

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

ANA PAULA FRAGA LOPES

**EFEITOS DAS INJEÇÕES DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS
GABAÉRGICOS E AGONISTAS SEROTONÉRGICOS NA
CONCHA DO NÚCLEO ACCUMBENS SOBRE
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS E INGESTIVOS EM
RATOS**

Florianópolis/SC

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITOS DAS INJEÇÕES DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS
GABAÉRGICOS E AGONISTAS SEROTONÉRGICOS NA
CONCHA DO NÚCLEO ACCUMBENS SOBRE
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS E INGESTIVOS EM
RATOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, na área de Neuropsicobiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Marta Aparecida Paschoalini.

Florianópolis

2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lopes, Ana Paula Fraga

Efeitos das injeções de agonistas e antagonistas gabaérgicos e agonistas serotoninérgicos [tese] : na concha do núcleo accumbens sobre comportamentos defensivos e ingestivos em ratos / Ana Paula Fraga Lopes ; orientadora, Marta Aparecida Paschoalini - Florianópolis, SC, 2012.

91 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Efeitos de GABA e serotonina na concha do núcleo accumbens. 3. Comportamentos defensivos e ingestivos em ratos. I. Paschoalini, Marta Aparecida. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais,
que são exemplos de superação para mim,
e aos meus amores Fábio e Lucas.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dra Marta Aparecida Paschoalini, que esteve sempre presente e disposta a ensinar o caminho a ser seguido, além de ter contribuído para meu crescimento e amadurecimento como pesquisadora. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria e ao Prof. Dr. José Marino Neto, por abrirem as portas de seus laboratórios e me darem a oportunidade de ser realizado este trabalho. Obrigado pela confiança, paciência e orientação dispensada.

A todos os professores da banca examinadora, que se colocaram à disposição para avaliar meu trabalho. Muito obrigada!

Agradeço aos meus queridos pais, Jaci e Marlene, por tudo que fizeram por mim em mais esta etapa. Muito obrigada pelo apoio de vocês! E ao meu irmão André Luís, que de uma forma muito especial, ensinou-me a jamais desistir.

Ao meu marido Fábio, por todo o apoio incondicional durante este período. Amo você! Lucas, a mamãe te ama para sempre! Muito obrigada por vocês dois fazerem parte da minha vida!

Aos meus colegas de laboratório: Aparecida, Samira, Diana, Anderson, Daniela, Cristiane, Larissa, Ana Paula, Eduardo e Bruno, que estiveram presentes na minha vida durante esses anos de estudo e pesquisa. A Laís e o Rafael, que eram alunos da iniciação científica e estavam sempre auxiliando no que fosse preciso, e agora seguem cada um o seu caminho. Muito obrigada a todos vocês!

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas pelo auxílio sempre que preciso: Sr. Carlos, Dona Vilma, Nivaldo, Péricles e Ana Cláudia. Muito obrigada sempre!

A todos os animais que fizeram parte deste trabalho, sem eles esta etapa não estaria finalizada!

À Capes e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

LOPES, Ana Paula Fraga. **Efeitos das injeções de agonistas e antagonistas gabaérgicos e agonistas serotoninérgicos na concha do núcleo accumbens sobre comportamentos defensivos e ingestivos em ratos.** 2012. Tese (Doutorado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

A fim de estabelecer uma relação funcional entre o controle dos comportamentos defensivos e ingestivos em ratos, esse estudo investigou o efeito de injeções locais de Muscimol (MUS, agonista do receptor GABA_A, 25 e 50 ng/lado), Baclofen (BAC, agonista do receptor GABA_B, 32 e 64 ng/lado), Bicuculina (BIC, antagonista do receptor GABA_A, 75 e 150 ng/lado), Saclofen (SAC, antagonista do receptor GABA_B, 1,5 e 3 µg/lado), 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina (8-OH-DPAT, agonista do receptor 5-HT_{1A}, 0,6 e 6 nmol/lado), 2-(3-clorobenziloxi)-6-(piperazin-1-il)pirazina (CP-80,9101, agonista do receptor 5-HT_{2C}, 0,75 e 1,5 µg/lado) e 3-(1,2,5,6-tetra-hidro-4-piridil)-5-propoxypyr-olo[3,2-b]piridina (CP-94,253, agonista do receptor 5-HT_{1B}, 0,56 e 1,0 µg/lado) na concha do núcleo accumbens (NAcc) em ratos privados de alimento por 24 horas. Os animais foram colocados no labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação de variáveis espaço-temporais e etológicas. Na sequência, os comportamentos ingestivos e não-ingestivos foram registrados durante 30 min e a quantidade de ração e água consumida foram mensuradas. Os resultados indicaram que ambas as doses de MUS e BAC, agonistas de receptores GABA_A e GABA_B respectivamente, diminuíram a frequência do comportamento de avaliação de risco no LCE, mas não afetaram o comportamento ingestivo. Este resultado sugere que a ativação de receptores GABA_A e GABA_B na concha do NAcc provocou um efeito ansiolítico sem causar mudança no comportamento ingestivo. Por outro lado, o bloqueio desses receptores, GABA_A e GABA_B na mesma região do NAcc, não alterou nenhuma das variáveis espaço-temporais ou etológicas testadas no LCE, no entanto, o bloqueio do receptor GABA_A provocou uma diminuição da ingestão de alimentos, acompanhada por uma redução da duração deste comportamento, indicando um efeito hipofágico. Os resultados mostraram que as variáveis espaço-temporais e etológicas avaliadas no LCE não foram afetadas pelo tratamento com 8-OH-DPAT, mas esse tratamento provocou uma redução na ingestão de alimentos,

acompanhada por uma diminuição na duração desse comportamento ingestivo, indicando um efeito hipofágico. Em contrapartida, a ativação do receptor 5-HT_{2C} não afetou o comportamento defensivo e ingestivo. Já o tratamento com CP-94,253 diminuiu o número de entradas nos braços abertos e a porcentagem de permanência nesses braços, além de reduzir o comportamento de imersão de cabeça no LCE. Esse resultado sugere que ativação do receptor 5-HT_{1B} provocou um efeito ansiogênico, sem alterar o comportamento ingestivo. Além disso, esses resultados demonstraram que, enquanto o comportamento defensivo foi afetado pela ativação do receptor 5-HT_{1B}, o comportamento ingestivo foi modificado pela estimulação do receptor 5-HT_{1A}. Coletivamente, os resultados do estudo sugerem que os circuitos gabaérgicos e serotoninérgicos na concha do NAcc, em ratos privados de alimento, regulam os comportamentos defensivos e ingestivos separadamente.

Palavras-chave: concha do núcleo accumbens; comportamento defensivo; comportamento ingestivo; receptores GABA_A e GABA_B; receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}.

ABSTRACT

LOPES, Ana Paula Fraga. **Effects of injections of GABAergic agonists and antagonists and serotonergic agonists in the nucleus accumbens shell on defensive and ingestive behaviour in rats.** 2012. Thesis (Doctorate Neuroscience) - Federal University of Santa Catarina, Florianópolis.

In order to establish a functional relationship between the control of ingestive and defensive behaviours in rats, this study investigated the effect of local injections of Muscimol (MUS, GABA_A receptor agonist, doses 25 e 50 ng/side), Baclofen (BAC, GABA_B receptor agonist, doses 32 e 64 ng/side), Bicuculline (BIC, GABA_A receptor antagonist, doses 75 e 150 ng/side), Saclofen (SAC, GABA_B receptor antagonist, doses 1,5 e 3 µg/side), 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT, selective 5-HT_{1A} receptor agonist, 0.6 and 6nmol/side), 2-(3-chlorobenzoyloxy)-6-(piperazin-1-yl) pyrazine (CP-80,9101, 5-HT_{2C} receptor agonist, doses 0.75 and 1.5µg/side), and 3-(1,2,5,6-tetrahydro-4-pyridyl)-5-propoxy-pyr-olo [3,2-b] pyridine (CP-94,253 highly selective 5-HT_{1B} receptor agonist, doses 0.56 and 1.0µg/side) in the nucleus accumbens shell (AcbSh) of food-deprived rats. The animals were exposed to the elevated plus maze (EPM) to analyse spatial-temporal and ethological variables. Subsequently, ingestive and non-ingestive behaviours were recorded for 30 min and the food intake was measured. The results indicated that both doses of MUS and BAC, GABA_A and GABA_B receptors agonists, respectively, decreased the frequency of risk assessment behaviour in the EPM, but did not affect feeding behaviour. This result suggests that activation of GABA_A and GABA_B receptors in the AcbSh caused an anxiolytic effect without causing a change in feeding behaviour. Furthermore, blockade of these receptors, GABA_A and GABA_B in the AcbSh, did not change any of the variables spatio-temporal or ethological tested in the EPM, but however, the GABA_A receptor blockade resulted in a decrease in food intake monitored by a reduction in the duration of this behaviour, indicating a hypophagic effect. The results indicated that both doses of 8-OH-DPAT did not affect the spatial-temporal and ethological variables in EPM, but provoked a reduction in both food intake and the feeding duration, indicating a hypophagic effect. In contrast, activation of 5-HT_{2C} receptor did not affect the defensive and ingestive behaviour. The treatment with CP-94, 253 decreased the number of entries into open arms and the percentage spent in these arms, besides reducing the head dipping behaviour in the EPM. This

result suggests that activation of 5-HT_{1B} receptor induced an anxiogenic, without changing feeding behaviour. Moreover, these results demonstrate that, while the defensive behaviour is affected by the activation of the 5-HT_{1B} receptor, ingestive behaviour was modified by stimulation of 5-HT_{1A} receptor. Collectively, our results suggest that the GABAergic and serotonergic circuits in the AcbSh of food-deprived rats regulate defensive and ingestive behaviours separately.

Keywords: nucleus accumbens shell, defensive behaviours; ingestive behaviours; GABA_A and GABA_B receptors; 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{2C} receptors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia de um corte transverso do telencéfalo rostral..... 23
- Figura 2.** Estruturas da região do estriado ventral..... 24
- Figura 3.** Aferências e eferências do centro e da concha do NAcc..... 25
- Figura 4.** Fotografia do aparelho estereotáxico (UFSC)..... 33
- Figura 5.** Local aproximado dos orifícios feitos para atingir bilateralmente a concha do NAcc.....34
- Figura 6.** Fotografia do labirinto em cruz elevado (UFSC) 37
- Figura 7.** Fotografia da caixa de registro dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos (UFSC)..... 39
- Figura 8.** Fotomicrografia (Barra de escala = 100 μ m) e representação esquemática de cortes coronais do cérebro do rato, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007)..... 43
- Figura 9.** Efeitos de injeções bilaterais de veículo (salina – 0), de (A) agonistas de receptores GABA_A, Muscimol (MUS 25 ou 50 ng), e GABA_B, Baclofen (BAC 32 ou 64 ng), ou (B) antagonistas de receptores GABA_A, Bicuculina (BIC 75 ou 150 ng), e GABA_B, Saclofen (SAC 1,5 ou 3 μ g), na concha do NAcc dos ratos privados de alimentos por 24h..... 47
- Figura 10.** Representação esquemática de cortes coronais do cérebro do rato, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007)..... 50
- Figura 11.** Efeitos de injeções bilaterais de veículo (ácido ascórbico 5% - 0) ou agonista do receptor 5 HT_{1A}, 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina - 8-OH-DPAT 0,6 ou 6 nmol, na concha do NAcc de ratos privados de alimentos por 24h,..... 54
- Figura 12:** Efeito da injeção bilateral de salina (0) ou 5-HT_{1B} (CP-94,253 0,56 e 1 μ g) na concha do NAcc de ratos privados de alimentos por 24h,..... 62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resumo dos resultados.....	61
---	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Efeitos de injeções de salina, agonistas de receptores GABA_A (Muscimol - MUS 25 ou 50 ng) ou GABA_B (Baclofen - BAC 32 ou 64 ng) na concha do NAcc nas variáveis espaço-temporais e etológicas dos ratos privados de alimentos por 24h durante 5 minutos de exposição ao LCE..... 45
- Tabela 2.** Efeitos das injeções de salina, antagonistas de receptores GABA_A (Bicuculina - BIC 75 ou 150 ng) ou GABA_B (Saclofen - SAC 1,5 ou 3 µg) na concha do NAcc, nas variáveis espaço-temporais e etológicas dos ratos privados de alimentos por 24h durante 5 minutos de exposição ao LCE..... 46
- Tabela 3.** Efeitos das injeções de salina, agonistas de receptores GABA_A (MUS 25 ou 50 ng) ou GABA_B (BAC 32 ou 64 ng) na concha do NAcc dos ratos privados de alimentos por 24h, na duração dos comportamentos não-ingestivos avaliados durante os 30 minutos de registro de comportamento ingestivo..... 48
- Tabela 4.** Efeitos das injeções de salina, antagonistas de receptores GABA_A (BIC 75 ou 150 ng) ou GABA_B (SAC 1,5 ou 3 µg) na concha do NAcc dos ratos privados de alimentos por 24h na duração dos comportamentos não-ingestivos avaliados durante 30 minutos de registro do comportamento ingestivo..... 49
- Tabela 5.** . Efeitos das injeções de ácido ascórbico 5 % (Ac..Asc) ou agonista de receptor 5-HT_{1A} (8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina - 8-OH-DPAT 0,6 ou 6 nmol) na concha do NAcc, nas variáveis espaço-temporais e etológicas dos ratos privados de alimentos por 24h durante 5 minutos de exposição ao LCE..... 53
- Tabela 6.** Efeitos das injeções de ácido ascórbico 5 % (Ac..Asc) ou agonista do receptor 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT 0,6 ou 6 nmol) na concha do NAcc dos ratos privados de alimentos por 24h na duração dos comportamentos não-ingestivos avaliados durante 30 minutos de registro do comportamento ingestivo..... 55
- Tabela 7.** Efeitos das injeções bilaterais de salina ou agonista do receptor 5-HT_{2C} (2-(3-clorobenziloxi)-6-(piperazin-1-il) pirazina, CP-

80,9101 - 0,75 e 1,50 µg) na concha do NAcc, nas variáveis espaço-temporais e etológicas dos ratos privados de alimentos por 24h, durante 5 minutos de exposição ao LCE..... 56

Tabela 8. Efeitos das injeções de salina ou agonista do receptor 5-HT_{2C} (CP-80,9101 0,75 ou 1,5 µg) na concha do NAcc dos ratos privados de alimentos por 24h, na duração dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos avaliados durante 30 minutos de registro do comportamento ingestivo..... 57

Tabela 9. Efeitos das injeções bilaterais de salina ou agonista do receptor 5-HT_{1B} (3-(1,2,5,6-tetra-hidro-4-piridil)-5-propoxypyr-olo[3,2-b] piridina, CP-94,253 - 0,56 e 1 µg) na concha do NAcc, nas variáveis espaço-temporais e etológicas dos ratos privados de alimentos por 24h durante 5 minutos de exposição ao LCE..... 59

Tabela 10. Efeitos das injeções de salina ou agonista do receptor 5-HT_{1B} (CP-94,253 0,56 e 1µg) na concha do NAcc, dos ratos privados de alimentos por 24h, na duração dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos avaliados durante 30 minutos de registro do comportamento ingestivo..... 60

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-CT** - Maleato carboxamidotryptamina
5-HT - 5-hidroxitriptamina – Serotonina
8-OH-DPAT - 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina
% TA - Porcentagem do tempo (em segundos) de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado
% EA - Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado
Ac. Asc - ácido ascórbico
AL - Auto-limpeza
AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
AR - Avaliação de risco
ANOVA - Análise de variância
CART - Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
CEUA - Comitê de Ética para o uso de animais
CNQX - 6- Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CP-80,9101 - (2-(3-clorobenziloxi)-6-(piperazin-1-il) pirazina,
CP-94,253 - (3-(1,2,5,6-tetra-hidro-4-piridil)-5-propoxypyr-rol[3,2-b]piridina)
EF - Número de entrada nos braços fechados do labirinto em cruz elevado
EPM - Erro padrão da média
EV - Exploração vertical
EXALI - Exploração do alimento
GABA - Ácido gama-aminobutírico
GLP-1 - Peptideo semelhante ao glucagon-1
GLU - Glutamato
i.c.v. - intracerebroventricular
i.p - intraperitoneal
IC – Imersão da cabeça no labirinto em cruz elevado
IM – Imobilidade
LCE - Labirinto em cruz elevado
LOC – Locomoção

MCH - Hormônio concentrador de melanina

NAcc - Núcleo accumbens

POMC - Pro-opiomelanocortina

TE - Número total de entradas efetuadas no labirinto em cruz elevado

WAY 100635 - Maleato de ciclo hexano carboxamida n-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-n-(2-piridinil)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Núcleo Accumbens: aspectos gerais e sub-regiões	23
1.2 Relação entre comportamento defensivo e ingestivo	26
1.3 Receptores GABA no NAcc	26
1.4 Receptores 5-HT no NAcc	27
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Animais.....	32
3.2 Procedimentos cirúrgicos.....	32
3.3 Soluções e drogas injetadas.....	34
3.3.1 Experimento I: agonista e antagonistas de receptores GABA _A e GABA _B	34
3.3.2 Experimento II: agonistas de receptores 5-HT _{1A} , 5-HT _{2C} e 5-HT _{1B}	35
3.4 Injeções intra-cerebrais	35
3.5 Registro dos comportamentos defensivos no LCE.....	36
3.6 Registro dos comportamentos ingestivos e não ingestivos.....	37
3.7 Procedimentos Experimentais.....	39
3.8 Perfusão e Histologia.....	40
3.9 Análise estatística.....	41
4. RESULTADOS	42
4.1 Injeções de agonistas e antagonistas de receptores GABA	42
4.1.1 Efeitos das diferentes doses de agonistas e antagonistas de receptores GABA _A ou GABA _B injetados na concha do NAcc sobre os comportamentos defensivos	42
4.1.2 Efeitos das diferentes doses de agonistas e antagonistas de receptores GABA _A ou GABA _B injetados na concha do NAcc sobre o comportamentos ingestivos e não-ingestivos	44
4.2 Injeções de agonistas de receptores 5-HT.....	50
4.2.1 Efeitos das diferentes doses de agonista do receptor 5-HT _{1A} injetado na concha do NAcc sobre os comportamentos defensivos.....	51

4.2.2	Efeitos das diferentes doses de agonista do receptor 5-HT _{1A} injetado na concha do NAcc sobre o comportamentos ingestivos e não-ingestivos.....	51
4.2.3	Efeitos das diferentes doses de agonista do receptor 5-HT _{2C} injetado na concha do NAcc sobre os comportamentos defensivos	51
4.2.4	Efeitos das diferentes doses de agonista do receptor 5-HT _{2C} injetado na concha do NAcc sobre os comportamentos ingestivos e não-ingestivos	52
4.2.5	Efeitos das diferentes doses de agonista do receptor 5-HT _{1B} injetado na concha do NAcc sobre os comportamentos defensivos	52
4.2.6	Efeitos das diferentes doses de agonista do receptor 5-HT _{1B} injetado na concha do NAcc sobre os comportamentos ingestivos e não-ingestivos	52
5.	DISCUSSÃO	62
5.1	Agonistas e antagonistas de receptores GABA _A ou GABA _B : comportamento defensivo	62
5.2	Agonistas e antagonistas de receptores GABA _A ou GABA _B : comportamento ingestivo e não-ingestivo	64
5.3	Agonista do receptor 5-HT _{1A}	65
5.4	Agonista do receptor 5-HT _{2C}	67
5.5	Agonista do receptor 5-HT _{1B}	68
6.	CONCLUSÕES	70
7.	REFERÊNCIAS	71
8.	ANEXOS	89
8.1	Artigo publicado.....	89
8.2	Artigo submetido	90
8.3	Artigo como co-autor	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. Núcleo Accumbens: aspectos gerais e sub-regiões

O núcleo accumbens (NAcc) está localizado na região do estriado ventro-medial (Maldonado-Irizarry et al., 1995). O estriado ventral é composto pelo accumbens, pelos elementos estriatais do tubérculo olfatório localizados na lâmina II e pela parte ventro-medial do caudado e putâmen (Heimer et al., 1991).

