



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA E COMPORTAMENTAL EM RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR EXTINÇÃO

CARLA BIESDORF DE ALMEIDA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Ciências Farmacêuticas (área de concentração – Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Milani
Orientadores estrangeiros:
Prof. Dr. Joseph Huston
Prof. Dra. Maria Angélica de Souza Silva

MARINGÁ, 2015

CARLA BIESDORF DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA E COMPORTAMENTAL EM RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR EXTINÇÃO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Ciências Farmacêuticas (área de concentração – Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Milani
Orientadores estrangeiros:
Prof. Dr. Joseph Huston
Prof. Dra. Maria Angélica de Souza Silva

MARINGÁ, 2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

A447a Almeida, Carla Biesdorf de
Avaliação neuroquímica e comportamental em ratos submetidos ao modelo de depressão induzida por extinção / Carla Biesdorf de Almeida. -- Maringá, 2015.
75 f. + anexos. : il. col., figs.
Orientador: Prof. Dr. Humberto Milani.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.
1. Depressão induzida - Extinção comportamental.
2. Núcleo accumbens. 3. Dopamina. I. Milani, Humberto, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 21.ed.615.78

CARLA BIESDORF DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA E COMPORTAMENTAL EM
RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE DEPRESSÃO
INDUZIDA POR EXTINÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 14 de julho de 2015

BANCA EXAMINADORA

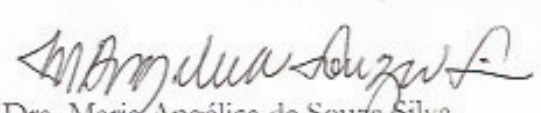


Dr. Humberto Milani

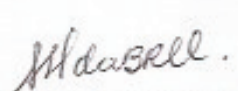
Dra. Célia Regina Ambiel



Dra. Cilene Lino de Oliveira



Dra. Maria Angélica de Souza Silva



Dra. Maria Ida Bonini Ravanelli Speziali

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais, que me apoiaram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me iluminar, me mostrar o caminho nas horas incertas e não me deixar desistir nos momentos mais difíceis.

À minha família, especialmente meus pais, Jair e Cleci, e minhas irmãs, Camila e Jeane, que estiveram sempre ao meu lado, apoiando e incentivando em todos os momentos e que não mediram esforços para minha formação pessoal e profissional.

À professora Dr^a Maria Angélica de Souza Silva, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela assistência intensiva, pelo exemplo de competência e dedicação, e por ser mais que uma orientadora, mas também uma amiga.

Ao Professor Dr^o Joseph Huston, por permitir a realização desse projeto, pela assistência e apoio diretos durante a realização dos estudos e pela enorme cooperação construtiva.

Ao Professor Dr^o Humberto Milani, pelo acolhimento e suporte durante a realização desse trabalho.

Aos meus amigos e também ao meu namorado, Thiago, que acompanharam e torceram pela realização desse trabalho.

Aos amigos que encontrei na Alemanha, especialmente Alice, pela amizade e companheirismo em todas as horas.

A todos os colegas do Instituto de Psicologia Experimental da Universidade Heinrich-Heine Düsseldorf, pelo suporte e cooperação na realização desse trabalho.

À Helena e demais funcionários, bem como os professores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste sonho.

“Geld ist rund und rollt weg, aber Bildung bleibt”

Heinrich Heine (1797-1856)

BIESDORF, C 2015. Avaliação neuroquímica e comportamental em ratos submetidos ao modelo de depressão induzida por extinção. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 92p.

