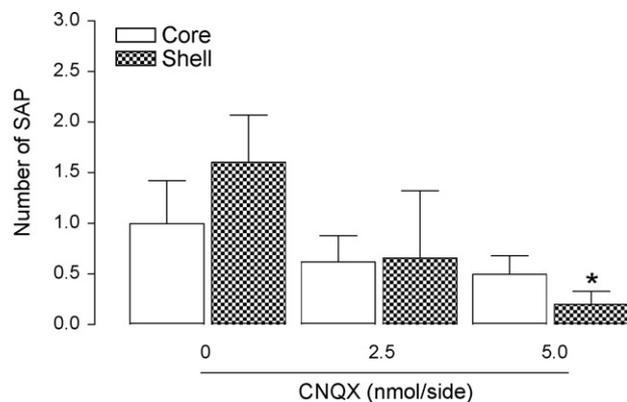
## 3. Results

The histological analysis indicated that 26 injection cannulae tips reached the region of the Acb shell, while 25 injection cannulae tips reached the Acb core (AP varying between +1.08 and +2.04; Fig. 1). The two-way ANOVA only revealed a significant main effect for SAP variable in relation to the “Drug” factor ( $F_{2,45} = 3.65$ ;  $p < 0.05$ ). Duncan’s test indicated that the group bilaterally microinjected with CNQX at the dose of 5.0 nmol into the Acb shell, displayed low frequency of SAP in relation to respective group bilaterally microinjected with vehicle (Fig. 2). There were no significant main effect for 1 h Food intake ( $F_{2,45} = 0.64$ ), 24 h Food intake ( $F_{2,45} = 0.55$ ), Feeding length ( $F_{2,45} = 0.35$ ), Locomotion ( $F_{2,45} = 0.51$ ), Rearing ( $F_{2,45} = 0.08$ ) and Grooming ( $F_{2,45} = 0.42$ ) variables, indicating that, irrespective of the drug treatment, there were no significant differences between the groups microinjected with aCSF and CNQX (2.5 and 5.0 nmol/side) in relation to these variables (Table 1). Regarding factor 2 (microinjection region), ANOVA failed to reveal any significant main effect in 1 h Food intake ( $F_{1,45} = 1.98$ ), 24 h Food intake ( $F_{1,45} = 2.37$ ), Feeding length ( $F_{1,45} = 0.01$ ), Locomotion ( $F_{1,45} = 3.12$ ), SAP ( $F_{1,45} = 0.13$ ), Rearing ( $F_{1,45} = 1.24$ ) and Grooming ( $F_{1,45} = 1.22$ ) variables, indicating that, irrespective of the region of microinjection (core or shell), there were no significant differences between the groups treated with aCSF and CNQX (2.5 and 5.0 nmol/side) in relation to these variables (Table 1). There was only a significant between factor interactions for rearing variable ( $F_{2,45} = 3.67$ ;  $p < 0.05$ ), but not to 1 h Food intake ( $F_{2,45} = 0.65$ ), 24 h Food intake ( $F_{2,45} = 0.78$ ), Feeding length ( $F_{2,45} = 2.37$ ), Locomotion ( $F_{2,45} = 2.76$ ), SAP ( $F_{2,45} = 0.80$ ) and Grooming ( $F_{2,45} = 0.51$ ) variables.

## 4. Discussion

The present study showed that when CNQX, a glutamate AMPA receptor antagonist, was microinjected into the Acb shell the animals exhibited decreased SAP behaviour in the feeding test. SAP has been interpreted as a specific information-gathering behaviour displayed in potentially threatening situations [29]. It has been considered a behaviour indicative of an approach–avoidance conflict [44] that may be elicited in a variety of threatening situations, including social, predatory, and nonsocial contexts [4,5,14,44]. It has also been shown that SAP behaviour is highly correlated with corticosterone release [36] and is sensitive to the effects of anxiolytic and anxiogenic drugs [10,38]. Since we demonstrated that





**Fig. 2.** Reduced fear-motivated behaviour induced by AMPA antagonist microinjections into the accumbens shell. Number of stretched-attend posture (SAP) exhibited by rats in a feeding test after bilateral microinjection with artificial cerebrospinal fluid (vehicle) or CNQX (2.5 and 5.0 nmol/side) into the core and shell sub-regions of the accumbens nucleus. Data are represented as the mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  in relation to the group treated with vehicle. (two-way ANOVA followed by Duncan's test for multiple comparisons).

in rats [7,22], thus, pointing to a putative role of AMPA receptors in Acb shell for anxiety modulation in female rats.