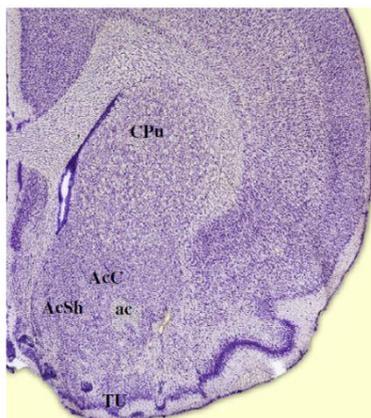


Figura 1. Fotomicrografia de um corte transverso do telencéfalo rostral corado com a técnica de Nissl, ilustrando o estriado. Cpu: caudado-putâmen; TU: tubérculo olfatório; ac: comissura anterior; AcC: centro do accumbens; AcSh: concha do accumbens. Adaptado de Paxinos e Watson, 2007.

O NAcc recebe conexões tanto a partir de estruturas límbicas, que são críticas para o processamento afetivo, bem como a partir de estruturas neurais que coordenam desempenho motor (Mogenson et al., 1980). Através dessas conexões, o NAcc pode desempenhar um papel relevante na regulação da emoção, motivação e cognição (Kelley, 2004), além de estar envolvido em processos comportamentais, como atividades motoras (Gargiulo, 1996), controle alimentar (Maldonado-Irizarry et al., 1995; Stratford et al., 1997), funções cognitivas (Usiello et al., 1998), aprendizagem emocional, particularmente sobre eventos aversivos (Schwienbacher et al., 2004) e também uso e abuso de drogas (Carlezon e Wise, 1996; Di Chiara, 1998; Pontieri et al., 1995; Tanda et

al., 1997). O NAcc não é uniforme e pode ser anatomicamente (Heimer et al., 1991) e funcionalmente (Cadoni e Di Chiara, 2000; Pontieri et al., 1995) subdividido em centro (em inglês, “core”) e concha (em inglês, “shell”). Essa distinção foi estabelecida originalmente com base na reação histoquímica para acetilcolinesterase e na imunoreatividade para colicistocina, sendo a concha mais intensamente reativa do que o centro para estes compostos (Zaborszky et al., 1985). Atualmente vários outros atributos neuroquímicos (por exemplo, neurotensina, calbindina, e substância P) permitem diferenciar o centro da concha (Deutch et al., 1993; Heimer et al., 1995). O centro inclui a área em torno da comissura anterior e a concha é a região que se estende medial, ventral e lateralmente em torno do centro (David et al., 1998; Heimer et al., 1995; Jones et al., 1996; Kelley e Berridge, 2002; Zahm e Heimer, 1993).

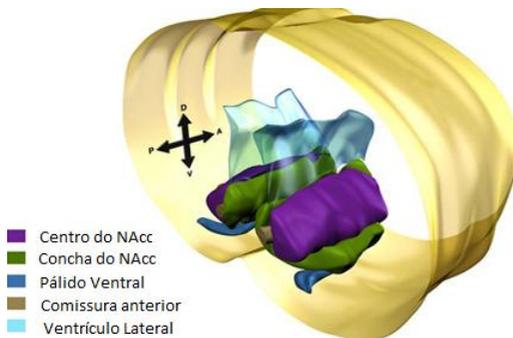


Figura 2. Estruturas da região do estriado ventral, representada em três dimensões. Adaptado de Basar et al. 2010.

O centro do NAcc recebe aferências de regiões dorsais do córtex medial pré-frontal, incluindo áreas pré-límbicas e área cingulada anterior (Basar et al., 2010), possuindo conexões bem estabelecidas com estruturas dos núcleos basais, incluindo o núcleo subtalâmico, o globo pálido e a substância negra. A concha está intimamente associada com o sistema límbico e interconectada com estruturas como o pálido ventral, área tegmental ventral, hipotálamo lateral, núcleo leito da estria terminal e substância cinzenta periaquedutal (Delfs et al., 1998). Portanto, enquanto o centro participa de circuitos envolvidos na aprendizagem de controle e execução das ações, a concha processa informações sobre as características afetiva e contextual de novas experiências de aprendizagem (Brog et al., 1993; French e Totterdell, 2003;

Groenewegen et al., 1987; Meredith et al., 1990; Mogenson et al., 1980; Petrovich et al., 1996; Wang et al., 1992). Além disso, a região da concha também está envolvida no controle da ingestão de alimentos (Kelley, 2004; Pratt et al., 2009; Shelly et al., 2010; Stratford, 2007; Stratford e Wirtshafter, 2012; Voorn et al., 2004; Zahm, 2000; Zahm e Brog, 1992; Zahm e Heimer, 1993) e nas respostas comportamentais defensivas eliciadas por estímulos nocivos ou ameaçadores (Beck e Fibiger, 1995; Berridge et al., 1999; Gray, 1995; Liberzon et al., 1999; Lowe et al., 2007; Reynolds e Berridge, 2001; Richard e Berridge, 2011; Roitman et al., 2005; Wheeler et al., 2008).

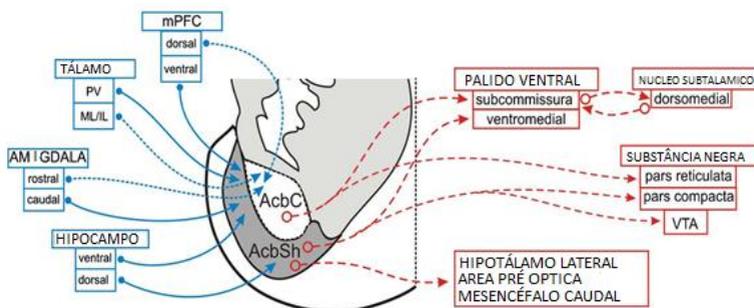


Figura 3. Aferências e eferências do centro e da concha do NAcc. Adaptado de Basar et al., 2010

Os comportamentos ingestivos e defensivos (relacionados à ansiedade) são gerados em diferentes localizações anatômicas ao longo da região rostro-caudal na concha do NAcc. Embora as regiões rostrais produzam aumento intenso do comportamento alimentar, as regiões mais caudais do NAcc podem gerar comportamentos defensivos (Reynolds e Berridge, 2001,2003; Richard e Berridge, 2011).

O controle do comportamento ingestivo na concha do NAcc incluem vários sistemas de neurotransmissores, tais como o glutamato (GLU) (Kelley e Swanson, 1997; Maldonado-Irizarry et al., 1995), o ácido gama-aminobutírico (GABA) (Basso e Kelley, 1999; Kandov et al., 2006; Lopes et al., 2007; Lopes et al., 2012; Stratford e Kelley, 1997), os opiáceos (Hanlon et al., 2004), a serotonina (5-HT) (Jean et al., 2007; Pratt et al., 2009; Pratt et al., 2012), a dopamina (Wirtshafter e Stratford, 2010) e os neuropeptídeos, tais como nociceptina, transcrito

regulado pela cocaína e anfetamina (CART), hormônio concentrador de melanina (MCH), a orexina, os opióides, a amilina e o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) (Alhadeff et al., 2012; Dickson et al., 2012). Além disso, diversos sistemas de neurotransmissores, como glutamato, dopamina, opióides e acetilcolina na concha do NAcc também mostraram ser cruciais para o controle de processos motivacionais e a aprendizagem de respostas para obter recompensa do alimento (Berridge, 2007; Kelley et al., 2003 ; Kelley et al., 2005; Salamone e Correa, 2002).

1.2. Relação entre comportamento defensivo e ingestivo

A fim de caracterizar a relação entre o comportamento defensivo e a ingestão de alimento, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a ativação de ambos os receptores GABA_A e GABA_B na concha do NAcc diminuiu comportamentos defensivos e aumentou o consumo de alimentos em animais com alimentação livre, sem uma correlação positiva entre esses comportamentos (Lopes et al., 2007). Por outro lado, a injeção de 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), um antagonista do receptor de glutamato do tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA), na concha do NAcc não alterou a ingestão de alimentos, mas reduziu os comportamentos defensivos, induzindo um efeito ansiolítico em animais com alimentação livre (Cunha et al., 2008a,b). Estudos sobre circuitos adrenérgicos na concha do NAcc indicam que a injeção de clonidina, um agonista α 2-adrenoceptores, induziu a um efeito ansiolítico semelhante, sem modificar o comportamento ingestivo. Em contraste, a fenilefrina, agonista α 1-adrenoceptores, não alterou o comportamento defensivo e ingestivo em animais com alimentação livre (Kochenberger et al., 2012). Coletivamente, esses dados revelam que os circuitos gabaérgicos, glutamatérgicos e adrenérgicos, na concha do NAcc, controlam o consumo de alimentos separadamente do comportamento defensivo.

1.3. Receptores GABA no NAcc

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, localizado em muitas células neuronais, incluindo interneurônios e células glia. Pode ativar dois tipos de receptores, os ionotrópicos (GABA_A e GABA_C), que estão ligados aos canais iônicos

de cloreto, com sítios de ligação para benzodiazepínicos, barbitúricos e neuroesteróides; e os receptores metabotrópicos (GABA_B), que estão acoplados à proteína G (Bormann, 2000; Bowerly et al., 2002; Chebib e Johnston, 1999). O GABA tem um papel importante nas disfunções de ansiedade e pode ser considerado um elemento chave na regulação central de funções somáticas e mentais (Möhler, 2006), além de auxiliar na regulação do comportamento emocional (McDonald et al., 2004). Estudos de Reynolds e Berridge (2001) mostram que o neurotransmissor GABA participa de circuitos no NAcc para motivação positiva, que representa comportamento ingestivo e de recompensa, e também para motivação negativa, que caracteriza-se como comportamentos aversivos e defensivos.

A estimulação dos receptores GABA_A e GABA_B, bem como o bloqueio do receptor glutamatérgico do tipo AMPA, na concha do NAcc causa um aumento da ingestão de alimentos em ratos com alimentação livre (Kelley e Swanson, 1997; Maldonado-Irizarry et al., 1995; Stratford e Kelley, 1997). Além disso, os antagonistas de receptores gabaérgicos administrados na concha do NAcc provocam a diminuição da ingestão de alimentos em ratos privados de alimentos por 24 horas (Kandov et al., 2006). Embora, tradicionalmente, a concha do NAcc não tenha sido considerada uma região envolvida na regulação da ansiedade, há uma evidência substancial da implicação dessa região com comportamentos defensivos (Avena et al., 2008; Martínez et al., 2002; Pliakas et al., 2001; Reynolds e Berridge, 2001, 2003; Sturm et al., 2003). O efeito ansiolítico causado por ativação de receptores GABA_A (Crestani et al., 2002; Kash et al., 1999; Rudolph et al., 2001; Sasaki et al., 2002; Stork et al., 2003) e GABA_B (Cryan et al., 2004; Cryan e Kaupmann, 2005; Dalvi e Rodgers, 1996; Jacobson et al., 2007; Mombereau et al., 2004a, 2004b) tem sido amplamente descritos.

1.4. Receptores 5-HT no NAcc

A inervação serotoninérgica do NAcc origina-se no núcleo dorsal da rafe (Lukkes et al., 2008). Estudos sugerem que a 5-HT participa dos circuitos do NAcc no comportamento ingestivo e de recompensa, bem como nos comportamentos aversivos e de medo (Barot et al., 2007; Inoue et al., 2004; Jean et al., 2007; Pratt et al., 2009). A 5-HT tem um papel inibitório na modulação da ingestão de alimento (Blundell, 1986; Halford et al., 1998; Leibowitz e Alexander, 1988; Simansky, 1996). Tem-se demonstrado em mamíferos que a redução da neurotransmissão

serotonérgica estimula a ingestão de alimentos, enquanto que o aumento na liberação central de 5-HT induz hipofagia (Blundell, 1986; Simansky, 1996). O efeito hipofágico dos agonistas de receptores serotonérgicos parece ser mediado por diversos subtipos de receptores pós-sinápticos localizados em circuitos hipotalâmicos (Bovetto e Richard, 1995). Os agonistas seletivos que ativam os subtipos de receptores 5-HT_{2C} reduzem a alimentação em ratos, quando injetados no núcleo paraventricular do hipotálamo (Lopez-Alonso et al., 2007). Na literatura, foi descrito que ativação de receptores 5-HT_{1B} (Kennett e Curzon, 1988; Lee e Simansky, 1997) reduz a ingestão alimentar quando administrado via i.p. em ratos em jejum. A ativação de receptores 5-HT_{1B} ou 5-HT_{2C} também reduz a ingestão alimentar quando administrado via i.c.v e/ou i.p em ratos saciados (De Vry e Schreiber, 2000). Por outro lado, a ativação de receptores 5-HT_{1A} pode causar hiperfagia em ratos saciados (Coscina et al., 1994; Currie e Coscina, 1993; Dourish et al., 1985, 1988; Ebenezer, 1992; Gilbert e Dourish, 1987; Parker e Coscina, 2001) ou redução na ingestão de alimento com ratos em jejum (Arkle e Ebenezer, 2000; Coscina et al., 2000; Ebenezer, 1992; Ebenezer e Tite, 2003; Ebenezer et al., 2007; López-Alonso et al., 2007).

Evidências substanciais indicam que as manipulações farmacológicas de vias neurais de serotonina afetam os comportamentos ingestivos (Blundell, 1986; Garfield e Heisler, 2009; Halford et al, 2005; Leibowitz e Alexander, 1998; Simansky, 1996; Vickers e Dourish, 2004;). Os modelos experimentais sugerem que a sinalização da 5-HT desempenha um papel inibitório na regulação da ingestão de alimentos e do balanço de energia, uma vez que a depleção central de 5-HT resultou em hiperfagia e ganho de peso (Breisch et al., 1976; Saller e Stricker, 1976). Apesar da presença de receptores de serotonina no NAcc (Bendotti e Samarin., 1986; Bruinvels et al., 1994), o papel destes receptores no comportamento ingestivo nesse núcleo começou a ser investigado apenas recentemente. Esses estudos revelaram que a administração de agonista do receptor 5-HT₄ no NAcc reduziu a ingestão de alimentos em ambos os ratos alimentados e privados de alimentos (Jean et al., 2007). Além disso, a injeção do agonista do receptor 5-HT_{1/7} no NAcc reduziu ingestão de alimentos em ratos privados de alimento que receberam 2 h com livre acesso à ração de laboratório (durante o experimento), bem como em ratos privados que receberam 2 h de acesso a uma dieta altamente palatável. Em contraste, a estimulação do receptor 5-HT₆ provocou um aumento na ingestão de

alimentos em ambas as condições de alimentação. A ativação do receptor 5-HT_{2C} não teve nenhum efeito sobre o consumo de ração em ratos privados e diminuiu modestamente a ingestão da dieta de gordura em animais saciados (Pratt et al., 2009).

O papel da 5-HT no comportamento defensivo é complexo e pode ser dependente da neurotransmissão de 5-HT em várias regiões do encéfalo, os tipos de paradigmas comportamentais utilizados para avaliar a ansiedade, bem como os contextos emocionais e cognitivos dos testes (Handley et al., 1993). O duplo papel da 5-HT na hipótese de defesa assume que a 5-HT facilita as respostas de defesa à ameaça potencial, como esquiva inibitória, que está relacionado à ansiedade, ao passo que inibe respostas defensivas ao perigo proximal, como um caminho de fuga, relacionada ao pânico. Esta ação seria exercida na parte frontal do cérebro, principalmente no córtex pré-frontal medial e na amígdala, enquanto a última seria exercida na substância cinzenta periaquedutal dorsal do mesencéfalo (Graeff e Zangrossi, 2010). O receptor 5-HT_{1A} tem sido implicado na patogênese e no tratamento de distúrbios de ansiedade e depressão. Esses receptores funcionam como ambos os receptores pré-sinápticos (auto receptor) e pós-sinápticos em regiões específicas do cérebro, tais como as áreas límbicas, septal e núcleos da rafe (Ohno, 2010). Tem-se relatado que a ativação de auto receptores pré-sinápticos 5-HT_{1A} localizados no núcleo mediano da rafe (NMR) diminui o comportamento defensivo em ratos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE) (Andrade e Graeff, 2001; Canto-de-Souza et al., 2002; File et al., 1979; Neto et al., 2002), enquanto esse efeito ansiolítico é antagonizado pela infusão do antagonista do receptor 5-HT_{1A}, WAY 100.635 (File et al., 1979). Além disso, a injeção de 8-OH-DPAT no hipocampo dorsal evoca um efeito ansiogênico (Dos Santos et al., 2008; Neto et al., 2002; Nunes-de-Souza et al., 1999; Nunes-de-Souza et al., 2000). Os estudos de Lin e Parsons (2002) indicaram que a estimulação periférica dos receptores 5-HT_{1B} aumenta o comportamento defensivo dos ratos testados no LCE, sugerindo que a estimulação desses receptores produz efeitos ansiogênicos semelhantes. Em estudo recente (Solati et al., 2011), a injeção de agonista do receptor 5HT_{1B}, CGS 12066A, no córtex pré-frontal medial mostrou uma diminuição na porcentagem de exploração dos braços abertos e porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE, indicando também um efeito ansiogênico, sem qualquer alteração na atividade locomotora, sugerindo que os receptores 5-HT_{1B} de córtex pré-frontal medial

também modulam comportamentos ansiogênicos em ratos. Além disso, o estresse crônico social aumentou a expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) no receptor 5-HT_{1B} na região caudal da concha do NAcc (Furay et al., 2011). A injeção de mCPP, um agonista do receptor 5HT_{2B/2C}, no complexo da amígdala aumentou os índices de comportamento defensivo, sem alterar significativamente os níveis de atividade geral (Cornélio e Nunes-de-Souza, 2007). Esse efeito ansiogênico de mCPP foi seletivamente e completamente bloqueado por injeção local de uma dose de SDZ SER-082, um antagonista preferencial do receptor 5-HT_{2C}, sugerindo que o envolvimento desses receptores localizados no complexo amigdalóide desempenhem um papel facilitatório, no LCE, no controle do comportamento defensivo (Cornélio e Nunes-de-Souza, 2007).