RESUMO

Fundamentação: A ausência ou perda de recompensas ou reforços tem um importante papel no desenvolvimento de depressão em humanos. Estudos utilizando microdiálise em ratos tem mostrado que estímulos apetitosos liberam dopamina (DA) nas porções central (miolo = 'core') e periférica (casca = 'shell') do Núcleo accumbens (NAc). Não está claro, porém, como a extinção de uma recompensa afeta os níveis de DA. **Objetivo:** Avaliar como a oferta e a extinção da recompensa (comida) afeta o comportamento e a liberação de DA no NAc de ratos submetidos ao modelo de depressão induzida por extinção. **Metodologia:** A técnica de microdiálise *in vivo* foi utilizada para quantificação dos níveis de DA no NAc. Ratos Wistar machos foram treinados a receber recompensa (comida) associada às lâmpadas sinalizadoras, sendo que a extinção era provocada pela apresentação das lâmpadas sinalizadoras, porém, sem a comida. Diferentes protocolos foram usados para verificar os efeitos da extinção sobre o comportamento e os níveis de DA e seus metabólitos. **Resultados:** (a) durante o período de recompensa sinalizada, o nível de DA aumentou significativamente no centro do NAc, mas não na periferia; (b) os níveis de DA permaneceram igualmente aumentados frente à extinção (lâmpadas sinalizadoras sem recompensa) e à não-extinção (ausência das lâmpadas sinalizadoras); (c) quando instituída 1 hora após a recompensa, a extinção provocou um redução no nível de DA somente na porção central do NAc. Efeito similar apareceu quando a extinção foi instituída 24 horas após a recompensa; (d) o comportamento de autolimpeza se mostrou estar associado à extinção, enquanto que olhares em direção às luzes sinalizadoras poderiam indicar uma resistência à extinção. **Conclusão:** (a) a presença da recompensa foi acompanhada de um aumento nos níveis de DA no centro do NAc, indicando a importância desse neurotransmissor nos estados emocionais relacionados à gratificação; (b) os resultados evidenciam que a retirada de uma recompensa esperada (equivalente à frustração) vem acompanhada de uma diminuição nos níveis de DA no centro do NAc, mas não na sua periferia; (c) esta diminuição de DA aparece apenas após um intervalo entre recompensa e extinção, provavelmente devido ao fato de ser mascarada pela persistência da liberação de DA pós recompensa. Esses dados sugerem, portanto, que a diminuição da liberação de DA induzida por extinção na porção central do NAc pode ser um marcador de depressão/desespero decorrente da perda de recompensas/reforços esperados.

Palavras-chave: depressão, extinção, microdiálise *in vivo*, núcleo accumbens, dopamina

BIESDORF, C 2015. Neurochemical and behavioural assessment in rats submitted to the extinction-induced depression model. Ph.D. Thesis, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 92p.

ABSTRACT

Introduction: The absence of or loss of rewards or reinforces hold a major role in the development of depression in humans. Microdialysis studies in rats have generally shown that appetitive stimuli release dopamine (DA) in the nucleus accumbens (NAc). However, it is not clear how the extinction of a reward affect the DA release. **Aim:** Assessing the behavior and the release of DA in the NAc during delivery and extinction of reward (food) in rats submitted to the extinction-induced depression model. **Methods:** *In vivo* microdialysis was used to quantify the levels of DA in the NAc. Male Wistar rats were trained to receive food reward associated with appearance of cue-lights. The extinction happened when the cue-lights were presented without the reward. Different protocols were used to assess the effects of extinction on the behavior and on the levels of DA and its metabolites. **Results:** (a) during the period of cued reward delivery, DA levels increased significantly in the NAc core but not in the NAc shell; (b) the level of DA remained increased during extinction (the absence of reward with the cue lights presented) e non-extinction (absence of cue-lights); (c) when extinction was administered 1 hr after the reward, DA significantly decreased in the NAc core, but not in the NAc shell. The same happened when the extinction was administered 24 hrs after the last reward session; (d) grooming seems to be an extinction-induced behavior, and the glances toward the cue-lights an index of resistance to extinction. **Conclusions:** a) these results confirm the importance of dopamine release in the nucleus accumbens for reward-related states, with DA increasing in the core, but not shell subregion; b) provide evidence that during the withholding of expected reward, DA decreases in the NAc core, but not shell region; c) this decrease in DA appears only after a delay between delivery of reward and extinction likely due to it being masked by persisting post-reward DA release. We hypothesize the decrease in extinction-induced release of DA in the Nac core to be a marker for the despair/depression that is known to accompany the loss of expected rewards/reinforcers.