The present study showed that the AMPA receptor blockade in the Acb shell was able to reduce the number of SAP, a fear-motivated behaviour. However, it has also been shown that the microinjections of AMPA antagonist microinjection into the Acb shell elicited defensive burying (a fear-motivated behaviour) in both male and female rats [34]. It is difficult to explain these contrasting effects on the animal emotionality (anxiolysis and anxiogenesis) after Acb shell AMPA antagonist microinjection. Studies on human beings have demonstrated that deep brain stimulation of the Acb shell reduced the severity symptoms in patients with obsessive–compulsive- and anxiety-disorder [43] whereas the same procedure carried out at the anterior limb of the internal capsule and at the Acb region elicited panic in an old man with refractory obsessive–compulsive disorder [39]. Thus, both basic and clinical research results are contradictory in the literature and the role of the glutamate neurotransmission into the Acb shell on fear/anxiety modulation deserves further investigation.

The anxiolytic-like effect induced by CNQX microinjection into the Acb shell may not be ascribed to changes in the animal motor activity, since other behaviours displayed by the animals in the feeding test, such as locomotion, rearing, as well as grooming, were not altered by the drug microinjection. In the same vein, the microinjection of DNQX (another AMPA receptor antagonist) into the Acb shell was able to induce anxiolytic-like effect devoid of motor activity alteration in rats submitted to the plus-maze test [7]. In addition, another prior data from the literature also showed that the microinjection of AMPA receptor antagonist into the Acb did not change the motor activity of rats tested in the plus-maze [22]. On the other hand, studies which covered both excitotoxic and electrolytic lesions to the Acb shell have shown either no effect [27,33] or increased locomotor activity [13,31,45]. Recently, a study, which has used electrolytic lesion of the Acb, showed that rats with lesion in the Acb shell, but not in the Acb core, exhibited reduced locomotion and unchanged emotionality in the EPM [11]. These contradictory results may be explained by different methodological procedures, such as the interval of time between surgery and test (7 months as in Horsley's study [11] and around 7 days in the present one). Moreover, it is important to keep in mind that lesion treatments are not necessarily functionally equivalent to pharmacological treatment, due to the damage of fibres passing through.

Regarding Acb core, the present study demonstrated that animals microinjected with CNQX into the core sub region of the Acb displayed the same level of locomotion, rearing and grooming than those exhibited by animals microinjected with aCSF, thus, indicating that the blockade of the AMPA receptors into the Acb core did not change the animal motor activity. However, it has been well accepted that the Acb core is involved, preferentially, in regulating motor functions [46], although the literature data are contradictory. While some data have shown that the Acb core underlies locomotion in different task [20,21,30] and mediates the effects of psychostimulants on locomotor activity [6,26], electrolytic and excitotoxic lesions of the Acb core have failed to change the locomotor activity [27,45].

Regarding food intake, it has been proposed that the glutamate exerts a tonic inhibition on Acb shell medium-spiny output neurons which projects to hypothalamic feeding-related circuitry [15]. This assumption is supported by the fact that hyperphagia may be induced in free-feeding rats by AMPA receptor antagonists microinjection into the Acb shell [16,21,42]. Thus, the lacking of Acb shell inhibitory influences on hypothalamic feeding-related circuitry would result in a motivational state for food intake [15]. In contrast to Kelley et al's theory, it has also been demonstrated that AMPA receptor agonists may dose-dependent increase food intake when microinjected into Acb shell [8], as it does when microinjected into the lateral hypothalamus [17,40,41]. In addition, the AMPA Acb shell microinjection was able to enhance the hyperphagic effect induced by the DAMGO [32], a  $\mu$ -selective opioid agonist [8], thus, reinforcing the role of glutamate and endogenous opioids to increase food intake in the Acb shell.

In the present study, the blockade of AMPA receptor in the Acb shell did not change the feeding behaviour. Neither food intake along 1 h test, nor 24 h after the drug microinjection were altered by CNQX AMPA receptor antagonist microinjection. In addition, the feeding length, characterised by the amount of time the animal mouth was either touching or chewing a food pellet, was not changed by CNQX microinjection into the Acb shell, either. This result may be explained by methodological differences adopted. As for instance, the use of individually housed animals against group house animals, the number of prior habituation to test chamber conditions in order to reach stable baseline levels for food intake or even animals receiving drug or vehicle in counterbalanced order against animals receiving only one drug microinjection. Moreover, the influence of the hormonal levels along the different phases of the ovarian cycle, which was not carried out either in the present study, or in previous ones using female rats as experimental subject [34,35], is another point to ponder. However, if glutamate may increase food intake by AMPA receptor activation into the Acb shell [8], it is plausible to infer that AMPA receptor antagonist microinjection into the Acb shell fails to alter food intake in animals. Especially if the influences of glutamate on feeding behaviour in the Acb shell are neither tonic nor inhibitory on food intake.

#### Acknowledgment

We are grateful to Marimar da Silva for the revision of the manuscript.