Enquanto os dados da literatura revelam que os circuitos serotoninérgicos da amígdala e o córtex pré-frontal medial participam no controle do comportamento defensivo, há uma escassez de conhecimento sobre circuitos serotoninérgicos nessa região do NAcc no controle do comportamento emocional. A fim de determinar o papel funcional dos receptores gabaérgicos e serotoninérgicos, e estabelecer uma correlação positiva entre comportamento emocional e o ingestivo, o presente estudo avaliou o efeito das injeções de agonistas e antagonistas de receptores GABA_A e GABA_B, além de agonistas de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B} na concha do NAcc sobre os comportamentos defensivos de ratos testados no LCE, seguido pela avaliação do comportamento ingestivo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de injeções de agonistas e antagonistas de receptores GABA_A e GABA_B e de agonistas de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B}, na concha do NAcc sobre comportamentos defensivos (relacionados à ansiedade) e ingestivos em ratos privados, além de investigar uma possível relação entre esses comportamentos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do agonista de receptores GABA_A (Muscimol) e GABA_B (Baclofen), na concha do NAcc, sobre comportamentos defensivos no labirinto em cruz elevado, e comportamentos ingestivos e não-ingestivos na caixa de registro comportamental.
- Avaliar os efeitos do antagonista de receptores GABA_A (Bicuculina) e GABA_B (Saclofen), na concha do NAcc, sobre os comportamentos supracitados.
- Avaliar os efeitos do agonista de receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT), 5-HT_{2C} (CP-80,9101) e 5-HT_{1B} (CP-94,253), na concha do NAcc, sobre os comportamentos supracitados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e o protocolo de experimentação foi submetido à apreciação do Comitê de Ética ao Uso de Animais (CEUA) da UFSC e está aprovado sob o número PP00283.

3.1. Animais

Foram utilizados 140 ratos da linhagem Wistar adultos (*Rattus norvegicus*), machos, com massa corporal entre 260-290g, e dois meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram alojados em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm), forradas com maravalha, contendo cinco ratos em cada caixa e dispoendo de água e alimento granulado (CR-1 Nuvilab - Nuvital Nutrientes, Brasil) *ad libitum*. Os mesmos foram submetidos a sete dias de adaptação ao novo ambiente, em uma sala com temperatura controlada entre $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12 horas (claro das 7 - 19h) e manipulados nesse período somente durante a limpeza das caixas, três vezes por semana.

3.2. Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (13 mg/Kg) e cetamina (87 mg/Kg), ambas do laboratório König S.A, injetadas por via intraperitoneal (i.p.). Em seguida, os animais foram adaptados ao aparelho estereotáxico (Figura 4), tendo a cabeça fixada por intermédio de barras posicionadas no conduto auditivo e na presilha dental. Após a tricotomia na região, uma incisão longitudinal foi realizada no escalpo expondo a calota craniana. O periósteo foi removido e a região exposta do crânio foi limpa com água oxigenada (10 vol.) e seca com algodão cirúrgico, com o objetivo de garantir adesão do acrílico. Com o auxílio de uma broca ortodôntica (n° 6), foi feito um orifício na calota craniana e colocados dois parafusos (do tipo relojoeiro) para fixação do acrílico auto-polimerizável. A seguir, foi marcada a posição para a perfuração e implantação das cânulas-guia (33 G), confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas com 18 mm de comprimento cada, sendo posicionadas 2 mm acima da região da concha do NAcc, bilateralmente. As coordenadas usadas, de acordo com

Paxinos e Watson (2007), foram: AP (ântero-posterior), 1,5 mm anterior ao Bregma; L (lateral), 1,0 mm para cada lado da sutura sagital; DV (dorso-ventral), 5,6 mm abaixo da calota (Figura 5). As cânulas-guia foram envolvidas parcialmente poracrílico auto-polimerizável para fixação na calota craniana, formando uma estrutura sólida capaz de resistir aos eventuais choques mecânicos com a caixa e a grade de proteção. A fim de evitar obstrução das cânulas-guia, foi colocado um mandril de aço inoxidável em cada uma, tendo sua extremidade externa fixada aoacrílico. No término do procedimento cirúrgico, os animais foram alojados individualmente nas caixas de polipropileno e mantidos em local aquecido até a recuperação da anestesia e, posteriormente, levados para o biotério do laboratório. Neste local permaneceram sob temperatura e luminosidade controladas, com água e ração *ad libitum*, recebendo acompanhamento diário durante sete dias e manipulados somente durante a limpeza das caixas. Após esse período, os ratos foram agudamente privados de alimentos por 24 horas e os experimentos no labirinto em cruz elevado (LCE) e na caixa de registro dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos foram iniciados.



Figura 4. Fotografia do aparelho estereotáxico (UFSC).

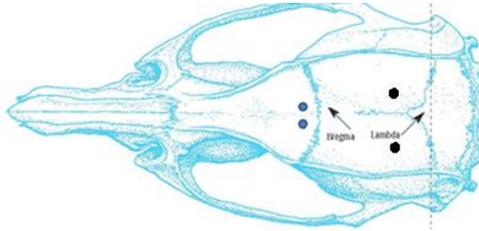


Figura 5. Local aproximado dos orifícios feitos para atingir bilateralmente a concha do NAcc (Retirado do Paxinos e Watson, 2007).

3.3. Soluções e drogas injetadas

Para um cada dos procedimentos experimentais, foram utilizados os tratamentos a seguir.

3.3.1. Experimento I: agonistas e antagonistas de receptores GABA_A e GABA_B.

Nesse experimento, as doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios do laboratório sobre os efeitos da injeção central dos agonistas de receptores GABA_A (Muscimol) e GABA_B (Baclofen), antagonistas de receptores GABA_A (Bicuculina) e GABA_B (Saclofen) efetivas em influenciar seletivamente os comportamentos relacionados a ansiedade e, também, os comportamentos ingestivos e não-ingestivos em ratos. Todos os agentes farmacológicos foram adquiridos da Aldrich Chemical Company-Sigma (St. Louis, EUA) e dissolvidos em solução salina estéril 0,9%.

- Veículo (SAL): solução de cloreto de sódio 0,9%, estéril, livre de pirógenos e volume de 0,2 µl.
- Muscimol (MUS): agonista do receptor GABA_A, nas doses de 25 e 50 ng/lado, o equivalente a 128 e 256 pmol utilizado em nosso estudo anterior (Lopes et al., 2007).
- Baclofen (BAC): agonista do receptor GABA_B, nas doses de 32 e 64 ng/lado, o equivalente a 128 e 256 pmol utilizado em nosso estudo anterior (Lopes et al., 2007).
- Bicuculina (BIC): antagonista do receptor GABA_A, nas doses de 75 e 150 ng/ lado, derivadas de estudos de comportamento (Kandov et al.,2006).

- Saclofen (SAC): antagonista do receptor GABA_B, nas doses de 1,5 e 3,0 ug/lado, derivadas de estudos de comportamento (Kandov et al.,2006).

3.3.2. Experimento II: agonistas de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B}

Nesse experimento, as doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios sobre efeitos das injeções centrais de agonistas de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B} efetivas em influenciar seletivamente os comportamentos relacionados à ansiedade e, também, os comportamentos ingestivos e não-ingestivos em ratos. Todos esses agentes farmacológicos foram adquiridos da Sigma Chemical Co., (St. Louis, EUA); Tocris House, IO Centre (Bistol, UK); e Tocris House, Hung Road (Bristol, UK) respectivamente. Para diluição do agonista do receptor 5-HT_{1A}, foi utilizada uma solução de ácido ascórbico 5% estéril, livre de pirógenos, pH 7,4 e, para os agonistas de receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B}, uma solução de cloreto de sódio a 0,9%.

- Veículo (Ac. Asc): solução de ácido ascórbico 5%, estéril, livre de pirógenos e volume de 0,2 µl, controle para o grupo 8-OH-DPAT.
- 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina (8-OH-DPAT): nas doses de 0,6 e 6nmol/lado, derivadas de estudos de comportamento (Steffens et al., 2008).
- Veículo (SAL): solução de cloreto de sódio 0,9%, estéril, livre de pirógenos e volume de 0,2 µl, controle para o grupo CP-80,9101.
- 2-(3-clorobenziloxi)-6-(piperazin-1-il)pirazina (CP-80,9101): nas doses de 0,75 e 1,5 µg/lado (Pratt et al., 2009).
- Veículo (SAL): solução de cloreto de sódio 0,9%, estéril, livre de pirógenos e volume de 0,2 µl, controle para o grupo CP-94,253.
- 3-(1,2,5,6-tetra-hidro-4-piridil)-5-propoxyppyrol[3,2-b]piridina (CP-94,253): nas doses de 0,56 e 1,0 µg/lado (Solati et al., 2011).

3.4. Injeções intracerebrais

A injeção intracerebral do veículo e das drogas foi realizada por meio de uma agulha injetora (33 G), excedendo 2 mm o comprimento da

cânula-guia e conectada por um tubo de polietileno a uma seringa Hamilton (capacidade de 1µl). A agulha injetora foi introduzida na cânula-guia para as injeções intracerebrais. Com o objetivo de minimizar variações na pressão intracerebral, as soluções foram injetadas durante 2 min, com volume de 0,2 µl para qualquer condição de tratamento.

3.5. Registro dos comportamentos defensivos no LCE

O LCE (Figura 6) é constituído por duas passarelas de madeira dispostas perpendicularmente, formando uma cruz simétrica. Cada um dos quatro braços possui 50 cm de comprimento por 10 cm de largura. Dois braços opostos são fechados por paredes laterais de vidro fumê de 40 cm de altura, enquanto os outros dois braços são abertos, circundados por uma pequena borda de acrílico (1 cm) para reduzir a ocorrência de quedas. Na junção entre os quatro braços delimita-se uma área central de 10 cm². O labirinto como um todo é elevado a 50 cm do solo. Quatro lâmpadas fluorescentes (15 W cada), dispostas igualmente em forma de cruz a 100 cm acima do labirinto, foram utilizadas como fonte de iluminação do experimento. Essas lâmpadas forneceram diferentes médias de luminosidade incidentes nos braços abertos (373 Lux) e fechados (284 Lux), obtendo o gradiente de luminosidade de 89 Lux entre os braços abertos e fechados do labirinto (Sakae et al., 2008).

Para cada experimento, o animal foi colocado no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços fechados, deixando-o explorar o LCE durante um período de 5 minutos (min). Após cada exposição ao LCE, o mesmo foi limpo com tecido umedecido em uma solução de álcool 20% para evitar pistas odoríferas. A eventual queda de um rato do labirinto implicou necessariamente em sua exclusão do estudo. Os comportamentos foram filmados por meio de uma câmera e analisados posteriormente com o Programa Etholog 2.25 (Ottoni, 2000).

A análise comportamental foi realizada considerando-se as variáveis espaço-temporais tradicionais (Pellow et al., 1985): número de entradas nos braços abertos (EA), número de entradas nos braços fechados (EF), total de entradas (TE), porcentagem de entradas nos braços abertos (% EA) e porcentagem do tempo (em segundos) de permanência nos braços abertos (% TA). Para o cálculo das porcentagens (% EA e % TA) utilizou-se a regra de três simples: % EA = total de EA x 100 ÷ pelo total de entradas (TE = EA + EF); % TA = TA x 100 ÷ por 300 segundos (total de segundos em 5 minutos).

Além da análise espaço-temporal, foi realizada a análise etológica envolvendo a avaliação da frequência dos comportamentos a seguir:

- Avaliação de risco (AR): Movimento no qual o animal investiga em sua volta com as patas traseiras fixas e as dianteiras se movem e retornam à posição original, com a cabeça observando ao redor (Setem et al., 1999). Nesse estudo, a AR foi identificada pelo movimento chamado *stretched attend posture* (SAP). O SAP é um tipo de AR em que o animal alonga seu corpo ao mover as patas dianteiras (Rodgers et al., 1995).
- Imersão da cabeça (IC): Movimento de projeção da cabeça para fora e para baixo dos braços abertos (Setem et al., 1999).
- Exploração vertical (EV): Quando o animal estiver explorando o ambiente e elevar o corpo, estando apoiado somente nas patas traseiras (Setem et al., 1999).
- Auto-limpeza (AL): Ato de limpar qualquer parte da superfície corporal com a língua, dentes e/ou patas dianteiras (Setem et al., 1999).



Figura 6. Fotografia do labirinto em cruz elevado (UFSC)

3.6. Registro dos Comportamentos Ingestivos e Não-ingestivos

A caixa de registro dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos (Figura 7) é constituída por vidro transparente de 4 mm de espessura, possuindo as medidas do comprimento e da largura iguais aos da caixa de hospedagem (49 x 34 cm) e a medida da altura maior (40 cm) para evitar fugas. A parte traseira e paredes laterais, bem como o piso são revestidas com plástico adesivo preto. A fim de facilitar a gravação de comportamento, a parede da frente da caixa possui um

espelho com as mesmas dimensões dispostas em um ângulo de 45° em relação ao plano vertical. Esta disposição também impede que o animal visualize sua imagem refletida no espelho.

Cada registro do comportamento ingestivo teve a duração de 30 minutos, sendo que a caixa foi limpa ao final com tecido umedecido em uma solução de álcool 20% para evitar pistas odoríferas. Ao longo do procedimento experimental, os comportamentos ingestivos e não-ingestivos foram filmados por uma câmera perpendicularmente localizada a 60 cm acima do assoalho da caixa, para análise detalhada posterior, através software Etholog 2.25 (Ottoni, 2000).

Na caixa de registro alimentar foram analisados comportamentos ingestivos e não-ingestivos. Os comportamentos ingestivos observados foram a ingestão de alimento e a ingestão de água. Estes comportamentos foram avaliados quanto à:

- Quantidade: Mensurada quanto à diferença entre a quantidade de ração (g) ingerida entre o início e o término do registro (30 min).
- Latência: Tempo, em segundos (s), para iniciar a ingestão de alimento.
- Duração: Tempo de duração, em segundos (s), da ingestão de alimento.

Os comportamentos não-ingestivos listados a seguir foram analisados, quanto à duração (s) na caixa de registro alimentar e estão definidos no item 3.5:

- Exploração do alimento (EXALI): É quando o animal cheira ou manipula a ração, sem ingeri-la (Halford et al.,1998).
- Imobilidade (IM): É quando o animal permanece imóvel, em postura de relaxamento, com a cabeça curvada ao corpo ou apoiada na caixa, sem apresentar qualquer outro comportamento já citado (Halford et al.,1998).
- Locomoção (LOC): É o ato de se deslocar, deambular pela caixa experimental (Halford et al.,1998).



Figura 7. Fotografia da caixa de registro de comportamento ingestivos e não-ingestivos (UFSC)

3.7. Procedimentos Experimentais

O início dos procedimentos experimentais ocorreu com a chegada dos animais provenientes do biotério da UFSC ao nosso laboratório, local em que foram alojados em caixas apropriadas (item 3.1). Após sete dias de adaptação e cuidados, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação das cânulas-guias na concha do NAcc bilateralmente (item 3.2). Decorrido o período de recuperação cirúrgica (item 3.2), cada animal foi privado agudamente de ingesta alimentar (por 24h), mas continuou a ter acesso livre à água. No dia seguinte a essa privação alimentar, os animais receberam injeções locais (item 3.4) de veículo ou drogas (item 3.3). Em seguida à injeção, foram submetidos durante 5 min aos experimentos no LCE (item 3.5) e, imediatamente depois do registro do comportamento de ansiedade, colocados durante 30 min na caixa de registro dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos (item 3.6). Os experimentos foram realizados entre 11:00 e 15:00 hs. Os animais não foram ambientados aos modelos comportamentais. Foi usado um animal para cada tratamento. Abaixo, está descrito o número de animais em cada grupo experimental.

Experimento I: Foi realizado para avaliar os efeitos das injeções de MUS, BAC, BIC e SAC na concha do NAcc sobre os comportamentos relacionados à ansiedade e também sobre comportamentos ingestivos e não-ingestivos. Durante o experimento, os ratos foram tratados com: **agonista do receptor GABA_A: MUS** nas

doses de 25 ng/lado (n=7) e 50 ng/lado (n=7); **agonista do receptor GABA_B: BAC** nas doses de 32 ng/lado (n=7) e 64 ng/lado (n=6) ou veículo (SAL, n=9); **antagonista do receptor GABA_A: BIC** nas doses de 75 ng/lado (n=7) e 150 ng/lado (n=7); **antagonista do receptor GABA_B: SAC** nas doses de 1,5 µg/lado (n=8) e 3,0 µg/lado (n=8) ou veículo (SAL, n=9).

Experimento II: Foi realizado para avaliar os efeitos das injeções de 8-OH-DPAT, CP-80,9101 e CP-94,253 na concha do NAcc sobre os comportamentos relacionados à ansiedade e também sobre comportamentos ingestivos e não-ingestivos. Durante o experimento, os ratos foram tratados com: **agonista do receptor 5-HT_{1A}: 8-OH-DPAT** nas doses 0,6 nmol (n=7) e 6 nmol (n=7) ou veículo (Ac. Asc, n=7); **agonista do receptor 5-HT_{2C}: CP-80,9101** nas doses 0,75 µg (n=7) e 1,50 µg (n=7) ou veículo (SAL, n=8); **agonista do receptor 5-HT_{1B}: CP-94,253** nas doses 0,56 µg (n=7) e 1,00 µg (n=7) ou veículo (SAL, n=8).

3.8. Perfusão e histologia

Ao término dos experimentos, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e o correto posicionamento das cânulas, foi verificado pela marcação prévia com azul de Evans (injeção de 0,2 µl administrado através da cânula-guia, com auxílio da cânula injetora) para marcar os locais da injeção na região da concha do NAcc. Os animais foram perfundidos transcárdialmente com solução salina 0,9% (100 – 150 ml), seguida de formalina 10%. Depois de dissecados, os cérebros permaneceram imersos em formalina 10% por um período de sete dias, sendo posteriormente cortados de forma seriada em secções de 100 µm de espessura por um vibrátomo. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e deixados até secar, em torno de mais sete dias. Após esse período, foram coradas pelo método de Nissl (método que utiliza o 39 cresil violeta, um corante básico para evidenciar o citoplasma de neurônios) e permaneceram secando por igual período antes de serem analisadas ao microscópio óptico. A reprodução gráfica dos cortes e dos pontos de injeção analisados ao microscópio foi realizada com o auxílio do atlas de Paxinos e Watson (2007). Não foram incluídas nas análises estatísticas os cortes em que a cânula apresentou-se deslocada da região da concha do NAcc.