Keywords: depression, extinction, *in vivo* microdialysis, nucleus accumbens, dopamine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de síntese dos hormônios esteroides pelo córtex adrenal.	14
Figura 2: Mecanismo de secreção de glicocorticoides	14
Figura 3: Componentes primários que controlam os disparos dos neurônios dopaminérgicos e o sistema no qual eles atuam para o controle do comportamento motivacional.	20
Figura 4: Síntese e metabolização da DA.	21
Figura 5: Compartimentalização funcional apresentada pelas vias dopaminérgicas do NAc.	22
Figura 6: Vista lateral (acima à esquerda) e superior (abaixo à esquerda) da câmara de teste. (Direita) Parede contendo o dispensador de pellets, lâmpada de iluminação difusa e três lâmpadas coloridas de sinalização - verde, amarela e vermelha.	30
Figura 7: (A) Protocolo pré-diálise. (B) Experimento 1: Protocolo no dia da microdiálise (dia 13). (C) Experimento 2: Protocolo no dia da microdiálise.	33
Figura 8: Representação esquemática do posicionamento das sondas de diálise no NAc core e shell.	38
Figura 9: Níveis de DA, DOPAC e HVA no NAc core e shell expressos como média (+EPM) da porcentagem da linha de base, com a média de seis amostras de linha de base tomadas como 100%.	42
Figura 10: Duração e frequência de levantamentos (A e B), autolimpeza (C e D), permanência no dispensador de pellets (E e F) e olhares em direção às lâmpadas sinalizadoras (G e H).	47
Figura 11: Níveis de DA, DOPAC e HVA no NAc core e shell expressos como média (+EPM) per cento da linha de base, com a media das 3 linhas de base tomadas como 100%.	50
Figura 12: Nível de progesterona em ng/mL.	51
Figura 13: Nível de aldosterona in ng/mL.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - Serotonina

ACTH - Hormônio Adrenocorticotrópico (*adrenocorticotropic hormone*)

AD - Adrenalina

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COMT - Catecol-O-metiltransferase

CRH – Hormônio de Liberação de Corticotropina (*corticotropin-releasing hormone*)

DA - Dopamina

DE- Detecção Eletroquímica

DHEA - Desidroepiandrosterona

DIE - Depressão Induzida por Extinção

DOPAC - Ácido Dihidroxifenilacético

EC - Estímulo Condicionado

EI - Estímulo Incondicionado

NAc - Núcleo Accumbens

NE - Norepinefrina

HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal

HVA - Ácido Homovanílico

ISRS - Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina

MAO - Monoamina oxidase

PET - Tomografia por Emissão de Pósitrons (*Positron emission tomography*)

VTA - Área Tegmental Ventral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. DEPRESSÃO	12
1.2. DEPRESSÃO E ESTRESSE	13
1.3. MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR EXTINÇÃO (DIE)	15
1.4. SISTEMA MESOLÍMBICO DOPAMINÉRGICO	19
1.4.1. A neurotransmissão dopaminérgica	20
1.4.2. Núcleo Accumbens	23
1.5. MICRODIÁLISE <i>IN VIVO</i>	26
2. OBJETIVOS	28
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. ANIMAIS	29
4.2. MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR EXTINÇÃO	29
4.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	30
4.4. PROCEDIMENTO DE MICRODIÁLISE	31
4.5. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	31
4.6. ANÁLISE DE ESTEROIDES	31
4.7. HISTOLOGIA	32
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5. RESULTADOS	37
5.1. EXPERIMENTO 1: Níveis de DA e metabólitos no NAc e análise comportamental durante recompensa e extinção	37
5.2. EXPERIMENTO 2: Níveis de DA e metabólitos no NAc durante recompensa e extinção atrasada	48
5.3. ANÁLISE DE ESTEROIDES	50
6. DISCUSSÃO	52
6.1. ANÁLISE NEUROQUÍMICA E COMPORTAMENTAL	52
6.2. ANÁLISE DE ESTEROIDES	57
7. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. DEPRESSÃO

Além de ser o transtorno psiquiátrico mais comum, a depressão é uma condição médica incapacitante, podendo representar uma das principais causas de invalidez até 2030 (WHO, 2008).