#### References

- [1] Basso AM, Kelley AE. Feeding induced by GABAA receptor stimulation within the nucleus accumbens shell: regional mapping and characterization of macronutrient and taste preference. *Behav Neurosci* 1999;113:324–36.
- [2] Beck CH, Fibiger HC. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. *J Neurosci* 1995;15:709–20.

- [3] Berridge CW, Mitton E, Clark W, Roth RH. Engagement in a non-escape (displacement) behavior elicits a selective and lateralized suppression of frontal cortical dopaminergic utilization in stress. *Synapse* 1999;32:187–97.
- [4] Blanchard RJ, Blanchard DC. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol* 1989;103:70–82.
- [5] Blanchard RJ, Parmigiani S, Bjornson C, Masuda C, Weiss SM, Blanchard DC. Antipredator behavior of Swiss-Webster mice in a visible burrow system. *Aggress Behav* 1995;21:123–36.
- [6] Boye SM, Grant RJ, Clarke PB. Disruption of dopaminergic neurotransmission in nucleus accumbens core inhibits the locomotor stimulant effects of nicotine and *D*-amphetamine in rats. *Neuropharmacology* 2001;40:792–805.
- [7] Da Cunha IC, Lopes APF, Steffens SM, Ferraz A, Vargas JC, De Lima TCM, Marino Neto J, Paschoalini MA, Faria MS. The microinjection of AMPA receptor antagonist into the accumbens shell, but not into the accumbens core, induces anxiolysis in an animal model of anxiety. *Behav Brain Res* 2008;188:91–9.
- [8] Echo JA, Lamonte N, Christian G, Znamensky V, Ackerman TF, Bodnar RJ. Excitatory amino acid receptor subtype agonists induce feeding in the nucleus accumbens shell in rats: opioid antagonist actions and interactions with  $\mu$ -opioid agonists. *Brain Res* 2001;921:86–97.
- [9] Gray JA. Dopamine release in the nucleus accumbens: the perspective from aberrations of consciousness in schizophrenia. *Neuropsychologia* 1995;33:1143–53.
- [10] Griebel G, Rodgers RJ, Perrault G, Sanger DJ. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;57:817–27.
- [11] Horsley RR, Norman C, Cassaday HJ. Lesions of the nucleus accumbens shell can reduce activity in the elevated plus-maze. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:906–14.
- [12] Inoue T, Tsuchiya K, Koyama T. Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49:911–20.
- [13] Jongen-Rêlo A, Kauffinan S, Feldon J. A differential involvement of the shell and core subterritories of the nucleus accumbens of rats in attentional processes. *Neuroscience* 2002;111:95–109.
- [14] Kaesermann HP. Stretched attend posture, a non-social form of ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drug action. *Psychopharmacology (Berlin)* 1986;89:31–7.
- [15] Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav* 2005;86:773–95.
- [16] Kelley AE, Swanson CJ. Feeding induced by blockade of AMPA and kainate receptor within ventral striatum: a microinfusion mapping study. *Behav Brain Res* 1997;89:107–13.
- [17] Khan AM, Curras MC, Dao J, Jamal FA, Turkowski CA, Goel RK, Gillard ER, Wolfsohn SD, Stanley BG. Lateral hypothalamic NMDA receptor subunits NR2A and/or NR2B mediate eating: immunohistochemical/behavioral evidence. *Am J Physiol* 1999;276:R880–91.
- [18] Liberzon I, Taylor SF, Amdur R, Jung TD, Chamberlain KR, Minoshima S, Koeppe RA, Fig LM. Brain activation in PTSD in response to trauma-related stimuli. *Biol Psychiatry* 1999;45:817–26.
- [19] Lopes APF, Da Cunha IC, Steffens SM, Ferraz A, Vargas JC, De Lima TCM, Marino Neto J, Faria MS, Paschoalini MA. GABAA and GABAB agonist microinjections into medial accumbens shell increase feeding and induce anxiolysis in an animal model of anxiety. *Behav Brain Res* 2007;184:142–9.
- [20] Maldonado-irizarry CS, Swanson CJ, Kelley AE. Differential behavioural effects following microinjection of an NMDA antagonist into nucleus accumbens subregions. *Psychopharmacology* 1994;116:65–72.
- [21] Maldonado-irizarry CS, Swanson CJ, Kelley AE. Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control feeding behavior via the lateral hypothalamus. *J Neurosci* 1995;15:6779–88.
- [22] Martínez C, Roperio C, Funes A, Flores E, Blotta C, Landa AI, Gargiulo PA. Effects of selective NMDA and non-NMDA blockade in the nucleus accumbens on the plus-maze test. *Physiol Behav* 2002;76:219–24.
- [23] Ottoni EB. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behaviour observation sessions. *Behav Res Methods Instrum Comput* 2000;32:446–9.
- [24] Palanza P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25:219–33.