3.9. Análise estatística

Experimento I: agonistas e antagonistas de receptores GABA_A e GABA_B: Os efeitos do tratamento com salina e dos agonistas de receptores GABA_A, nas doses de 25 e 50 ng/lado, e GABA_B, nas doses de 32 e 64 ng/lado, injetados na concha do NAcc sobre os comportamentos defensivos e comportamentos ingestivos e não-ingestivos, foram analisados separadamente por intermédio da análise de variância (ANOVA) de uma via. Os efeitos dos tratamentos com salina e dos antagonistas de receptores GABA_A, nas doses de 75 e 150 ng/lado, e GABA_B, nas doses de 1,5 e 3,0 µg/lado, injetados na concha do NAcc sobre os comportamentos relacionados à ansiedade e comportamentos ingestivos e não-ingestivos, foram analisados separadamente por meio da ANOVA de uma via. Quando apropriado, as análises de variância foram seguidas pelo teste *post hoc* de Duncan para múltiplas comparações, sendo que o nível alfa foi ajustado por meio da correção de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Somente os valores de probabilidade (*p*) menores do que 0,0125 foram considerados significativos.

Experimento II agonistas de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B}: Os efeitos do tratamento com: ácido ascórbico e agonista do receptor 5-HT_{1A} nas doses de 0,6 e 6 nmol/lado; salina e agonista do receptor 5-HT_{2C} nas doses de 0,75 e 1,50 µg; e salina e agonista do receptor 5-HT_{1B} nas doses de 0,56 e 1 µg injetados na concha do NAcc sobre os comportamentos relacionados à ansiedade e comportamentos ingestivos e não-ingestivos, foram analisados separadamente por intermédio da ANOVA de uma via. Quando apropriado, as análises de variância foram seguidas pelo teste *post hoc* de Duncan para múltiplas comparações. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Somente os valores de probabilidade (*p*) menores do que 0,05 foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1 Injeções de agonistas e antagonistas de receptores GABA

A análise histológica mostrou que 36 pontos de injeção com agonistas de receptores GABA_A, GABA_B ou salina alcançaram corretamente a concha do NAcc bilateralmente. Enquanto 39 pontos de injeção com antagonistas de receptores GABA_A, GABA_B ou salina também alcançaram a mesma região do NAcc (Figura 8).

4.1.1 Efeitos das diferentes doses de agonistas e antagonistas de receptores GABA_A ou GABA_B injetados na concha do NAcc sobre os comportamentos defensivos

A análise de variância de uma via (ANOVA) mostrou que somente a frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco (AR), avaliado no LCE, foi afetada pelo tratamento com os agonistas GABA [F (4,31) = 4,34, p = 0,0066]. A frequência do comportamento de AR diminuiu após a injeção de ambas as doses de agonista do receptor GABA_A (MUS) administrados na concha do NAcc em ratos expostos ao LCE, privados de alimentos por 24h. Resultados semelhantes foram obtidos após o tratamento com ambas as doses de agonista do receptor GABA_B (BAC) na concha do NAcc. As outras variáveis espaço-temporais (EA, EF, TE, % EA e % TA) e etológicas (IC, EV, AL) permaneceram inalteradas após a injeção bilateral de ambos agonistas de receptores GABA_A e GABA_B na concha do NAcc (Tabela 1).

A ANOVA mostrou que as variáveis etológicas (AR, IC, EV e AL) e espaço-temporais (EA, EF, TE, % EA e % TA) permaneceram inalteradas após o tratamento com ambas as doses antagonistas de receptores GABA_A (BIC) e GABA_B (SAC) na concha do NAcc em ratos privados de alimentos por 24h (Tabela 2)

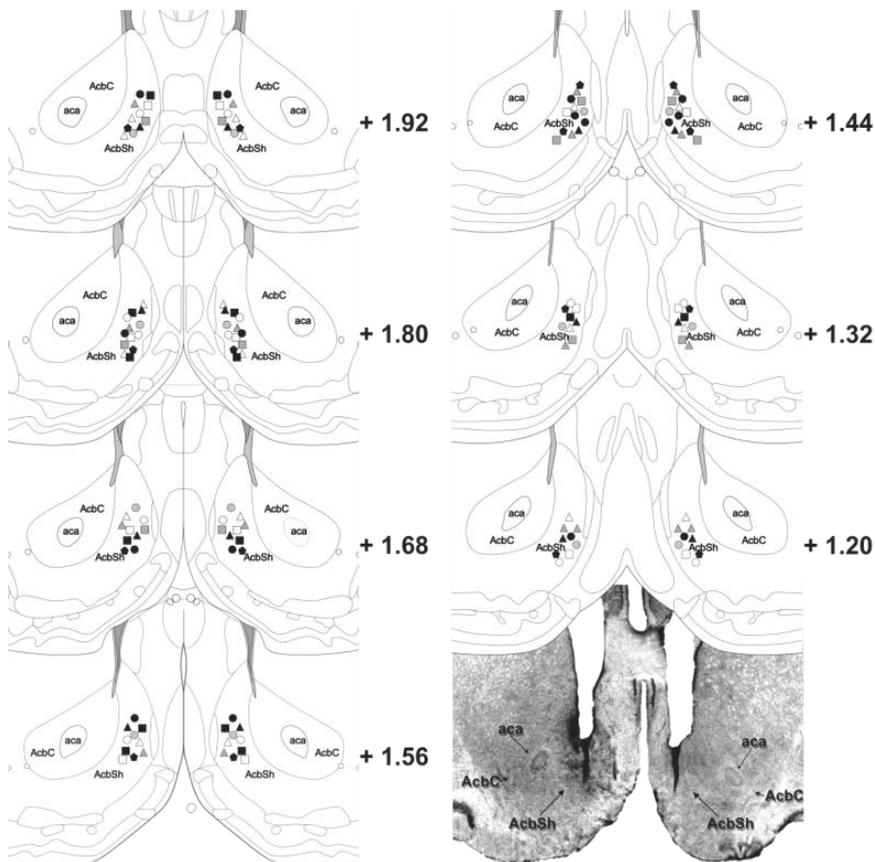


Figura 8. Fotomicrografia (Barra de escala = 100 μ m) e representação esquemática de cortes coronais do cérebro do rato, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007). Os cortes ilustram as distribuições dos locais da injeção bilateral na concha do NAcc. Os 75 ratos receberam injeções: de veículo (Salina, $n = 9$, \triangle), agonista do receptor $GABA_A$ (MUS, 25 ng/lado, $n = 7$, \blacksquare ; 50 ng/lado, $n = 7$, \odot) e agonista do receptor $GABA_B$ (BAC, 32 ng/lado, $n = 7$, \blacktriangle ; 64 ng/lado, $n = 6$, \blacksquare); de veículo (salina $n = 9$, \triangle), antagonista do receptor $GABA_A$ (BIC, 75 ng/lado, $n = 7$, \square ; 150 ng/lado, $n = 7$, \circ) e antagonista do receptor $GABA_B$ (SAC, 1,5 μ g/lado, $n = 8$, \bullet ; 3 μ g/lado, $n = 8$, \blacklozenge). Todas as cânulas foram localizados na concha do NAcc, 1,20 a 1,92 mm, anterior à estrutura bregma. AcbC: centro do núcleo accumbens; AcbSh: concha do núcleo accumbens; aca: comissura anterior, parte anterior.

4.1.2 Efeitos das diferentes doses de agonistas e antagonistas de receptores GABA_A ou GABA_B injetados na concha do NAcc sobre os comportamentos ingestivos e não-ingestivos

A ANOVA mostrou que o comportamento ingestivo (a quantidade de alimento, a duração deste comportamento e a latência para iniciar o consumo) não foi afetado pela injeção bilateral de agonistas de receptores GABA_A e GABA_B na concha do NAcc dos ratos privados de alimento por 24h (Figura 9A). A ANOVA de uma via indicou, também, que os comportamentos não-ingestivos (LOC, IM, EXALI, EV e AL) também permaneceram inalterados após o tratamento com os agonistas dos receptores GABA_A e GABA_B (Tabela 3).

A ingestão de alimentos [F (4,34) = 3,66, p = 0,01] e a duração desse comportamento [F (4,34) = 5,21, p = 0,002] foram afetadas significativamente após o tratamento com o antagonista do receptor GABA_A, bicuculina - BIC 75 e 150 ng, na concha do NAcc dos ratos privados de alimentos por 24h. Ambas as doses de BIC provocaram uma redução na quantidade de alimento ingerido, bem como uma redução na duração desse comportamento (Figura 9B) em relação ao grupo controle (SAL). A latência para iniciar esse comportamento não foi afetada nesses tratamentos. A duração dos comportamentos não-ingestivos (LOC, IM, EXALI, EV e AL) também não foi alterada com ambas as doses de BIC (Tabela 4).

A ANOVA também mostrou que o tratamento com antagonista do receptor GABA_B, Saclofen - SAC 1,5 e 3 µg, não afetou o comportamento ingestivo (a quantidade de alimento, a duração do comportamento e a latência para iniciar o consumo) (Figura 9B), bem como os comportamentos não-ingestivos (LOC, IM, EXALI, EV e AL) avaliados durante o registro do comportamento alimentar (Tabela 4), na concha do NAcc dos ratos privados de alimentos por 24h.

Tabela 1: Efeitos das injeções de salina, agonistas de receptores GABA_A (Muscimol - MUS 25 ou 50 ng) ou GABA_B (Baclofen - BAC 32 ou 64 ng) na concha do NAcc nas variáveis espaço-temporais e etológicas dos ratos privados de alimentos por 24h, durante 5 minutos (300 segundos) de exposição ao LCE.

VARIÁVEIS	SAL (9)	MUS 25 ng (7)	MUS 50 ng (7)	BAC 32 ng (7)	BAC 64 ng (6)	ANOVA
Entrada nos braços abertos	5 ± 0,5	3 ± 1	4 ± 1	2 ± 0,7	5 ± 0,9	$F(4,31)= 2,35$; NS
Entrada nos braços fechados	6 ± 1	8 ± 1	6 ± 1	5 ± 0,9	8 ± 2	$F(4,31)= 0,89$; NS
Total de entradas	11 ± 1	11 ± 2	10 ± 2	7 ± 1	13 ± 3	$F(4,31)= 1,61$; NS
% Entradas nos braços abertos	49 ± 7	22 ± 7	29 ± 8	32 ± 13	41 ± 4	$F(4,31)= 1,73$; NS
% Tempo nos braços abertos	36 ± 7	14 ± 5	14 ± 5	10 ± 4	20 ± 6	$F(4,31)= 3,37$; NS
Avaliação de risco	1 ± 0,2	0,1 ± 0,1*	0,3 ± 0,2*	0,3 ± 0,2*	0,2 ± 0,2*	$F(4,31)= 4,34$; $p < 0,006$
Imersão de cabeça	5 ± 1	5 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	5 ± 1	$F(4,31)= 0,42$; NS
Exploração vertical	7 ± 1	11 ± 4	10 ± 2	7 ± 2	11 ± 2	$F(4,31)= 0,73$; NS
Auto-limpeza	3 ± 0	3 ± 0	2 ± 1	1 ± 0	2 ± 0	$F(4,31)= 1,05$; NS

Os valores são média ± E.P.M. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de p não significantes, exceto para * $p < 0,0125$.

Tabela 2: Efeitos das injeções de salina, antagonistas de receptores GABA_A (Bicuculina - BIC 75 ou 150 ng) ou GABA_B (Saclofen - SAC 1,5 ou 3 µg) na concha do NAcc, nas variáveis espaço-temporais e etológicas dos ratos privados de alimentos por 24h, durante 5 minutos (300 segundos) de exposição ao LCE.

VARIÁVEIS	SAL (9)	BIC 75 ng (7)	BIC 150 ng (7)	SAC 1.5 µg (8)	SAC 3 µg (8)	ANOVA
Entrada nos braços abertos	5 ± 0,6	5 ± 1	6 ± 1	5 ± 1	3 ± 1	$F(4,34) = 0,63$; NS
Entrada nos braços fechados	7 ± 0,7	8 ± 1	8 ± 0,5	5 ± 1	5 ± 0,6	$F(4,34) = 2,18$; NS
Total de entradas	12 ± 1	13 ± 1	14 ± 2	10 ± 2	9 ± 1	$F(4,34) = 1,75$; NS
% Entrada nos braços abertos	24 ± 4	20 ± 6	21 ± 5	34 ± 10	19 ± 8	$F(4,34) = 0,88$; NS
% Tempo nos braços abertos	45 ± 4	35 ± 5	36 ± 8	48 ± 7	30 ± 11	$F(4,34) = 0,65$; NS
Avaliação de risco	1 ± 0,5	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,3	1 ± 0,5	$F(4,34) = 1,40$; NS
Imersão de cabeça	6 ± 1	6 ± 2	6 ± 2	7 ± 2	5 ± 1	$F(4,34) = 0,27$; NS
Exploração vertical	11 ± 1	9 ± 2	7 ± 2	8 ± 2	9 ± 3	$F(4,34) = 1,19$; NS
Autolimpeza	3 ± 0,5	2 ± 0,7	2 ± 0,5	2 ± 0,6	2 ± 0,3	$F(4,34) = 0,44$; NS

Os valores são média ± E.P.M. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de p não significantes para $p < 0,0125$.

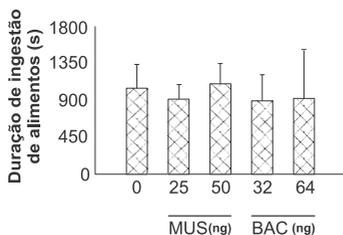
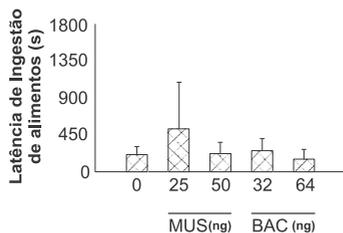
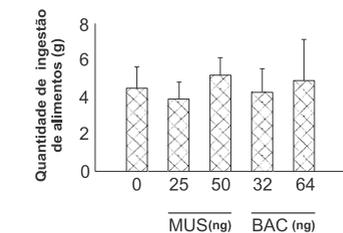
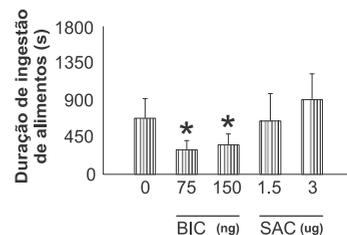
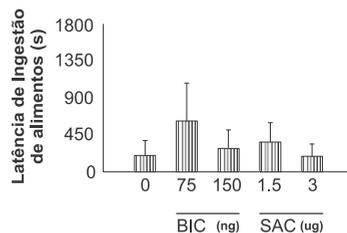
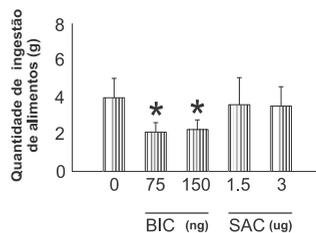
A. Agonistas GABA_A ou GABA_BB. Antagonistas GABA_A ou GABA_B

Figura 9. Efeitos de injeções bilaterais de veículo (salina – 0), de (A) agonistas de receptores GABA_A, Muscimol (MUS 25 ou 50 ng), e GABA_B, Baclofen (BAC 32 ou 64 ng), ou (B) antagonistas de receptores GABA_A, Bicuculina (BIC 75 ou 150 ng), e GABA_B, Saclofen (SAC 1,5 ou 3 μg), na concha do NAcc dos ratos privados de alimentos por 24h, na quantidade de ingestão de alimentos, na duração desse comportamento e na latência para iniciar o consumo avaliados durante 30 minutos de registro do comportamento ingestivo. Cada coluna representa a média ± E.P.M. * p < 0,0125 comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan para comparações múltiplas, com ajuste do alfa pela Correção de Bonferroni).

Tabela 3: Efeitos das injeções de salina, agonistas de receptores GABA_A (MUS 25 ou 50 ng) ou GABA_B (BAC 32 ou 64 ng) na concha do NAcc dos ratos privados de alimentos por 24h na duração dos comportamentos não-ingestivos avaliados durante os 30 minutos (1800 segundos) de registro de comportamento ingestivo.

VARIÁVEIS	SAL (9)	MUS 25 ng (7)	MUS 50 ng (7)	BAC 32 ng (7)	BAC 64 ng (6)	ANOVA
Locomoção	143 ± 33	158 ± 40	75 ± 17	90 ± 23	107 ± 40	$F(4,31)= 1,16$; NS
Imobilidade	51 ± 33	20 ± 19	16 ± 8	40 ± 21	28 ± 28	$F(4,31)= 0,89$; NS
Exploração de alimento	116 ± 33	73 ± 16	108 ± 22	147 ± 57	78 ± 12	$F(4,31)= 0,89$; NS
Exploração vertical	66 ± 21	106 ± 32*	32 ± 5	27 ± 7	44 ± 18	$F(4,31)= 3,57$; NS
Auto-limpeza	123 ± 27	101 ± 29	97 ± 29	98 ± 27	95 ± 27	$F(4,31)= 0,00$; NS

Os valores são média ± E.P.M. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de p não significantes para $p < 0,0125$.

Tabela 4. Efeitos das injeções de salina, antagonistas de receptores GABA_A (BIC 75 ou 150 ng) e GABA_B (SAC 1,5 ou 3 µg) na concha do NAcc dos ratos privados de alimentos por 24h na duração dos comportamentos não-ingestivos avaliados durante 30 minutos (1800s) de registro do comportamento ingestivo.

VARIÁVEIS	SAL (9)	BIC 75 ng (7)	BIC 150 ng (7)	SAC 1.5 µg (8)	SAC 3 µg (8)	ANOVA
Locomoção	112 ± 20	166 ± 31	127 ± 61	83 ± 18	65 ± 22	$F(4,34)= 1,42$; NS
Imobilidade	0,3 ± 0,2	131 ± 48	61 ± 26	95 ± 39	47 ± 31	$F(4,34)= 0,91$; NS
Exploração de alimento	85 ± 13	82 ± 10	135 ± 25	118 ± 45	117 ± 50	$F(4,34)= 1,34$; NS
Exploração vertical	45 ± 8	67 ± 13	72 ± 36	52 ± 12	27 ± 10	$F(4,34)= 0,81$; NS
Autolimpeza	102 ± 32	129 ± 30	121 ± 44	160 ± 44	117 ± 29	$F(4,34)= 0,24$; NS

Os valores são média ± E.P.M. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de p não significantes para $p < 0,0125$.

4.2 Injeções de agonistas 5-HT

A análise histológica mostrou que 21 pontos de injeção com o agonista do receptor 5-HT_{1A} ou ácido ascórbico; 22 pontos de injeção com agonista do receptor 5-HT_{2C} ou salina; e 22 pontos de injeção com agonista do receptor 5-HT_{1B} ou salina alcançaram corretamente a concha do NAcc bilateralmente (Figura 10).