As desordens depressivas apresentam uma alta prevalência, sendo que um em cada sete indivíduos passará por uma experiência depressiva durante a sua vida. Ainda, muitas dessas pessoas apresentarão a depressão de forma recorrente ou crônica, causando um substancial prejuízo na função psicossocial. Logo, os custos da depressão são altos, tanto os diretos, relacionados com o tratamento médico e farmacológico, como os indiretos, devido à ausência no trabalho e diminuição da produtividade do indivíduo (LAW, 2012).

Dependendo da região geográfica, a depressão é 1,6 a 3 vezes mais comum em mulheres do que em homens e a idade para início dos sintomas varia entre 24-35 anos com média aos 27 anos, havendo atualmente uma tendência para início entre os mais jovens, já que 40% dos indivíduos depressivos tem seu primeiro episódio depressivo antes dos 20 anos e 50% entre os 20 e 50 anos. Ainda, pacientes depressivos apresentam risco de mortalidade duas vezes maior, devido a causas diretas (suicídio) ou indiretas (presença de outras doenças) (LAW, 2012).

Sabe-se que a síndrome depressiva, bem como sua etiologia, não são fenômenos unitários. Ao contrário, o termo depressão engloba uma classe heterogênea de problemas e comportamentos depressivos com muitos fatores causais, incluindo hereditariedade, experiências que podem interagir entre si (susceptibilidade genética, ocorrência de doenças incapacitantes, abuso de substâncias, situações ambientais agudas e crônicas, estresse), e mecanismos bioquímicos e neurais subjacentes que estão disfuncionais e podem ser alvo de terapias farmacológicas e comportamentais (HUSTON e cols., 2013).

Apesar do Manual Diagnóstico e Estatístico de Desordens Mentais (ASSOCIAÇÃO AMERICANA PSIQUIÁTRICA, 2013) diferenciar entre depressão resultante de abuso de drogas, de dano cerebral ou relacionada com fator médico, o diagnóstico da depressão maior é simplesmente baseado na ocorrência de um número específico de sintomas sem levar em consideração diferentes causas.

A ausência ou perda de recompensas ou reforços tem um importante papel no desenvolvimento de desordem depressiva em humanos. O impacto da perda de fontes de recompensa na latência e manutenção de doenças psiquiátricas, especialmente depressão,

é bem conhecido na clínica (LEVENTHAL, 2008), e várias linhas de pesquisa suportam tal hipótese (HAMMEN, 2005).

É comumente aceito que a perda ou a extinção de recompensas frequentemente resultam em consequências comportamentais e emocionais em humanos, como frustração (DOUGLAS; PARRY, 1994), agressão (KELLY; HAKE, 1970), tristeza ou raiva (KELLER; NESSE, 2005; LEWIS; RAMSEY, 2005), choro (KELLER; NESSE, 2005; LEWIS e cols. 1990), agitação e redução de felicidade (OTT et al., 2011). Outra consequência da perda de recompensas em humanos é o comportamento de esquiva e fuga ou retirada, que também representa sintomas da síndrome depressiva, já que evidências sugerem que mudanças no contingente de reforços que precede e mantém os sintomas depressivos estão relacionadas com a esquiva comportamental e cognitiva (CARVALHO; HOPKO, 2011; LEVENTHAL, 2008; TREW, 2011).

Em humanos, a perda de recompensas se encaixa na categoria de eventos estressantes, como perda de emprego, término de relacionamento, condição de saúde e física, morte ou separação de familiares ou amigos, e está frequentemente relacionada com a ocorrência de episódios depressivos (HAMMEN, 2005). Também se tem mostrado uma relação entre esses tipos de eventos e a ocorrência do primeiro episódio depressivo (HORESH; IANCU, 2010), já que em cerca de 90% de mulheres depressivas, um episódio depressivo foi precipitado por um evento envolvendo uma perda severa (BROWN e cols., 1986). Além disso, a perda de recursos monetários em um período de 10 anos foi associada com um aumento dos sintomas depressivos, enquanto que o ganho de recursos foi associado com uma diminuição (HOLAHAN e cols., 1999). Ainda, tratamentos comportamentais para depressão mental têm focado em procedimentos que objetivam o aumento da atividade comportamental dos pacientes, promovendo acesso a reforços positivos (HOPKO e cols., 2003). Estas terapias também tem a intenção de restaurar a habilidade prejudicada de explorar ou perceber recompensas potenciais (ESHEL; ROISER, 2010).