- [25] Patrick L. Eating disorders: a review of the literature with emphasis on medical complications and clinical nutrition. *Altern Med Rev* 2002;7:184–202.
- [26] Parkinson JA, Olmstead MC, Burns LH, Robbins TW, Everitt BJ. Dissociation in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive Pavlovian approach behaviour and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by *D*-amphetamine. *J Neurosci* 1999;19:2401–11.
- [27] Parkinson JA, Robbins TW, Everitt BJ. Selective excitotoxic lesions of the nucleus accumbens core and shell differentially affect aversive Pavlovian conditioning to discrete and contextual cues. *Psychobiology* 1999;27:256–66.
- [28] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press; 2006.
- [29] Pinel JPJ, Mana MJ. Adaptive interactions of rats with dangerous inanimate objects: support for a cognitive theory of defensive behavior. In: Blanchard RJ, Brain PF, Blanchard DC, Parmigiani S, editors. *Ethoexperimental approaches to the study of behavior*. Dordrecht: Kluwer Academic Publications; 1993. p. 137–50.
- [30] Pothuizen HHJ, Jongen-Rêlo A, Feldon J. The effects of temporary inactivation of the core and shell subregions of the nucleus accumbens on prepulse inhibition of the acoustic startle reflex and activity in rats. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:683–96.
- [31] Pulvirenti L, Berrier R, Kreifeldt M, Koob GF. Modulation of locomotor activity by NMDA receptors in the nucleus accumbens core and shell regions of the rat. *Brain Res* 1994;664:231–6.
- [32] Ragnauth A, Moroz M, Bodnar RJ. Multiple opioid receptors mediate feeding elicited by  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptor subtype agonists in the nucleus accumbens shell in rats. *Brain Res* 2000;876:76–87.
- [33] Reidel G, Harrington NR, Hall G, Macphail EM. Nucleus accumbens lesions impair context, but not cure, conditioning in rats. *Neuroreport* 1997;8:2477–81.
- [34] Reynolds SM, Berridge KC. Fear and feeding in the nucleus accumbens shell: rostrocaudal segregation of GABA-elicited defensive behavior versus eating behavior. *J Neurosci* 2001;21:3261–70.
- [35] Reynolds SM, Berridge KC. Glutamate motivational ensembles in nucleus accumbens: rostrocaudal shell gradients of fear and feeding. *Eur J Neurosci* 2003;17:2187–200.
- [36] Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol Behav* 1999;68:47–53.
- [37] Salamone JD, Cousins MS, Snyder BJ. Behavioral functions of nucleus accumbens dopamine: empirical and conceptual problems with the anhedonia hypothesis. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:341–59.
- [38] Setem J, Pinheiro AP, Motta VA, Morato S, Cruz APM. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;62:515–21.
- [39] Shapira NA, Okun MS, Wint D, Foote KD, Byars JA, Bowers D, Springer US, Lang PJ, Greenberg BD, Haber SN, Goodman WK. Panic and fear induced by deep brain stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:410–2.
- [40] Stanley BG, Ha IK, Spears LC, Dee MG. Lateral hypothalamic injections of glutamate, kainic acid,  $D$ ,  $L$ - $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole propionic acid or *N*-methyl-*D*-aspartic acid rapidly elicit intense transient eating in rats. *Brain Res* 1993;613:88–95.
- [41] Stanley BG, Willet VL, Donias HW, Dee MG, Duva MA. Lateral hypothalamic NMDA receptors and glutamate as physiological mediators of eating and weight control. *Am J Physiol* 1996;270:R443–9.
- [42] Stratford TR, Swanson CJ, Kelley AE. Specific changes in food intake elicited by blockade or activation of glutamate receptors in the nucleus accumbens shell. *Behav Brain Res* 1998;93:43–50.
- [43] Sturm V, Lenartz D, Koulousakis A, Treuer H, Herholz K, Klein JC, Klosterkötter J. The nucleus accumbens: a target for deep brain stimulation in obsessive-compulsive- and anxiety-disorders. *J Chem Neuroanat* 2003;26:293–9.
- [44] Van Der Poel AM. A note on “stretched attention” a behavioural element indicative of an approach-avoidance conflict in rats. *Anim Behav* 1979;27:446–50.
- [45] Weiner I, Gal G, Rawlins JNP, Feldon J. Differential involvement of the shell and core subterritories of the nucleus accumbens in latent inhibition and amphetamine induced activity. *Behav Brain Res* 1996;81:123–33.
- [46] Zahm DS, Brog JS. On the significance of subterritories in the “Accumbens” part of the rat ventral striatum. *Neuroscience* 1992;50:751–67.