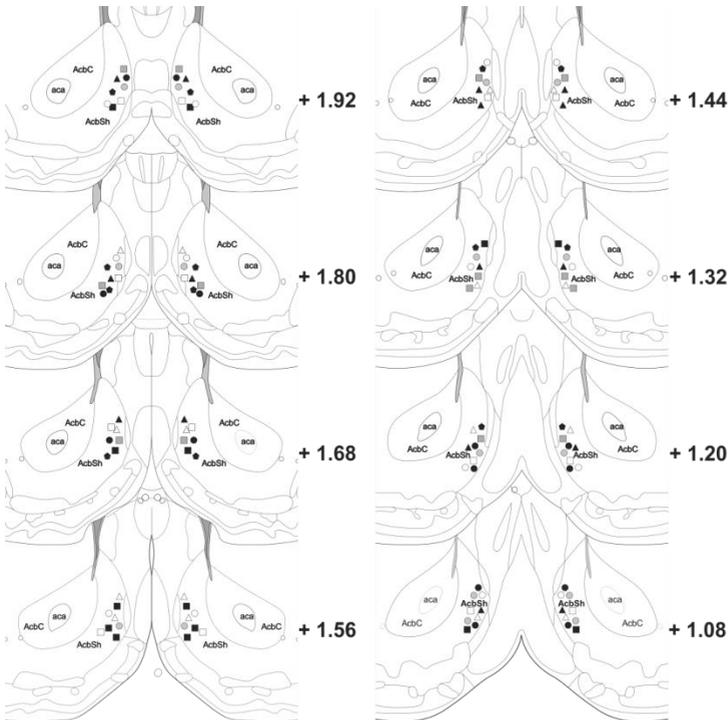


Figura 10. Representação esquemática representando cortes coronais do cérebro do rato, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007). Os cortes ilustram as distribuições dos locais da injeção bilateral na concha do NAcc. Os 65 ratos receberam injeções: de veículo (ácido ascórbico 5%, $n = 7$ ○), agonista do receptor 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT - 0,6 nmol/lado, $n = 7$ ●; 6 nmol/lado, $n = 7$ ◆); de veículo (salina $n = 8$ ▲), e agonista do receptor 5-HT_{2C} (CP-80,9101 - 0,75 ug/ lado, $n = 7$ ■; 1,5 ug/lado, $n = 7$ □); de veículo (salina $n = 8$ ●), e agonista do receptor 5-HT_{1B} (CP-94,253 - 0,56 ug/lad $n = 7$ ■; 1 ug/lado, $n = 7$ △). Todas as cânulas foram localizados na concha do NAcc, 1,08 a 1,92 mm, anterior à estrutura bregma. AcbC: centro do núcleo accumbens; AcbSh: concha do núcleo accumbens; aca: comissura anterior, parte anterior.

4.2.1 Efeitos das diferentes doses de agonista do receptor 5-HT_{1A} injetado na concha do NAcc sobre os comportamentos defensivos

A ANOVA mostrou que a porcentagem de tempo nos braços abertos (% TA), avaliada no LCE, foi significativamente afetada pelo tratamento com 8-OH-DPAT, agonista do receptor 5-HT_{1A} (Tabela 5), na concha do NAcc. Os ratos tratados com injeção bilateral de agonista do receptor 5-HT_{1A}, em relação à %TA não diferiram do grupo controle. A diferença estatística mostrada na ANOVA foi entre as doses de 8-OH-DPAT (Tabela 5). As outras variáveis etológicas (AR, IC, EV e AL) e as variáveis espaço-temporais (EA, EF, TE e %TA) permaneceram inalteradas após o tratamento com ambas as doses de 8-OH-DPAT na concha do NAcc em ratos privados de alimentos por 24h (Tabela 5).

4.2.2 Efeitos das diferentes doses de agonista do receptor 5-HT_{1A} injetado na concha do NAcc sobre os comportamentos ingestivos e não-ingestivos

A ANOVA mostrou que a ingestão de alimentos [$F(2,19) = 14,12, p = 0,0001$] e a duração deste comportamento [$F(2,19) = 7,37, p = 0,0042$] foram significativamente afetadas pelo tratamento com agonista do receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT na concha do NAcc em ratos privados de alimentos por 24h. Enquanto a ingestão de alimentos e duração desse comportamento diminuiu após a injeção de dose mais elevada de 8-OH-DPAT, a latência para iniciar a alimentação manteve-se inalterada após o tratamento com ambas as doses de 8-OH-DPAT na concha do NAcc (Figura 11). As durações dos comportamentos não-ingestivos (LOC, IM, EXALI, EV e AL) permaneceram inalteradas após o tratamento com ambas as doses de 8-OH-DPAT (Tabela 6).

4.2.3 Efeitos das diferentes doses de agonista do receptor 5-HT_{2C} injetado na concha do NAcc sobre os comportamentos defensivos

A ANOVA mostrou que as variáveis espaço-temporais (EA, EF, TE, % TA e % EA) e etológicas (AR, IC, EV E AL) permaneceram inalterada após o tratamento com ambas as doses de CP-80,9101, agonista do receptor 5-HT_{2C}, na concha do NAcc em ratos privados de alimento por 24 h (Tabela 7).

4.2.4 Efeitos das diferentes doses de agonista do receptor 5-HT_{2C} injetado na concha do NAcc sobre os comportamentos ingestivos e não-ingestivos

O comportamento ingestivo (ingestão de alimento, duração do comportamento e latência para iniciar o consumo) não foram afetadas pela injeção bilateral de CP-80,910, agonista do receptor 5-HT_{2C}, na concha do NAcc em ratos privados de alimentos por 24 horas (Tabela 8). A ANOVA mostrou, também, que a duração dos comportamentos não-ingestivos avaliados durante o registro de comportamento ingestivo (LOC, IM, EXALI, EV e AL) permaneceram inalterados após o tratamento com ambas as doses de CP-80,910 (Tabela 8).

4.2.5 Efeitos das diferentes doses de agonista do receptor 5-HT_{1B} injetado na concha do NAcc sobre os comportamentos defensivos

A ANOVA mostrou que as entradas nos braços abertos (EA) [$F(2,19) = 8,28, p = 0,0025$] e a porcentagem de tempo no braço aberto (% TA) [$F(2,19) = 8,97, p = 0,0361$] avaliados no LCE foram significativamente afetados pelo tratamento com CP-94,253, agonista do receptor 5-HT_{1B}. As EA e % TA diminuíram após a injeção da dose mais elevada de CP-94,253 na concha do NAcc de ratos privados de alimento por 24 h (Figura 11). As demais variáveis espaço-temporais (EF, TE e % EA) permaneceram inalteradas após o tratamento com ambas as doses do agonista do receptor 5-HT_{1B} na concha do NAcc (Tabela 9). Entre os comportamentos etológicos avaliados no LCE, apenas a frequência de imersão de cabeça (IC) [$F(2,19) = 4,92, p = 0,0189$] foi significativamente afetada com o tratamento de CP-94,253. A IC diminuiu após a injeção de ambas as doses de 5-HT_{1B} na concha do NAcc em ratos privados de alimento por 24h (Figura 8). As outras variáveis etológicas (AR, EV e AL) permaneceram inalteradas após o tratamento com ambas as doses de CP-94,253 (Tabela 9).

4.2.6 Efeitos das diferentes doses de agonista do receptor 5-HT_{1B} injetado na concha do NAcc sobre os comportamentos ingestivos e não-ingestivos

Os comportamentos ingestivos (ingestão de alimento, duração deste comportamento e latência para iniciar o consumo de alimento) e não-ingestivos (LOC, EXALI, IM, e EV) não foram afetados por ambas as doses de CP-94,253, exceto a duração da auto-limpeza (Tabela 10).

Tabela 5: Efeitos das injeções de ácido ascórbico (Ac.Asc) ou agonista de receptor 5-HT_{1A} (8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina - 8-OH-DPAT 0,6 ou 6 nmol) na concha do NAcc, nas variáveis espaço-temporais e etológicas dos ratos privados de alimentos por 24h, durante 5 minutos (300 segundos) de exposição ao LCE.

VARIÁVEIS	Ác. Asc (8)	8-OH-DPAT 0,6 nmol (7)	8-OH-DPAT 6 nmol (7)	ANOVA
Entrada nos braços abertos	3 ± 0,5	3 ± 1	4 ± 0,6	F(2,18)= 0,95, NS
Entrada nos braços fechados	4 ± 0,3	5 ± 1	7 ± 1	F(2,18)= 1,77, NS
Total de entradas	7 ± 0,8	8 ± 2	11 ± 1	F(2,18)= 1,46, NS
% Entradas nos braços abertos	41 ± 4	23 ± 8	39 ± 3	F(2,18)= 3,00, NS
% Tempo nos braços abertos	20 ± 5	10 ± 5 #	27 ± 2	F(2,18)= 3,69, p= 0,0451
Avaliação de risco	1 ± 0,3	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,4	F(2,18)= 0,17, NS
Imersão de cabeça	6 ± 1	4 ± 2	6 ± 1	F(2,18)= 1,29, NS
Exploração vertical	10 ± 2	10 ± 2	8 ± 1	F(2,18)= 0,42, NS
Autolimpeza	3 ± 0,4	4 ± 0,7	2 ± 0,9	F(2,18)= 2,32, NS

Os valores são média ± E.P.M. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de *p* não significantes, exceto para # *p* < 0,05, entre doses.

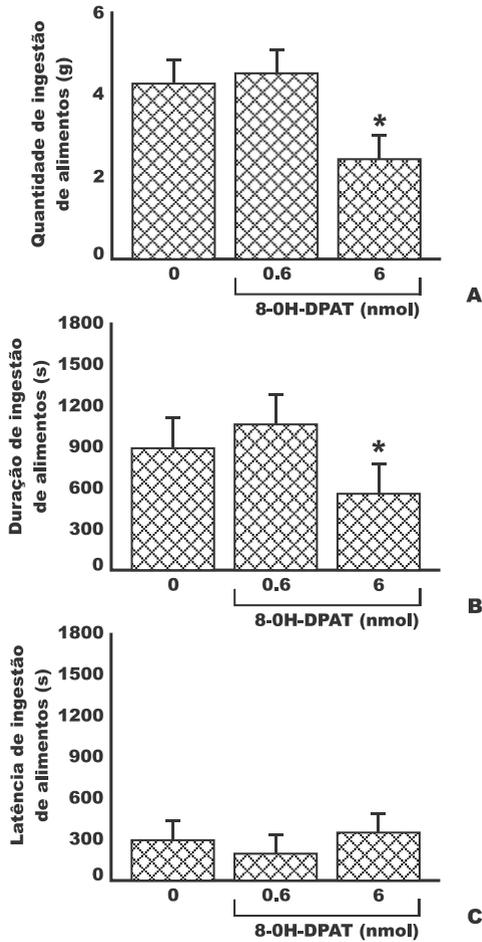


Figura 11. Efeitos das injeções bilaterais de veículo (ácido ascórbico 5% - 0) ou agonista do receptor 5-HT_{1A} , 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina - 8-OH-DPAT 0,6 ou 6 nmol, na concha do NAcc de ratos privados de alimentos por 24h, na quantidade de ingestão de alimentos (A), na duração de ingestão de alimento (B) e na latência para iniciar este comportamento (C) avaliados durante 30 minutos de registro do comportamento ingestivo. Cada coluna representa a média \pm S.E.M. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan para comparações múltiplas).

Tabela 6: Efeitos das injeções de ácido ascórbico ou agonista do receptor 5-HT_{1A} (8 OH-DPAT 0,6 ou 6 nmol) na concha do NAcc dos ratos privados de alimentos por 24h, na duração dos comportamentos não-ingestivos avaliados durante 30 minutos (1800 segundos) de registro do comportamento ingestivo.

VARIÁVEIS	Ác. Asc (7)	8-OH-DPAT 0,6 nmol (7)	8-OH-DPAT 6 nmol (7)	ANOVA
Locomoção	137 ± 28	105 ± 29	205 ± 49	F(2,18)= 1,95, NS
Exploração de alimento	153 ± 32	103 ± 20	117 ± 34	F(2,18)= 0,74 NS
Imobilidade	0 ± 0	42 ± 42	0 ± 0	F(2,18)= 1,00, NS
Exploração Vertical	72 ± 17	34 ± 10	88 ± 26	F(2,18)= 2,18, NS
Auto-limpeza	120 ± 24	73 ± 26	96 ± 28	F(2,18)= 0,81, NS

Os valores são média ± E.P.M. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de p não significantes para $p < 0,05$.

Tabela 7. Efeitos das injeções bilaterais de salina ou agonista do receptor 5-HT_{2C} (2-(3-clorobenziloxi)-6-(piperazin-1-il) pirazina, CP-80,9101 - 0,75 e 1,50 µg) na concha do NAcc, nas variáveis espaço-temporais e etológicas dos ratos privados de alimentos por 24h, durante 5 minutos (300 segundos) de exposição ao LCE.

Variáveis	SAL (8)	CP-80,9101 0.75 µg (7)	CP-80,9101 1.50 µg (7)	ANOVA
Entrada nos braços abertos	2 ± 0,8	1,6 ± 0,6	2 ± 0,4	F(2,19) = 0,50, NS
Entrada nos braços fechados	6 ± 1	4 ± 1	6 ± 1	F(2,19) = 0,75, NS
Total de entradas	8 ± 1	6 ± 1	8 ± 1	F(2,19) = 0,90, NS
% Entradas nos braços abertos	31 ± 6	22 ± 6	31 ± 6	F(2,19) = 0,62, NS
% Tempo nos braços abertos	28 ± 13	9 ± 3	21 ± 9	F(2,19) = 0,96, NS
Avaliação de risco	1,2 ± 0,4	0,7 ± 0,5	1,1 ± 0,6	F(2,19) = 0,26, NS
Imersão de cabeça	4 ± 1	4 ± 1	6 ± 2	F(2,19) = 0,39, NS
Exploração vertical	6 ± 2	8 ± 1	8 ± 2	F(2,19) = 0,12, NS
Autolimpeza	2 ± 0,5	2 ± 0,5	2 ± 0,6	F(2,19) = 0,48, NS

Os valores são média ± E.P.M. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de *p* não significantes para *p* < 0,05.

Tabela 8: Efeitos das injeções de salina ou agonista do receptor 5-HT_{2C} (CP-80,9101 0,75 ou 1,5 µg) na concha do NAcc dos ratos privados alimentos por 24h, na duração dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos avaliados durante 30 minutos (1800 segundos) de registro do comportamento ingestivo.

Variáveis	SAL (8)	CP-80,9101 0.75 µg (7)	CP-80,9101 1.50 µg (7)	ANOVA
Ingestão de alimento (g)	4,2 ± 0,5	3,7 ± 0,3	3,4 ± 0,2	F(2,19)= 1,60, NS
Duração da ingestão	1020 ± 136	880 ± 105	832 ± 82	F(2,19)= 0,77, NS
Latência da ingestão	213 ± 61	181 ± 55	199 ± 43	F(2,19)= 0,08, NS
Locomoção	134 ± 23	102 ± 36	205 ± 49	F(2,19)= 0,26, NS
Exploração de alimento	178 ± 36	105 ± 21	117 ± 34	F(2,19)= 0,10, NS
Imobilidade	0 ± 0	28 ± 28	0 ± 0	F(2,19)= 0,89, NS
Exploração vertical	47 ± 11	76 ± 20	88 ± 26	F(2,19)= 1,39, NS
Autolimpeza	137 ± 27	223 ± 50	96 ± 28	F(2,19)= 0,92, NS

Os valores são média ± E.P.M. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de *p* não significantes para *p* < 0,05.

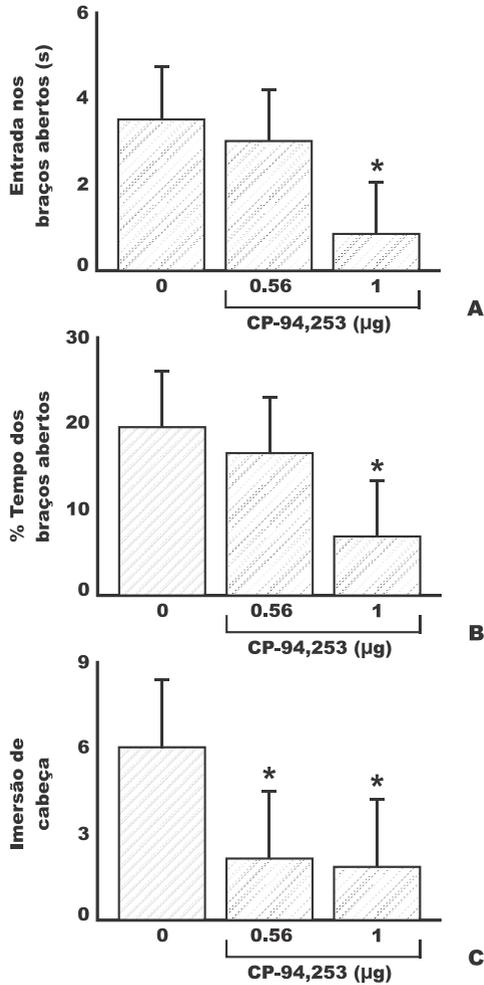


Figura 12: Efeito das injeções bilaterais de salina (0) ou 5-HT_{1B} (CP-94,253 0,56 e 1 µg) na concha do NAcc de ratos privados de alimentos por 24h na entrada dos braços abertos (A), na % de tempo nos braços abertos (B) e na imersão de cabeça (C), avaliados durante 5 minutos de exposição no LCE. Cada coluna representa a média ± E.P.M. * p < 0,05 comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan para comparações múltiplas).

Tabela 9: Efeitos das injeções bilaterais de salina ou agonista do receptor 5-HT_{1B} (3-(1,2,5,6-tetra-hidro-4-piridil)-5-propoxypyr-olo[3,2-b]piridina, CP-94,253, 0,56 e 1 µg) na concha do NAcc, nas variáveis espaço-temporais e etológicas dos ratos privados de alimentos por 24h, durante 5 minutos (300 segundos) de exposição ao LCE.

Variáveis	SAL (8)	CP-94,253 0.56 µg (7)	CP-94,253 1.0 µg (7)	ANOVA
Entrada nos braços fechados	5 ± 1	4 ± 1	3 ± 0,7	F(2,19) = 2,08, NS
Total de entradas	8 ± 2	7 ± 1	4 ± 0,8*	F(2,19) = 4,69, p= 0,0220
% Entradas nos braços abertos	41 ± 5	45 ± 6	25 ± 8	F(2,19) = 2,47, NS
Avaliação de risco	0,7 ± 0,3	1,2 ± 0,8	1,1 ± 0,5	F(2,17)= 0,32, NS
Exploração vertical	10 ± 2	9 ± 2	6 ± 2	F(2,17)= 0,72, NS
Autolimpeza	2 ± 0,6	3 ± 0,5	1,2 ± 0,3	F(2,17)= 1,59, NS

Os valores são média ± E.P.M. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo.* p<0,05 comparado ao grupo controle.

Tabela 10: Efeitos das injeções de salina ou agonista do receptor 5-HT_{1B} (CP-94,253, 0,56 e 1µg) na concha do NAcc, dos ratos privados de alimentos por 24h, na duração dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos avaliados durante 30 minutos de registro do comportamento ingestivo.