1.2. DEPRESSÃO E ESTRESSE

A ausência na entrega de recompensa estabelecida previamente induz a cessação e, logo, a extinção do comportamento que antes ocorria com a recompensa. Tal extinção é percebida como estressante ou aversiva aos organismos e pode inicialmente gerar um comportamento agressivo (PAPINI; DUDLEY, 1997) e ser acompanhada pelo aumento da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e pelo aumento da secreção de cortisol/corticosterona (COOVER; GOODMAN; LEVINE, 1971; KAWASAKI; IWASAKI, 1997).

O cortisol e a corticosterona são sintetizados a partir do colesterol (Figura 1) e secretados pelo córtex da glândula adrenal, sendo controlados pelo eixo HPA, por meio do hormônio adrenocorticotrópico (*adrenocorticotropic hormone*, ACTH) secretado pela hipófise (Figura 2).

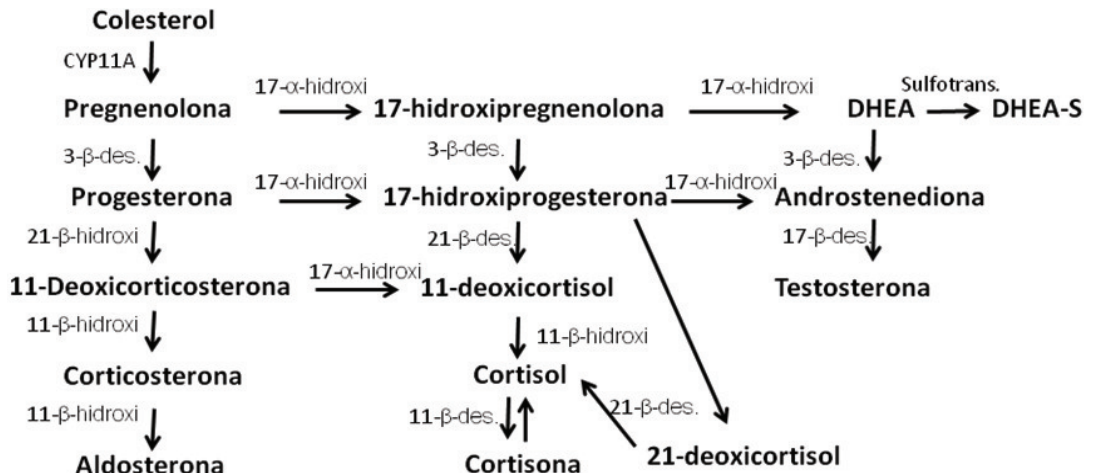


Figura 1: Vias de síntese dos hormônios esteroides pelo córtex adrenal.

De forma sucinta, situações de estresse ativam o sistema límbico que transmite para o hipotálamo, o qual secreta o hormônio de liberação de corticotropina (*corticotropin-releasing hormone*, CRH) no plexo capilar do sistema porta-hipofisiário. O CRH é transportado até a hipófise anterior onde induz a secreção de ACTH, o qual irá promover a secreção de cortisol pelo córtex adrenal. O cortisol exerce efeitos diretos de *feedback* negativo sobre o hipotálamo (diminuindo a formação de CRH) e sobre a hipófise anterior (diminuindo a formação de ACTH), porém estímulos estressores potentes e/ou persistentes podem superar esse *feedback* inibitório direto do cortisol, causando exacerbações da secreção do mesmo (JOELS; BARAM, 2009).