Variáveis	SAL (8)	CP-94,253 0.56 µg (7)	CP-94,253 1.0 µg (7)	ANOVA
Ingestão de alimento (g)	4.2 ± 0.5	3.6 ± 0.4	3.6 ± 0.4	F(2,19)= 0.60, NS
Duração da ingestão	1020 ± 136	852 ± 128	930 ± 150	F(2,19)= 0.27, NS
Latência da ingestão	213 ± 61	280 ± 93	308 ± 119	F(2,19)= 0.29, NS
Locomoção	134 ± 23	161 ± 29	98 ± 37	F(2,19)= 1.56, NS
Exploração de alimento	178 ± 36	101 ± 13	124 ± 24	F(2,19)= 2.35, NS
Imobilidade	0 ± 0	0 ± 0	20 ± 20	F(2,19)= 0.71, NS
Exploração vertical	47 ± 11	92 ± 36	47 ± 15	F(2,19)= 0.93, NS
Autolimpeza	63 ± 31	223 ± 53*	131 ± 22	F(2,19)= 4.75 p= 0.0211

Os valores são média ± E.P.M. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo.* p<0,05 comparado ao grupo controle.

Quadro 1. Resumo dos resultados

Tratamento/receptor	Efeitos das injeções das drogas na concha do NAcc sobre os comportamentos	
Agonistas GABA	Defensivos	Ingestivos
MUS – GABA _A (25 e 50 ng/lado)	Ansiolítico (por modesta diminuição da AR no LCE)	Sem alteração
BAC - GABA _B (32 e 64 ng/lado)	Ansiolítico (por modesta diminuição da AR no LCE)	Sem alteração
Antagonistas GABA	Defensivos	Ingestivos
BIC - GABA _A (75 e 150 ng/lado)	Sem alteração	Hipofágico (por diminuição da quantidade de ingestão de alimento e na duração deste comportamento)
SAC - GABA _B (1,5 e 3 µg/lado)	Sem alteração	Sem alteração
Agonistas 5-HT	Defensivos	Ingestivos
8-OH-DPAT - 5-HT _{1A} (0,6 e 6 nmol/lado)	Sem alteração	Hipofágico (por diminuição na quantidade de ingestão de alimento e na duração deste comportamento)
CP-80,9101 - 5-HT _{2C} (0,75 e 1,5 µg)	Sem alteração	Sem alteração
CP-94,253 - 5-HT _{1B} (0,56 e 1 µg)	Ansiogênico (por diminuição de EA, % TA e IC no LCE)	Sem alteração

5. Discussão

5.1. Agonistas e antagonistas de receptores GABA_A e GABA_B: comportamento defensivo

Os resultados do presente estudo mostraram que a ativação dos receptores GABA_A e GABA_B na concha do NAcc causaram ansiólise em ratos privados de alimentos por 24h. Ambas as doses de MUS e BAC, agonistas de receptores GABA_A e GABA_B respectivamente, diminuíram a frequência do comportamento de avaliação de risco. Esses resultados indicaram que receptores de GABA_A e GABA_B na concha do NAcc podem evocar efeito ansiolítico. Em nosso estudo anterior, o efeito ansiolítico evocado por agonistas desses receptores, injetados na concha do NAcc em ratos com alimentação livre, também indicou uma diminuição na avaliação de risco, e as variáveis espaço-temporais, tais como % TA e % EA também mostraram uma tendência marginal significativa, reforçando esse efeito (Lopes et al., 2007). No presente estudo, as variáveis espaço-temporais não foram afetadas pelo tratamento com os mesmos agonistas de receptores GABA_A e GABA_B.

As modestas mudanças na avaliação de risco não podem fornecer provas convincentes de que os ratos estavam em um estado menos ansioso. No entanto, os presentes dados, adicionados com nosso resultado anterior (Lopes et al., 2007), reforçam o efeito ansiolítico evocado por agonista GABA na concha do NAcc. Uma possível razão para o número mais baixo de avaliação de risco poderia ser devido às condições nutricionais. Tem-se relatado que, após restrição alimentar aguda e crônica e após a realimentação por 10 dias, os ratos aumentam a exploração do braço aberto em comparação a ratos com acesso à alimentação livre (Genn et al., 2003; Inoue et al., 2004). Esses dados indicam que os ratos privados de alimentos foram menos ansiosos que os ratos saciados. Nossa estudo anterior (Lopes et al., 2007) e os dados presentes confirmam que pode haver uma influência nutricional, pois enquanto a frequência de avaliação de risco exibida em ratos privados de alimento por 24 horas sob condição de controle foi de $1 \pm 0,2$, em ratos com alimentação livre foi de $4 \pm 0,6$ (Lopes et al, 2007). Essa diferença também foi estatisticamente significativa de acordo com o teste t, $t = 3,91$ $p = 0,000368$. Além disso, o estado de ansiedade indicado por % TA sob condições de controle com alimentação livre foi de 12 ± 3 ($n = 22$) (Lopes et al, 2007) e para ratos privados de alimento

por 24h foi de 30 ± 4 ($n = 18$). Essa diferença também foi estatisticamente significativa de acordo com o teste t , $t = 3,61$ $p = 0,00087$ e indicou que ratos privados de alimentos por 24 h passaram mais tempo nos braços abertos do que ratos com alimentação livre. Portanto, nossos resultados confirmam que a condição nutricional afeta a o nível de ansiedade, associada à ativação dos receptores.

Esse efeito ansiolítico de ação associada à privação de alimento não poderia ser atribuído à motivação para procurar alimentos ou uma ativação de um comportamento inespecífico em oposição a uma diminuição real no comportamento defensivo (tipo ansiedade), porque os ratos não apresentavam aumento na EF, que é um índice de atividade motora (File, 1992). Esses resultados sugerem que a restrição alimentar poderia causar uma redução no comportamento defensivo, o que persiste além da normalização da ingestão de alimentos (Inoue et al., 2004). Além disso, o comportamento defensivo de enterrar a pata, uma resposta ansiogênica também foi reduzida durante a privação de alimentos (Davis et al., 1981).

O efeito ansiolítico causado pela ativação de receptores $GABA_A$ (Crestani et al, 2002; Kash et al, 1999; Rudolph et al, 1999; Sasaki et al, 2002; Stork et al, 2003) e $GABA_B$ (Cryan et al, 2004; Cryan e Kaupmann, 2005; Dalvi e Rodgers, 1996; Jacobson et al, 2007; Mombereau et al, 2004a, 2004b) tem sido amplamente descrito e o efeito ansiogênico associado à ativação do receptor $GABA_A$ também foi documentado.

Tem sido demonstrado que a injeção de MUS na concha do NAcc pode evocar comportamento defensivo de enterrar a pata (Reynolds e Berridge, 2001), uma oposição quando comparado aos nossos dados anteriores ou presentes. O efeito ansiolítico mediado por ativação de ambos os receptores $GABA_A$ e $GABA_B$ em ratos privados de alimentos (resultado presente) e ratos com alimentação livre (Lopes et al, 2007) poderia ser atribuído aos locais diferentes de injeção (rostral \times caudal) na região da concha do NAcc. Enquanto, a resposta ansiolítica foi provocada por agonistas GABA injetado na região mais rostral da concha do NAcc (AP: 1,20-1,68 mm), o comportamento defensivo em ratos foi induzido por agonista do receptor $GABA_A$ injetado na região mais caudal (AP: 1,20 a + 0,48 mm). No entanto, uma resposta ansiogênica também foi observada após a ativação de receptores $GABA_A$ na região mais rostral da concha do NAcc (Reynolds e Berridge, 2001). Nós não temos uma explicação para o efeito de contraste na emocionalidade de animais após a injeção de agonista

GABA na concha do NAcc, mas nossos presentes dados reforçam o efeito ansiolítico evocado por ativação de ambos os receptores GABA_A e GABA_B nesta região do NAcc.

5.2 Agonistas e antagonistas de receptores GABA_A e GABA_B: comportamento ingestivo e não-ingestivo

O presente estudo também mostrou que o comportamento ingestivo não foi afetado pela injeção bilateral de ambos os agonistas de receptores GABA, MUS e BAC na concha do NAcc de ratos privados de alimentos por 24h. Resultados similares foram observados após a injeção sistêmica de BAC em ratos privados de alimentos por 22h (Ebenezer, 1996; Ebenezer e Patel, 2011). Em contraste, em animais com alimentação livre, o tratamento com ambos os agonistas de receptores GABA na concha do NAcc tiveram resposta hiperfágica acompanhada por um aumento na duração de alimentação (Kelley et al, 2005; Lopes et al, 2007; Reynolds e Berridge, 2001; Soderpalm e Berridge, 2000; Stratford e Kelley, 1997). A ausência de efeito sobre o comportamento ingestivo após a injeção de agonistas GABA na concha do NAcc de ratos privados de alimentos por 24h pode ser atribuída a uma ocupação intensa dos receptores de GABA_B (conhecido por ser localizado em terminais nervosos de glutamato) ou GABA_A (localizado na saída do neurônio espinhal médio). Devido à intensa estimulação das projeções dos neurônios gabérgicos na concha do NAcc, que poderia resultar na eliminação de influências inibitórias sobre circuitos de alimentação relacionados ao hipotálamo, provendo a motivação para iniciar a alimentação de um rato faminto (Kelley et al., 2005).

Os resultados também mostraram que o bloqueio do receptor GABA_A, pela injeção de antagonista desse receptor na concha do NAcc de ratos privados de alimentos por 24h, provocou uma diminuição da ingestão de alimentos acompanhada por redução da duração desse comportamento. Esses dados sugerem a presença de impulsos neurais mediados por receptores GABA_A nessa região do NAcc que provocam a motivação para ingestão de alimentos em ratos famintos, e reforçam a sugestão anterior de que em condições com privação de alimento, a ocupação de receptores GABA na concha do NAcc poderia ser intensa. A participação dos receptores GABA_B na mediação da motivação para o comportamento alimentar não pode ser excluída, já que as injeções de agonista do receptor GABA_B em ratos privados de alimentos por 24h na concha do NAcc também resultaram em hipofagia (Kandov et al.,

2006). A razão para a falta de efeito hipofágico após o bloqueio dos receptores GABA_B na concha do NAcc no presente estudo poderia ser atribuída a um menor tempo de experimento (30 min) do que o registrado por Kandov e colegas (2006) (a partir de 30 min a 4h). Além disso, Patel e colaboradores (2004) têm mostrado que a administração intracerebroventricular (i.c.v) do antagonista do receptor GABA_B, CGP 35348, diminuiu a alimentação a partir de 15 min após injeção em ratos em jejum de 22h. O início rápido da hipofagia evocada por antagonista do receptor GABA_B pode ter sido devido a uma ação em um local fora do NAcc, sugerindo o envolvimento de outras áreas centrais na mediação do efeito de GABA_B sobre a motivação alimentar.

Foi proposto que os dois antagonistas GABA_A e GABA_B estão funcionalmente envolvidos na manutenção, mas não no início da ingestão de alimentos de animais que foram induzidos à privação de alimentos, uma vez que ambos os antagonistas GABA não afetaram a ingestão de alimentos 30 minutos após a injeção na concha do NAcc (Kandov et al., 2006). No entanto, o bloqueio do receptor GABA_A resultou na diminuição da ingestão de alimentos acompanhada por uma redução na duração de alimentação, sem afetar a latência de alimentação. Uma alteração na duração de alimentação também foi observada após a ativação do receptor GABA_A, na concha do NAcc de ratos com alimentação livre. Tomados em conjunto, esses dados reforçam a nossa sugestão anterior de que os circuitos de GABA_A na concha do NAcc poderiam interferir com os sinais decorrentes do trato digestório para controlar o tamanho da refeição (Heisler e Tecott, 2000; Inoue et al, 1994; Jean et al, 2007).

5.3 Agonista do receptor 5-HT_{1A}

O presente estudo mostrou que as variáveis espaço-temporais e etológicas avaliadas no LCE não foram afetadas pelo tratamento com 8-OH-DPAT, agonista do receptor 5-HT_{1A}, na concha do NAcc. O efeito significativo de 8-OH-DPAT foi revelado pela análise de variância de uma via (ANOVA), onde a % de entradas nos braços abertos apresentou uma redução estatística significativa entre as doses de 8-OH-DPAT, o que poderia indicar uma tendência para a resposta ansiogênica. Efeito ansiogênico tem sido relatado após a administração de 8-OH-DPAT na amígdala (Gonzalez et al., 1996; Higgins et al., 1991; Hodges et al., 1987), e também no hipocampo dorsal (Andrews et al., 1994; File et al., 1996). Embora os resultados atuais sugiram que os receptores 5-HT_{1A} na

concha do NAcc não desempenhem um papel relevante no controle do estado emocional, não é excluída uma participação desses receptores na iniciação de ansiogênese de forma semelhante à encontrada no hipocampo e na amígdala.

Os presentes resultados indicaram que a ativação do receptor 5-HT_{1A} na concha do NAcc causou uma redução na ingestão de alimentos, acompanhada por uma diminuição na duração desse comportamento ingestivo, sem alterar o tempo de latência para iniciar o consumo de ração. Esse efeito hipofágico não pode ser atribuído a mudanças na atividade motora, já que as durações dos comportamentos não-ingestivos (AL, EV e LOC) avaliados nesse estudo, não foram afetadas pelo tratamento 8-OH-DPAT, agonista do receptor de 5-HT_{1A} na concha do NAcc. A ação inibitória da 5-HT na ingestão de alimentos, mediada pela ativação de receptores 5-HT_{1A} na concha do NAcc foi revelada anteriormente por tratamento com o agonista do receptor 5-HT_{1/7}, 5-carboxamidotriptamina, injetado na mesma região do NAcc de ratos que receberam 2 h de livre acesso a ração de laboratório, bem como em ratos saciados com acesso a uma dieta altamente palatável durante 2h (Pratt et al., 2009). O antagonista do receptor 5-HT₇, SB 269,970, não teve nenhum efeito sobre o consumo de alimentos, quando injetado na concha do NAcc, excluindo assim a possibilidade de que hipofagia é mediada por ativação do receptor 5-HT₇ e reforçando a participação do receptor 5-HT_{1A} na concha do NAcc na mediação de influência inibitória da 5-HT sobre a ingestão de alimentos (Pratt et al., 2009). A resposta hipofágica mediada pela ativação do receptor 5-HT_{1A} pode ser devido à redução na motivação para buscar o alimento, uma vez que a estimulação do receptor 5-HT_{1/7}, com a dose mais elevada de 5-CT (na concha do NAcc), provocou uma diminuição no esforço para ganhar o reforço de açúcar, já que essa dose reduziu o ato da busca pelo açúcar pelos ratos não privados (Pratt et al., 2012).

A ingestão de alimentos evocada por injeções sistêmicas de 8-OH-DPAT pode ser diferente, dependendo do estado nutricional dos animais. A ativação do receptor 5-HT_{1A} pode causar uma redução na ingestão de alimentos em ratos em jejum (Arkle e Ebenezer, 2000; Coscina et al., 2000; Ebenezer, 1992; Ebenezer e Tite, 2003; Ebenezer et al., 2007; López-Alonso et al., 2007), enquanto que poderia causar uma hiperfagia em ratos saciados (Coscina et al., 1994; Currie e Coscina, 1993; Dourish et al., 1985, 1988; Ebenezer, 1992; Gilbert e

Dourish, 1987; Parker e Coscina, 2001). A resposta hipofágica também foi observada após a injeção de 8-OH-DPAT no núcleo paraventricular, no núcleo arqueado e no hipotálamo lateral de ratos com dieta de alimentos palatáveis (Dourish et al., 1988; Mancilla-Diaz, 2005; Steffens et al., 2008; Voigt et al., 2000). Em circuitos hipotalâmicos, o receptor 5-HT_{1A} na concha do NAcc, pode contribuir para a resposta hipofágica após a injeção de 8-OH-DPAT. A análise de correlação ($r=0,1471$) indicou que não há nenhuma correlação positiva entre o comportamento relacionado à ansiedade e a ingestão de alimentos, uma vez que o tratamento com ambas as doses de 8-OH-DPAT não afetou as variáveis espaço-temporais e etológicas avaliadas no LCE, mas induziu uma resposta hipofágica.

5.4 Agonista do receptor 5-HT_{2C}

A análise do comportamento relacionado à ansiedade no LCE mostrou que o tratamento com CP-80,9101, agonista do receptor 5-HT_{2C}, na concha do NAcc não alterou as variáveis espaço-temporais (EA, EF, TE, % EA e % TA) e etológicas (AR, IC, EV e AL) em ratos privados de alimento por 24h. Portanto, os nossos dados não incluem a participação do receptor 5-HT_{2C} na concha do NAcc no controle do comportamento relacionado à ansiedade.

Os presentes dados mostraram que a injeção de CP-80,9101, agonista do receptor 5-HT_{2C}, na concha do NAcc em ratos privados de alimentos por 24h não afetaram o comportamento ingestivo. A quantidade de ração consumida, a latência para iniciar o consumo e a duração dessa resposta de ingestão não diferiu do grupo controle. De acordo com os nossos dados atuais, as infusões de RO 60-0175, agonista do receptor 5-HT_{2C}, injetado na concha do NAcc não teve efeito sobre o consumo de ração dos ratos que receberam 2 h de livre acesso a ração de laboratório, e diminuiu modestamente a ingestão de dieta de gordura em animais saciados (Pratt et al., 2009). Além disso, a ativação do receptor 5-HT_{2C} não teve efeito sobre o esforço exercido para ganhar uma recompensa (ração especial de açúcar) (Pratt et al., 2012), sugerindo que esse receptor não influenciou a motivação do apetite. Tomados em conjunto, esses resultados não incluem o envolvimento de receptor de 5-HT_{2C} sobre o controle do consumo de alimento, apesar de uma distribuição densa deste receptor 5-HT_{2C} na concha do NAcc (Higgins e Fletcher, 2003).

5.5 Agonista do receptor 5-HT_{1B}

Os presentes dados mostraram que a injeção de ambas as doses de CP-94, 253, agonista do receptor 5-HT_{1B}, na concha do NAcc provocou uma diminuição no número de entradas nos braços abertos (EA) e na porcentagem de tempo nos braços abertos (% TA) no LCE. As outras variáveis (EF, TE e % EA) avaliadas no LCE permaneceram inalteradas. A diminuição dessas variáveis são indicativos de um aumento do estado de ansiedade (Setem et al., 1999) e sugere que a estimulação deste receptor na concha do NAcc provocou uma resposta ansiogênica. Ambas as doses de CP-94,253 injetadas nessa região do NAcc também causaram uma redução na frequência do comportamento de imersão de cabeça (IC), reforçando o efeito ansiogênico evocado pela ativação de 5-HT_{1B} na concha do NAcc. Essa variável etológica, IC, é considerada como um parâmetro indispensável para avaliação de desempenho de ansiedade no LCE (Rodgers et al., 1997; Setem et al., 1999). O tratamento com ambas as doses de CP-94,253 na concha do NAcc não alterou o número de entradas nos braços fechados (EF), sugerindo que essa droga não afetou a atividade locomotora e, provavelmente, isso reflete um efeito ansiogênico específico desse agonista 5-HT_{1B}.

A administração subcutânea de CP-94,253 também diminuiu a exploração dos braços abertos do LCE, indicando que a estimulação do receptor 5-HT_{1B} aumenta o comportamento relacionado à ansiedade em ratos testados no LCE (Lin e Parsons, 2002). Embora se saiba que a distribuição do receptor 5-HT_{1B} no cérebro é heterogênea (Bruinvels et al., 1994), esse receptor na concha do NAcc poderia contribuir com a ansiogênese observada após administração periférica dessa droga.

A inervação serotoninérgica na concha do NAcc origina-se das asas laterais do núcleo dorsal da rafe (Van der Poel, 1979). Um aumento na atividade serotoninérgica na concha do NAcc está associada com condições de estresse (Moser e Sanger, 1999; Petty et al, 1994; Rueter e Jacobs, 1996; Summers et al., 2003; Wilkinson et al, 1996), tais como o teste de natação forçada (Amat et al, 1998a,b; Kirby et al, 1997). Além disso, o tratamento com fator de liberação da corticotropina (CRF-um neurotransmissor que medeia o estresse e ansiedade) no núcleo dorsal da rafe altera a liberação de 5-HT no núcleo e as regiões da concha do NAcc (Lukkes et al., 2008). Em conjunto essas observações reforçam os nossos dados presentes, sugerindo que os circuitos serotoninérgicos na

concha do NAcc contribuem para controlar o comportamento relacionado à ansiedade através do receptor 5-HT_{1B}.

Os presentes dados não incluem a participação de receptores 5-HT_{1B} na concha do NAcc no controle do comportamento alimentar, uma vez que o consumo de alimentos, a latência para iniciar a alimentação e a duração desta resposta ingestiva mantiveram-se inalteradas após o tratamento com agonista do receptor 5-HT_{1B} nessa região do NAcc. O efeito hipofágico evocado pela administração periférica do agonista do receptor 5-HT_{1B} (Dalton et al., 2006; Halford e Blundell, 1996; Lee et al., 2002; Lee et al., 2004a), pode ser mediado por circuitos hipotalâmicos, uma vez que a ativação do receptor 5-HT_{1B} induz um aumento na expressão do gene pró-opiomelanocortina (POMC) e do transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), e uma diminuição na expressão do gene hipotalâmico de orexina, levando a efeitos hipofágicos (Nonogaki et al., 2007).

De acordo com os nossos dados, não há nenhuma correlação ($r=0,1652$) entre o comportamento relacionado à ansiedade e o comportamento ingestivo evocado pela administração de CP-94,253 na concha do NAcc, uma vez que o tratamento com a dose mais elevada de CP-94,253 causou uma redução EA, % TA e na IC, indicativa de ansiogênese, sem causar qualquer alteração no comportamento ingestivo.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo demonstramos que, enquanto a estimulação dos agonistas de receptores de GABA_A e GABA_B evocou um efeito ansiolítico, o comportamento ingestivo manteve-se inalterado. Além disso, enquanto ambos os antagonistas GABA_A e GABA_B injetados na concha do NAcc não afetaram os comportamentos defensivos, ambas as doses de antagonista GABA_A causaram uma resposta hipofágica.

A ativação do receptor 5-HT_{1B} na concha do NAcc participa nos circuitos serotoninérgicos envolvidos na ansiogênese. Além disso, enquanto que o comportamento defensivo foi afetado pela ativação do receptor 5-HT_{1B}, o comportamento ingestivo foi modificado pela estimulação do receptor 5-HT_{1A}. Em contrapartida, a ativação do receptor 5-HT_{2C} não afetou os comportamentos defensivos e nem os ingestivos.

Coletivamente, estes resultados sugerem que os circuitos gabaérgicos e serotoninérgicos na concha do NAcc, em ratos privados de alimento regulam os comportamentos defensivos e ingestivos separadamente.

7. REFERÊNCIAS

Alhadeff AL, Rupprecht LE, Hayes MR. GLP-1 neurons in the nucleus of the solitary tract project directly to the ventral tegmental area and nucleus accumbens to control for food intake. *Endocrinology*. 2012;153: 647-58.

Amat J, Matus-Amat P, Watkins LR, Maier S. Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Res*. 1998a;812:113-20.

Amat J, Matus-Amat P, Watkins LR, Maier S.F Escapable and inescapable stress differentially and selectively alter extracellular levels of 5-HT in the ventral hippocampus and dorsal periaqueductal gray of the rat. *Brain Res*. 1998b;797:12-22.

Andrade TGCS, Graeff FG. Effect of electrolytic and neurotoxic lesion of the median raphe nucleus on anxiety and stress. *Pharmacol Biochem Behav*. 2001;70:1-14.

Andrews N, Hogg S, Gonzales LE, File SE. 5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviours respectively. *Eur J Pharmacol*. 1994;264: 259-64.

Arkle M, Ebenezer IS. Ipsapirone suppresses food intake in food-deprived rats by an action at 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Pharmacol*. 2000; 408: 273-76.

Avena NM, Rada P, Hoebel B. Underweight rats have enhanced dopamine release and blunted acetylcholine response in the nucleus accumbens while bingeing on sucrose. *Neurosci*. 2008;156: 865-71.

Barot SK, Ferguson SM, Neumaier JF. 5-HT_{1B} receptors in nucleus accumbens efferents enhance both rewarding and aversive effects of cocaine. *Eur J Neurosci* 2007; 25, 3125-131.

Basar K, Sesia T, Groenewegen H, Steinbusch HWM, Visser-Vandewalle V, Temel Y. Nucleus accumbens and impulsivity. *Progress in Neurobiology* 2010;92:533-57.

Basso AM, Kelley AE. Feeding induced by GABA(A) receptor stimulation within the nucleus accumbens shell: regional mapping and characterization of macronutrient and taste preference. *Behav Neurosci.* 1999; 113: 324-36.

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.

Bendotti C, Samanin R. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OHDPAT) elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons. *Eur J Pharmacol.* 1986;121: 147-50.

Berridge KC. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl).* 2007;191: 391-31.

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.

Blundell JE. Serotonin manipulations and the structure of feeding behavior. *Appetite.* 1986;7(Suppl): 39-56.

Bovetto S, Richard D. Functional assessment of the 5-HT1A, 1B, 2A/2C, and 5-HT3 receptor subtypes on food intake and metabolic rate in rats. *Am J Physiol.* 1995; 268:14-20.

Bormann J. The "ABC" of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:16-19.

Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev.* 2002;54: 247-64.

Breisch ST, Zemlan FP, Hoebel BG. Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Science*. 1976;192: 382-85.

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: immune histochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol*. 1993;338: 255-78.

Bruinvels AT, Landwehrmeyer B, Probst A, Palacios JM, Hoyer D. A comparative autoradiographic study of 5-HT_{1D} binding sites in human and guinea-pig brain using different radio ligands. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;21: 19-29.

Candoni C, Di Chiara G. Differential changes in accumbens shell and core dopamine in behavioral sensitization to nicotine. *Eur J Pharmacol*. 200;387: 23-25.

Canto-De-Souza A, Nunes-De-Souza RL, Rodgers RJ. Anxiolytic-like effect of way-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. *Brain Res*. 2002;928: 50-59.

Carlezon WA, Wise RA. Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex. *J Neurosci*. 1996;16:3112-122.

Chebib M, Johnston GAR. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999; 26(11): 937-40.

Cornélio AM, Nunes-De-Souza RL. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. *Behav Brain Res*. 2007;178: 82-89.

Coscina DV, Currie PJ, Bishop C, Parker GC, Rollins BL, King BM. Postero dorsal amygdala lesions reduce feeding stimulated by 8-OH-DPAT. *Brain Res*. 2000;883:243-49.

Coscina DV, Feifel D, Nobrega JN, Currie PJ. Intraventricular but not intraparaventricular nucleus metergoline elicits feeding in satiated rats. *Am J Physiol.* 1994;266: 1562-567.

Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, Bluthmann H, Mohler H, Rudolph U. Trace fear conditioning involves hippocampal $\alpha 5$ GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99: 8980-985.

Cryan JF, Kelly PH, Chaperon F, Gentsch C, Mombriereau C, Lingenhoehl K, Froesti W, Bettler B, Kaupmann K, Spooren WPJM. Behavioural characterization of the novel GABAB receptor positive modulator GS39783 (N, N0- dicyclopentyl-2- methylsulfanyl-5-nitropyrimidine-4,6-Diamine): Anxiolytic-like activity without side-effects associated with baclofen or benzodiazepines. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 310: 952-63.

Cryan JF, Kaupmann K. Don't worry 'B' happy!: a role for GABAB receptors in anxiety and depression. *Trends Pharmacol Science.* 2005; 26: 36-43.

Currie PJ, Coscina DV. Diurnal variations in the feeding response to 8-OH-DPAT injected into the dorsal or median raphe. *Neuroreport.* 1993;4:1105-107.

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* 2008a; 188, 91–99.

Da Cunha IC, De Nazareth AM, Vargas JC, Ferraz A, Marino-Neto J, Paschoalini MA, Faria MS. 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. *Behav. Brain Res.* 2008b;193: 243-47.

Dalton GL, Lee MD, Kennett GA, Dourish CT, Clifton PG. Serotonin 1B and 2C receptor interactions in the modulation of feeding behaviour in the mouse. *Psychopharmacol.* 2006;185: 45-57.

Dalvi A, Rodgers RJ. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996;128: 380-97.

David JD, Zahnister NR, Hoffer BJ, Gerhardt GA. In vivo electrochemical studies of dopamine clearance in subregions of rat nucleus accumbens: differential properties of the core and shell. *Exp Neurol*. 1998;153: 277-86.

Davis SF, Hazelrigg M, Moore SA, Petty-Zirnstien MK, Defensive burying as a function of food and water deprivation. *Bull Psychonom Soc*. 1981;18: 325-27.

Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones, G.S., 1998. Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res*. 1998;806, 127-40.

De Vry J. 5-HT_{1A} receptors in psychopathology and mechanism of action clinically effective therapeutics agents. *Drugs News Perspect* 1996; 9, 270-80.

De Vry J, Schreiber R. Effects of selected serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. *Neuroscience and Biobehav Reviews* 2000; 24, 341–353.

Di Chiara G. A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *J Psychopharmacol* 1998; 12, 54-67.

Dickson SL, Shirazi RH, Hansson C, Bergquist F, Nissbrandt H, Skibicka KP. The glucagon-like peptide 1 (GLP-1) analogue, exendin-4, decreases the rewarding value of food: A new role for mesolimbic GLP-1 receptors. *J Neurosci*. 2012;14: 4812-20.

Dos Santos L, Andrade TGSC, Zangrossi JRH. 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus mediate the anxiogenic effect induced by the stimulation of 5-HT neurons in the median raphe nucleus. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2008;18: 286-94.

Dourish CT, Cooper SJ, Gilbert F, Coughlan J, Iversen SD. The 5-HT_{1A} agonist 8-OHDPAT increases consumption of palatable wet mash and liquid diets in the rat. *Psychopharmacol.* 1988;94: 58-63.

Dourish CT, Hutson PH, Curzon G. Characteristics of feeding induced by the serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT). *Brain Res Bull.* 1985;15: 377-84.

Ebenezer IS. Effects of the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT on food intake in food-deprived rats. *Neuroreport.* 1992; 3: 1019-1022.

Ebenezer IS. The inhibitory effect of intraperitoneally administered cholecystokinin (CCK) on food intake in rats is attenuated by baclofen pretreatment. *Brain Res Bull.* 1996;41: 269-72.

Ebenezer IS, Arkle MJ, Tite RM. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin inhibits food intake in fasted rats by an action at 5-HT_{1A} receptors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2007;29: 269-72.

Ebenezer IS, Patel M. Effects of intraperitoneal administration of the GABA receptor agonist baclofen on food intake in rats measured under different feeding conditions. *European J of Pharmacol.* 2011;653: 58-62.

Ebenezer IS, Tite RM. Differential effects of the 5-HT_{1A} agonist gepirone on food intake in rats may depend on their motivation to eat. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2003;25: 727-31.

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

File SE. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliot JM, Heal CA, Marsden CA, editors. *Experimental approaches to anxiety and depression.* Amsterdam: Elsevier. 1992;25-44.

File SE, Gonzalez LE, Andrews N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *J Neurosci* 1996; 16, 4810–4815.

File SE, Hyde JRG, McLeod NK. 5,7-Dihydroxytryptamine lesion of dorsal and median raphe nuclei and performance in the social interaction test of anxiety and in a home cage aggression test. *J Affect Disord.* 1979;1: 115-122.

Furay AR, McDevitt RA, Miczek KA, Neumaier JF. 5-HT1B mRNA expression after chronic social stress. *Behav. Brain Res.* 2011;224: 350-357. Garfield AS, Heisler LK. Pharmacological targeting of the serotonergic system for the treatment of obesity. *J Physiol.* 2009;587: 49-60.

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.

Genn RF, Tucci S, Edwards JE, File SE. Dietary restriction and nicotine can reduce anxiety in female rats. *Neuropsychopharmacol.* 2003;28: 1257-63.

Gilbert F, Dourish CT. Effects of the novel anxiolytics gepirone, buspirone and ipsapirone on free feeding and on feeding induced by 8-OH-DPAT. *Psychopharmacol. (Berl)* 1997;93: 349-52.

Gonzalez LE, Adrews N, File SE. 5-HT1A and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Res* 1996; 732, 145-53.

Graef FG, Zangrossi HJr. The dual role of serotonin in defense and the model of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2010;10: 207-17.

Gray JA. Dopamine release in the nucleus accumbens: the perspective from aberrations of consciousness in schizophrenia. *Neuropsychol.* 1995;33: 1143-153.

Groenewegen HJ, Vermeulen-Van Der Zee E, Te Kortschot A, Witter MP. Organization of the projections from the subiculum to the ventral

striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neurosci.* 1987;23:103-20.

Halford JCG, Blundell JE. The 5-HT_{1B} receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioural satiety sequence. *Physiol Behav.* 1996;60: 933-39.

Halford JC, Harrold JA, Lawton CL, Blundell JE. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Curr Drug Targets.* 2005;6: 201-213.

Halford JC, Wanninayake SCD, Blundell JE. Behavioral Satiety Sequence (BSS) for the Diagnosis of Drug Action on Food Intake. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998;61:159-68.

Handley SL, Mcblane JW, Critchley MA, Njung'e K. Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. *Behav Brain Res.* 1993;58: 203-210.

Hanlon EC, Baldo BA, Sadeghian K, Kelley AE. Increases in food intake or food seeking behavior induced by GABAergic, opioid, or dopaminergic stimulation of the nucleus accumbens: is it hunger? *Psychopharmacol.* 2004;172: 241-47.

Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neurosci.* 1991;41: 89-125.

Higgins GA, Fletcher PJ. Serotonin and drug reward: focus on 5-HT_{2C} receptors. *Eur J Pharmacol.* 2003;480: 151-62.

Higgins GA, Jones BJ, Oakley NR, Tyers MB. Evidence that the amygdala is involved in the disinhibitory effects of a 5-HT₃ receptor antagonists. *Psychopharmacology* 1991;104:545-51.

Hodges H, Green S, Glenn B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. *Psychopharmacology* 1987;92:491-504.

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, 911-920.

Inoue K, Zorrilla EP, Tabarin A, Valdez GR, Iwasaki S, Kiriike N, Koob GF. Reduction of anxiety after restricted feeding in the rat: Implication for eating disorders. *Biol Psychiatry*. 2004;55:1075-81.

Jacobson LH, Bettler B, Kaupmann K, Cryan JF. Behavioral evaluation of mice deficient in GABAB(1) receptor isoforms in tests of unconditioned anxiety. *Psychopharmacol*. 2007;190(4): 541-53.

Jean A, Conductier G, Manrique C, Bouras C, Berta P, Hen R, et al. Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT₄ receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104: 16335-340.

Jones SR, O'dell SJ, Marshall JF, Wightman RM. Functional and anatomical evidence for different dopamine dynamics in the core and shell of the nucleus accumbens in slices of rat brain. *Synapse*. 1996;23: 224-231.

Kandov Y, Israel Y, Kest A, Dostova I, Verasammy J, Bernal SY, et al. GABA receptor subtype antagonists in the nucleus accumbens shell and ventral tegmental area differentially alter feeding responses induced by deprivation, glucoprivation and lipoprivation in rats. *Brain Res*. 2006;1082: 86-97.

Kash SF, Teccott LH, Hodge C, Baekkeskov, S., Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-KDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96: 1698-1703.

Kelley AE. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004; 27: 765-76.

Kelley AE, Andrzejewski ME, Baldwin AE, Hernandez PJ, Pratt WE. Glutamate-mediated plasticity in corticostriatal networks: role in adaptive motor learning. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1003: 159-168.

Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ. Corticostriatal–hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav.* 2005; 86: 73-95.

Kelley AE, Berridge KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci.* 2002;22: 3306-311.

Kelley AE, Swanson CJ. Feeding induced by blockade of AMPA and kainate receptors within the ventral striatum: a microinfusion mapping study. *Behav Brain Res.* 1997;89: 107-13.

Kennett GA, Cuzon G. Evidence that hypophagia induced by mCPP and TFMPP requires 5-HT_{1C} and 5-HT_{1B} receptors; hypophagia induced by RU 24969 only requires 5-HT_{1B} receptors. *Psychopharmacol.* 1988;96:93-100.

Kirby LG, Chou-Green JM, Davis K, Lucki I. The effects of different stressors on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res.* 1997;760 :218-30.

Kochenborger L, Zanatta D, Berreta LM., Lopes APF, Wunderlich BR, Januário AC, Marino-Neto J, Terenzi MG, Paschoalini MA, Faria MS. Modulation of fear/anxiety responses, but not food intake, following α -adrenoceptor agonist microinjections in the nucleus accumbens shell of free-feeding rats. *Neuropharmacol.* 2012;62: 427-35.

Lee MD, Kennett GA, Dourish CT, Clifton PG. 5-HT_{1B} receptors modulate components of satiety in the rat: behavioural and pharmacological analyses of the selective serotonin_{1B} agonist CP-94,253. *Psychopharmacol. (Berl)* 2002;164: 49-60.

Lee MD, Simansky K. CP-94,253: a selective serotonin_{1B} (5-HT_{1B}) agonist that promotes satiety. *Psychopharmacol.* 1997;131:264-70.

Lee MD, Somerville EM, Kennett GA, Dourish CT, Clifton PG. Tonic regulation of satiety by 5-HT receptors in the mouse: converging evidence from behavioural and c-fos immunoreactivity studies? *Eur J Neurosci.* 2004a;19: 3017-025.

Leibowitz SF, Alexander JT. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal, size, and body weight. *Biol Psychiatry*. 1998; 44: 851-64.

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.

Lin D, Parsons LH. Anxiogenic-like effect of serotonin_{1B} receptor stimulation in the rat elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Beh*. 2002;71: 581-87.