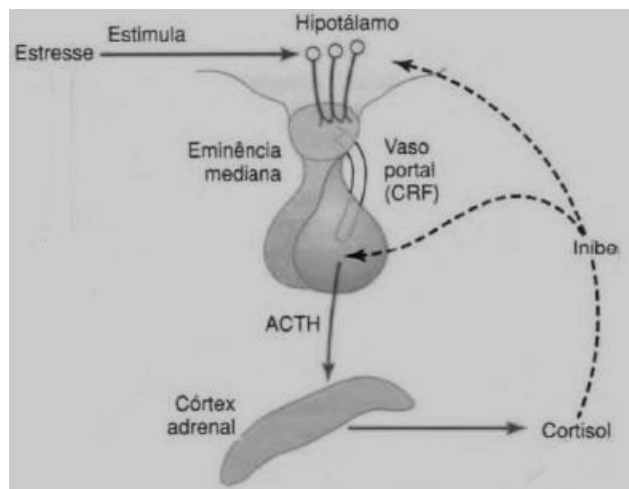


Figura 2: Mecanismo de secreção de glicocorticoides (Reproduzido de GUYTON; HALL, 2011)

Experiências de perda ou extinção de recompensas frequentemente são acompanhadas de mudanças semelhantes à resposta de estresse psicológico, como elevado nível de cortisol (LEWIS; RAMSEY, 2005; OTT e cols., 2011), aumento na frequência cardíaca (LEWIS e cols., 2004) e pressão sanguínea (DOOB; KIRSHENBAUM, 1973). Em humanos, elevados níveis de cortisol acompanham anedonia e insensibilidade frente a recompensas (DAVIDSON e cols., 2002; BODGAN; PIZZAGALLI, 2006), sendo que uma excessiva e prolongada secreção de cortisol e uma disfunção do eixo HPA aparece na maioria dos pacientes previamente ao primeiro episódio depressivo (STOKES, 1995; PARIANTE; LIGHTMAN, 2010; COWEN, 2010). Além disso, a quantidade de cortisol no plasma é altamente correlacionada com os níveis de depressão (HINKELMANN e cols., 2012) e resulta em redução de receptores de glicocorticoides no hipocampo, atrofia hipocampal, hiperatividade da amígdala, diminuição da neurogênese e falta de neurotrofinas (MCEWEN, 1999a; 1999b; MALBERG e cols., 2000; GOLD; DEVRETS; CHARNEY, 2002). Estas mudanças impedem a regulação de *feedback* negativo e desinibe a atividade do eixo HPA (MIZOGUCHI e cols., 2003). Também tem se mostrado que antidepressivos reduzem significativamente a liberação de cortisol, aumentam a neurogênese (MALBERG e cols., 2000) e reestabelecem a atividade circadiana do eixo HPA (THOMSON; CRAIGHEAD, 2008).

1.3. MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR EXTINÇÃO (DIE)

Uma poderosa fonte de sucesso, contentamento e bem-estar em humanos é o resultado de recompensas/reforços. Adicionalmente, teorias do comportamento condicionado e operante explicam sintomas depressivos como resultado da diminuição da recompensa ambiental (FERSTER, 1973; LEWINSOHN, 1974). Diversos experimentos em animais têm demonstrado o poder de recompensas para estabelecer e manter uma variedade de comportamentos, denominados comportamentos condicionado e operante ou instrumental.

Um comportamento animal é dito condicionado quando apresenta uma reação a um estímulo originalmente neutro que é similar à reação que teria ao próprio estímulo proeminente. No condicionamento clássico ou Pavloviano, a reação do animal não pode controlar o aparecimento do estímulo proeminente, enquanto que no condicionamento operante ele pode. No condicionamento clássico as condições são programadas para que certo som ou luz (ou meio ambiente) seja sempre (ou na maior parte do tempo) automaticamente seguido da entrega de comida (recompensa) ou de choque nas patas (punição). O animal reagirá ao som ou à luz como reagiria à comida ou ao choque. O som e a luz são chamados de estímulos condicionados (EC), enquanto a comida e o choque são

denominados estímulos incondicionados (EI). No condicionamento operante o animal reage ao estímulo com uma resposta/ação (exemplo: pressionamento de uma alavanca) para conseguir alguma coisa e atingir o objetivo, seja a apresentação de uma recompensa ou fuga de um perigo. Entretanto, os mecanismos Pavlovianos estão fortemente envolvidos no condicionamento operante, logo, na prática é difícil estudar os dois separadamente (FEENSTRA, 2007).

Uma vez que a relação entre um comportamento específico ou padrão comportamental e a obtenção da recompensa é estabelecida, o organismo pode antever a recompensa/reforço. Quando tal recompensa é cessada, o organismo aprende que a resposta adaptativa anterior não é mais efetiva para conduzir a recompensa e, gradativamente, para de emití-la. O comportamento que previamente foi bem sucedido para prever o evento recompensador é dito sob “extinção” como consequência da indisponibilidade da recompensa. Logo, tal evento não terá apenas consequências para o comportamento do organismo, mas também efeitos emocionais negativos como ansiedade, desespero, frustração, aflição, estresse e depressão. Tal comportamento depressivo resultante da perda de recompensa é designado como depressão induzida por extinção (HUSTON e cols., 2013). Ainda, a extinção pode ser definida como o desaparecimento de uma resposta condicionada após um treinamento na ausência de um EI (IKEMOTO, 2007).

Pode-se diferenciar três categorias de eventos ambientais que causam desespero e depressão: eventos aversivos ou punitivos; ausência de potencial reforço; e retirada de recompensa, que resulta na extinção do comportamento condicionado. Para o primeiro caso, pode-se citar modelos comportamentais como teste do nado forçado (PORSOLT e cols., 1977) e teste de suspensão de cauda (CRYAN e cols., 2005). No segundo caso, tem-se o teste de privação social e maternal (FONE; PORKESS, 2008; HALL, 1998; MARCO e cols., 2009; MATSUMOTO e cols., 2005). No terceiro evento, segundo o modelo de depressão induzida por extinção (DIE), a ausência de reforços ou a retirada de recompensa (no caso de antecipação aprendida do ganho da recompensa) pode causar comportamentos classificados como relacionados à “depressão”.

Existe obviamente uma enorme necessidade por novos modelos animais comportamentais de depressão, o que tem sido argumentado em várias publicações (ANISMAN; MATHESON, 2005; BERTON e cols., 2012; EDWARDS; KOOB, 2012; NESTLER; HYMAN, 2010). Enquanto considerável esforço tem sido devotado para modelos genéticos e moleculares de doenças mentais (KRISHNAN; NESTLER, 2011; NESTLER; HYMAN, 2010), tem havido pouco progresso no desenvolvimento de modelos comportamentais com definições operacionais de sintomas de doenças, sem os quais modelos animais moleculares têm relevância questionável, já que estes são dependentes de uma leitura comportamental para validá-los como sendo relacionados com a depressão

(HUSTON e cols., 2013). No que diz respeito à DIE em humanos, poucas tentativas tem sido feitas para estabelecer um modelo animal relacionado. Porém, devido à estreita relação entre a ausência de recompensa e a ocorrência de desordens afetivas, especialmente a síndrome depressiva maior, Huston e colaboradores (2013) têm examinado os efeitos da extinção no comportamento de roedores.

Primeiramente, é útil diferenciar entre dois tipos de extinção comportamental baseados na natureza da recompensa/reforço que é aplicada no procedimento de condicionamento, chamados de reforços positivo ou negativo. Reforço positivo refere-se a um aumento no comportamento como resultado da apresentação de um estímulo apetitoso, sendo que a apresentação de tal estímulo aumentará a probabilidade de que um comportamento precedente seja repetido mais frequentemente em um contexto similar. Já o reforço negativo remete a um aumento no comportamento que conduz a cessação de um estímulo aversivo (HUSTON e cols., 2013).