Lopes APF, Da Cunha IC, Steffens SM, Ferraz A, Vargas JC, De Lima TCM, Marino-Neto J, Faria MS, Paschoalini, M.A. GABAA and GABAB agonist microinjections into medial accumbens shell increase feeding and induce anxiolysis in an animal model of anxiety. *Behav Brain Res*. 2007;184,142-49.

Lopes APF, Ganzer L, Borges AC, Kochenborger L, Januário AC, Faria MS, Marino-Neto J, Paschoalini MA. Effects of GABA ligands injected into the nucleus accumbens shell on fear/anxiety-like and feeding behaviours in food-deprived rats. *Pharmacol Biochem Beh*. 2012;101: 41-8.

López-Alonso VE, Mancilla-Díaz JM, Rito-Domingo M, González-Hernández B, Escartín-Pérez RE. The effects of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2C} receptor agonists on behavioral satiety sequence in rats. *Neurosci Lett*. 2007; 416: 285-88.

Lowe AS, Beech JS, Williams SC. Small animal, whole brain fMRI: innocuous and nociceptive forepaw stimulation. *Neuroimage* 2007; 35: 719-728.

Lukkes JL, Forster GL, Renner KJ, Summers CH. Corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in the dorsal raphe differentially affect serotonin release in the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol*. 2008;578: 185-93.

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: 6779-788.

Mancilla-Diaz JM, Escartin-Perez RE, Lopez-Alonso VE, Floran-Garduño B, Romano-Camacho J. Role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the hypophagic effect of 5-HT on the structure of feeding behavior. *Med Sci Monit.* 2005;11: 74-9.

Martinez C, Ropero C, Funes A, Flores E, Blotta C, Landa AL, 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.

McDonald AJ, Mascagni F, Muller JF. Immunocytochemical localization of GABA(B) R1 receptor subunits in the basolateral amygdala. *Brain Res.* 2004;1018:147-58.

Meredith GE, Wouterlood FG, Pattiselanno A. Hippocampal fibers make synaptic contact with glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons in the rat nucleus accumbens. *Brain Res.* 1990;513: 329-34.

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.

Möhler H. GABA_A receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res.* 2006;326: 505-16.

Mombereau C, Kaupmann K, Froestl W, Sansig G, Van Der Putten H, Cryan JF. Genetic and pharmacological evidence of a role for GABAB receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacol.* 2004a;29:1050-62.

Mombereau C, Kaupmann K, Van Der Putten H, Cryan JF. Altered response to benzodiazepine anxiolytics in mice lacking GABAB(1) receptors. *Eur J Pharmacol.* 2004b;497: 119-20.

Moser PC, Sanger DJ. 5-HT_{1A} receptor antagonists neither potentiate nor inhibit the effects of fluoxetine and biefloxatone in the forced swim test in rats. *Eur J Pharmacol.* 1999;372: 127-34.

Neto SM, Silveira R, Coimbra NC, Joca SRL, Guimarães FS. Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. *Progr Neuro-Psychopharmacol Bio Psychiatry.* 2002;26: 1135-41.

Nonogaki K, Nozue K, Takahashi Y, Yamashita N, Hiraoka S, Kumano H, Kuboki T, Oka Y. Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, and 5-HT_{2C} receptor inactivation induce appetite-suppressing effects in mice via 5-HT_{1B} receptors. *J. Neuropsychopharmacol.* 2007;10: 675-81.

Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza A, Rodgers RJ. Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into ventral but not dorsal hippocampus in mice. *J. Psychopharmacol.* 1999;57 (Suppl. A).

Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza A, Da-Costa M, Fornari RV, Graeff FG, Pela IR. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacol.* 2000;150: 300-31.

Ohno Y. New insight into the therapeutic role of 5-HT_{1A} receptors in central nervous system disorders. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 2010;10:148-57.

Otoni EB. Etholog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav. Res. Methods Instrum. Comput.* 2000;32: 446-44.

Parker GC, Coscina DV. Lesions of the posterior basolateral amygdala block feeding induced by systemic 8-OH-DPAT. *Pharmacol. Biochem Behav.* 2001;68:729-34.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 6 ed. New York: Academic Press & Elsevier; 2007.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open and closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Neurosci Meth.* 1985; 14, 149-67.

Petrovich GD, Risold PY, Swanson LW. Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 1996;347: 387-92.

Petty F, Kramer G, Wilson L, Jordan S. *In vivo* serotonin release and learned helplessness. *Psychiatry Res.* 1994;52: 285-93.

Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL, Konradi C, Nestler EJ, Carlezon WAJr. 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.

Pontieri FE, 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* 1995;92: 12304-308.

Pratt WE, Blackstone K, Connolly ME, Skelly MJ. Selective serotonin receptor stimulation of the medial nucleus accumbens causes differential effects on food intake and locomotion. *Behav Neurosci.* 2009;123: 1046-57.

Pratt WE, Schall MA, Choi E. Selective serotonin receptor stimulation of the medial nucleus accumbens differentially affects appetitive motivation for food on a progressive ratio schedule of reinforcement. *Neurosci Letters.* 2012;511:84-8.

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: 3261-270.

Reynolds SM, Berridge KC. Glutamate motivation ensembles in nucleus accumbens: rostrocaudal shell gradients of fear and feeding. *Eur J Neurosci.* 17: 2187-200.

Richard JM, Berridge KC. Nucleus accumbens dopamine/glutamate interaction switches modes to generate desire versus dread: D1 alone for appetitive eating but D1 and D2 together for fear. *J Neurosci.* 2011;36: 12866-879.

Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30: 289-304.

Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF. Corticosteron and response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol Behav.* 1999;68: 47-53.

Rodgers RJ, Johnson NJT, Norton SJ, Cole JC. Effects of ritaserin and 1(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI) in the murine elevated plus-maze test of anxiety: an ethopharmacological study. *J Psychopharmacol.* 1995;9:38-42.

Roitman MF, Wheeler RA, Carelli RM. Nucleus accumbens neurons are innately tuned for rewarding and aversive taste stimuli, encode their predictors, and are linked to motor output. *Neuron.* 2005;45:587-97.

Rueter LE, Jacobs BL. A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations. *Brain Res.* 1996;739:57-69.

Rudolph U, Crestani F, Mohler H. GABAA receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22:188-94.

Sakae DY, Pereira LO, Da Cunha I C, De Lima T C M, Paschoalini MA, Faria M S. Systemic administration of a nitric oxide synthase inhibitor impairs fear sensitization in the plus-maze. *Neurobiology of Learning and Memory.* 2008;90:455-59.

Saller CF, Stricker EM. Hyperphagia and increased growth in rats after intraventricular injection of 5,7-dihydroxytryptamine. *Science.* 1976;192: 385-87.

Salamone JD, Correa M. Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav Brain Res.* 2002;137:3-25.

Sasaki K, Fan LW, Tien LT, Ma T, Loh HH, Ho IK. The interaction of morphine and γ -aminobutyric acid (GABA)ergic systems in anxiolytic behavior: using μ -opioid receptor knockout mice. *Brain Res Bull.* 2002;57:689-94.

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.

Shelly MJ, Guy EG, Howlett AC, Pratt WE. CB₁ receptors modulate the intake of a sweetened-fat diet in response to μ -opioid receptor stimulation of the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Beh.* 2010;97: 144-51.

Simansky KJ. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res.* 1996;73: 37-42.

Soderpalm AH, Berridge KC. Food intake after diazepam, morphine or muscimol: microinjections in the nucleus accumbens shell. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;66:429-34.

Solati J, Salari AA, Bakhtiari A. 5HT_{1A} and 5HT_{1B} receptors of medial prefrontal cortex modulate anxiogenic-like behaviors in rats. *Neurosci Lett.* 2011;504: 325-29.

Steffens SM, Da Cunha IC, Beckman D, Lopes APF, Faria MS, Marino-Neto J, Paschoalini MA. The effects of metergoline and 8-OH-DPAT injections into arcuate nucleus and lateral hypothalamic area on feeding in female rats during the estrous cycle. *Physiol Behav.* 2008;95:484-91.

Stork O, Yamanaka H, Stork S, Kume N, Obata K. Altered conditioned fear behavior in glutamate decarboxylase 65 null mutant mice. *Genes Brain Behav.* 2003;2:65-70.

Stratford TR. The nucleus accumbens shell as a model of integrative subcortical forebrain systems regulating food intake. In: Kirkham TC, Cooper SJ, editors. *Appetite and body weight: integrative systems and the development of antiobesity drugs*. London: Elsevier 2007;27-65.

Stratford TR, Kelley AE. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci*. 1997;17: 44434-440.

Stratford TR, Wirtshafter D. Effects of muscimol, amphetamine, and DAMGO injected into the nucleus accumbens shell on food-reinforced lever pressing by undeprived rats. *Pharmacol Biochem Beh*. 2012;101: 499-503.

Sturm V, Lenartz D, Koulousakis A, Treuer H, Herholz K, Klein JC. The nucleus accumbens: a target for deep brain stimulation in obsessive compulsive- and anxiety-disorders. *J Chem Neuroanat* 2003; 26, 293-299.

Summers CZ, Summers TR, Moore MC, Korzan WJ, Woodley SK, Ronan PJ, Höglund E, Watt MJ, Greenberg, N., Temporal patterns of limbic monoamine and plasma corticosterone response during social stress. *Neurosci*. 2003;116: 553-63.

Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science* 1997; 276, 2048-2050.

Usiello A, Sargolini F, Roullet P, Amassari-Teule M, Passino E, Oliverio A. N-Methyl-d-aspartate receptors in the nucleus accumbens are involved in detection of spatial novelty in mice. *Psychopharmacology* 1998;137,175-183.

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.

Vickers SP, Dourish CT. Serotonin receptor ligands and the treatment of obesity. *Curr. Opin. Investig Drugs* 2004;5: 377-88.

Voigt JP, Kienzle F, Sohr R. Feeding and 8-OH-DPAT-related release of serotonin in the rat lateral hypothalamus. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;65:183-89.

Voorn P, Vanderschuren LJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CM. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci.* 2004;27:468-74.

Wang ZJ, Rao ZR, Shi JW. Tyrosine hydroxylase-, neurotensin-, or cholecystokinin-containing neurons in the nucleus tractus solitarius send projection fibers to the nucleus accumbens in the rat. *Brain Res.* 1992;578:347-50.

Wheeler RA, Twining RC, Jones JL, et al. Behavioral and electrophysiological indices of negative affect predict cocaine self-administration. *Neuron.* 2008;57:774-85.

Wilkinson LS, Humby T, Killcross S, Robbins TW, Everitt BJ. Dissociations in hippocampal 5-hydroxytryptamine release in the rat following Pavlovian aversive conditioning to discrete and contextual stimuli. *Eur J Neurosci.* 1996;8:1479-87.

Wirtshafter D, Stratford TR. Evidence for motivational effects elicited by activation of GABA-A or dopamine receptors in the nucleus accumbens shell. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010;96:342-46.

Zaborszky L, Alheid GF, Beinfeld MC, Eiden LE, Heimer L, Paikovits M. Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience* 1985;14:427-53.

Zahm DS. An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000;24:85-105.

Zahm DS, Brog JS. On the significance of subterritories in the accumbens part of the rat ventral striatum. *Neurosci.* 1992;50: 751-67.

Zahm DS, Heimer L. Specificity in the efferent projections of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell. *J Comp Neurol.* 1993;27:220-32.

8. ANEXOS

8.1 Artigo publicado

Título: Effects of GABA ligands injected into the nucleus accumbens shell on fear/anxiety-like and feeding behaviours in food-deprived rats

Autores: Ana Paula Fraga Lopes, Laís Ganzer, Aline Caon Borges, Larissa Kochenborger, Ana Cláudia Januário, Moacir Serralvo Faria, José Marino-Neto, Marta Aparecida Paschoalini.

Revista: Pharmacology, Biochemistry and Behavior 101 (2012) 41–48.

Author's personal copy

Pharmacology, Biochemistry and Behavior 101 (2012) 41–48



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh



Effects of GABA ligands injected into the nucleus accumbens shell on fear/anxiety-like and feeding behaviours in food-deprived rats

Ana Paula Fraga Lopes^{a,*}, Laís Ganzer^a, Aline Caon Borges^b, Larissa Kochenborger^a, Ana Cláudia Januário^a, Moacir Serralvo Faria^a, José Marino-Neto^a, Marta Aparecida Paschoalini^a

^a Department of Physiological Sciences, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil
^b Institute of Psychology, University of Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 20 May 2011
 Received in revised form 24 October 2011
 Accepted 15 November 2011
 Available online 22 November 2011

Keywords:
 Muscimol
 Baclofen
 Bicuculline
 Salfoten
 Nucleus accumbens shell
 Fear/anxiety like
 Feeding behaviour
 Food-deprived

ABSTRACT

In an attempt to establish a relationship between food intake and fear/anxiety-related behaviours, the goal of this study was to investigate the effect of bilateral injections of GABA_A (Muscimol, MUS, doses 25 and 50 ng/side) and GABA_B (Baclofen, BAC, doses 32 and 64 ng/side) receptor agonists in the nucleus accumbens shell (AcbSh) on the level of fear/anxiety-like and feeding behaviours in 24 h food-deprived rats. The antagonists of GABA_A (Bicuculline, BIC, doses 75 and 150 ng/side) and GABA_B (Salfoten, SAC, doses 1.5 and 3 µg/side) were also tested. The results indicated that the total number of risk assessment behaviour decreased after the injection of both doses of GABA_A agonist (MUS) into the AcbSh of 24 h food-deprived rats exposed to elevated plus maze. Similar results were obtained after treatment with both doses of GABA_B (BAC) agonist in the AcbSh. These data indicated that the activation of both GABA_A and GABA_B receptors within the AcbSh caused anxiolysis in 24 h food-deprived rats. In addition, feeding behaviour (food intake, feeding latency and feeding duration) remained unchanged after treatment with both GABA agonists. In contrast, both food intake and feeding duration decreased after injections of both doses of BIC (GABA_A antagonist), while the feeding latency remained unchanged after treatment with both GABA antagonists in the AcbSh of 24 h food-deprived rats. The treatment with SAC (GABA_B antagonist) did not affect feeding behaviour. Collectively, these data suggest that emotional changes evoked by pharmacological manipulation of the GABA neurotransmission in the AcbSh are not linked with changes in food intake.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

8.2 Artigo Submetido

Título: Changes in fear/anxiety-like and feeding behaviours after the pharmacological manipulation of serotonergic neurotransmission within the nucleus accumbens shell

Autores: Ana Paula Fraga Lopes, Laís Ganzer, Larissa Kochenborger, Ana Paula Taschetto, Eduardo Simão da Silva, Ana Cláudia Januário, Moacir Serralvo Faria, José Marino Neto, Marta Aparecida Paschoalini.

Revista: Brain Research, número do manuscrito: BRES-D-12-00840

Dear Dr. Lopes,

Your submission, Changes in fear/anxiety-like and feeding behaviours after the pharmacological manipulation of serotonergic neurotransmission within the nucleus accumbens shell, for Brain Research has been received by the Editorial Office and will be processed as soon as possible.

You may log onto EES as an Author to view your submission at any time by entering these login details: <http://ees.elsevier.com/bres/>

Thank you.

The Editorial Office for Brain Research

BRAIN RESEARCH

[Contact us](#) Help ?
 Username: [anafragalopes](#)
 Role: Author

>> Maintenance outage on 9 September 2012 ... [more](#)

home | main menu | submit paper | [guide for authors](#) | register | [change details](#) | log out
Version: EES 2012

Submissions Needing Revision for Author Ana Paula Fraga Lopes

Click 'File Inventory' to download the source files for the manuscript. Click 'Revise Submission' to submit a revision of the manuscript. If you Decline To Revise the manuscript, it will be moved to the Declined Revisions folder.

IMPORTANT: If your revised files are not ready to be submitted, do not click the 'Revise Submission' link.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Date Revision Due	View Decision
Action Link	BRES-D-12-00840	Changes in fear/anxiety-like and feeding behaviours after the pharmacological manipulation of serotonergic neurotransmission within the nucleus accumbens shell.	Jun 13, 2012	Oct 10, 2012	Major Revisions Requested

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

8.3 Artigo como co-autor:

Título: Modulation of fear/anxiety responses, but not food intake, following α -adrenoceptor agonist microinjections in the nucleus accumbens shell of free-feeding rats

Autores: Larissa Kochenborger, Débora Zanatta, Luigi Marins Berretta, Ana Paula Fraga Lopes, Bruna Luiza Wunderlich, Ana Cláudia Januário, José Marino Neto, Mariana Graciela Terenzi, Marta Aparecida Paschoalini, Moacir Serralvo Faria

Revista: *Neuropharmacology* 62 (2012) 427-435.

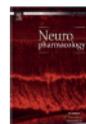
Neuropharmacology 62 (2012) 427–435



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm



Modulation of fear/anxiety responses, but not food intake, following α -adrenoceptor agonist microinjections in the nucleus accumbens shell of free-feeding rats

Larissa Kochenborger^a, Débora Zanatta, Luigi Marins Berretta, Ana Paula Fraga Lopes, Bruna Luiza Wunderlich, Ana Cláudia Januário, José Marino Neto, Mariana Graciela Terenzi, Marta Aparecida Paschoalini, Moacir Serralvo Faria^a

^aDepartment of Physiological Sciences, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), 880-40-900 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 April 2011
Received in revised form
10 August 2011
Accepted 11 August 2011

Keywords:
Nucleus accumbens
Clonidine
Phenylephrine
Elevated plus-maze
Anxiety
Food intake

ABSTRACT

This study investigated the effect of α -adrenoceptor agonists microinjected into the shell region of the accumbens nucleus (AcbSh) on feeding and anxiety-related behaviors in free-feeding rats. Male Wistar rats with a chronically implanted cannula into the AcbSh were unilaterally microinjected with either clonidine (CLON, α_2 -adrenoceptor agonist) or phenylephrine (PHEN, α_1 -adrenoceptor agonist) at the doses of 5 and 20 nmol and submitted to the elevated plus-maze (EPM), a pre-clinical test of anxiety. Immediately after the EPM test, the animals underwent food intake evaluation for 30 min. The data showed that rats microinjected with CLON (20 nmol/0.2 μ l) into the AcbSh exhibited increased 30 min arm time, which is compatible with an anxiolytic-like effect. The CLON-induced anxiolysis was corroborated by increased head-dipping and decreased stretched-attend posture, two ethologically derived behaviors which are fear/anxiety-motivated. The animal's locomotor activity was not changed by 20 nmol CLON microinjection into the AcbSh. However, neither dose of PHEN microinjected into the AcbSh was able to alter either the spatial-temporal or ethological variables representative of fear/anxiety and locomotion. Food intake was not altered by any dose of CLON and PHEN microinjected into the AcbSh, but the 20 nmol CLON microinjection induced increased motor activity in the feeding test. The data suggests that noradrenergic projections to the AcbSh may underlie fear/anxiety modulation through α_2 -adrenoceptor in the AcbSh, while feeding behavior was unaffected by noradrenergic modulation in the AcbSh of free-feeding rats.

This article is part of a Special Issue entitled 'Anxiety and Depression'.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.