Inicialmente, os estudos foram focados na extinção do comportamento reforçado negativamente, o que gerou evidências de que os efeitos comportamentais do procedimento de extinção se assemelham com aqueles encontrados em outros modelos animais de depressão. No labirinto aquático de Morris, onde roedores aprendem a escapar de uma condição aversiva na água para uma plataforma submersa (reforço negativo), o tempo de imobilidade aumentou com as tentativas, quando a plataforma não estava mais presente (perda do reforço negativo – extinção) (SCHULZ e cols., 2007a; SCHULZ e cols., 2007b; SCHULZ e cols., 2004). Esta imobilidade induzida por extinção foi atenuada pelo tratamento com o antidepressivo desipramina (SCHULZ e cols., 2007a) e correlacionada com comportamentos ansiosos (SCHULZ e cols., 2007a, 2007b), simulando a comorbidade com desordens da ansiedade encontrada em pacientes humanos (MINEKA; WATSON; CLARK, 1998). Além disso, inúmeras alterações neurobiológicas têm sido vistas na desordem depressiva, incluindo marcadores do estresse no eixo HPA, mudanças em neurotransmissores monoaminérgicos, como também de neurotrofinas, em regiões específicas do cérebro envolvidas com a depressão, e que foram acompanhadas de alterações comportamentais encontradas após extinção (SCHULZ e cols., 2004; TOPIC e cols., 2008a,b; HUSTON; SCHULZ; TOPIC, 2009), suportando a hipótese de que o procedimento de extinção em roedores conduz a comportamentos depressivos.

A extinção resulta ainda em elevados níveis de corticosterona em roedores (COOVER e cols., 1971; KAWASAKI; IWASAKI, 1997), indicando que a perda do reforço representa estresse para o animal. Mais além, durante a extinção operante, ratos apresentam uma maior variedade espacial (DEVENPORT, 1984) e respondem com aumento de agressividade (AZRIN e cols., 1966; DANTZER e cols., 1980), ativação motora (FLAHERTY e cols., 1979; FLAHERTY, 1982), comportamento ansioso (KOMOROWSKI e

cols., 2012; SCHULZ e cols., 2007a) ou resposta de fuga (BENTOSELA e cols., 2008; DALY, 1974; HUSTON e cols., 2012; KOMOROWSKI e cols., 2012; NORRIS e cols., 2009).

Dada à importância que a perda de reforços positivos tem sobre o comportamento emocional em humanos (CARVALHO; TRENT; HOPKO, 2011; FERSTER, 1973), também se tem realizado experimentos utilizando o modelo de DIE baseado no reforço positivo derivado da recompensa (comida) (HUSTON e cols., 2012; KOMOROWSKI e cols., 2012). A hipótese de que a retirada da recompensa positiva durante extinção poderia servir como um marcador comportamental de um estado depressivo foi verificada utilizando um paradigma de entrega de recompensa sinalizada por sinais luminosos em intervalos fixos em uma câmara alongada, como também pelo reforço com comida em resposta ao pressionamento de uma alavanca usando uma caixa de Skinner (*Skinner-box*) conectada a uma câmara de retirada (HUSTON e cols., 2012; KOMOROWSKI e cols., 2012). Estes estudos mostraram que antidepressivos atenuam o comportamento de levantamento (*rearing*) e de mordidas durante a extinção na câmara com dois compartimentos (HUSTON e cols., 2012). O tratamento com antidepressivos também reduziu o comportamento de esquiva, expresso pelo número de entradas e pelo tempo de permanência no local de pressionamento da alavanca, e a distância percorrida na câmara operante alongada (HUSTON e cols., 2012; KOMOROWSKI e cols., 2012). Adicionalmente, o procedimento de extinção induziu efeitos ansiogênicos no teste do campo aberto, que foram atenuados por antidepressivo (KOMOROWSKI e cols., 2012). Estes resultados indicam que os comportamentos de retirada e esquiva, que são sintomas comuns na depressão, podem servir como marcadores da DIE.

Usando uma câmara operante, Topic e colaboradores (2012) mostraram também que os antidepressivos são capazes de suprimir o comportamento de levantamento durante o procedimento de extinção, sendo que este comportamento reflete uma reação de fuga ou esquiva, indicando que este comportamento pode servir também como um marcador do comportamento depressivo. Uma vez que o modelo de DIE mimetiza sintomas da depressão maior, ou sejam, comportamentos de retirada e esquiva, os quais são sensíveis ao tratamento com drogas antidepressivas, ele preenche os requisitos de validade de construto (ou seja, o quanto o modelo reproduz os mecanismos neurobiológicos da doença) e validade preditiva (ou seja, se o comportamento induzido no animal pode ser revertido ou prevenido com o tratamento utilizando-se os fármacos eficazes em humanos para aquela condição), requisitos estes essenciais para a validação de um determinado modelo animal (TOPIC e cols., 2012).

Vale ressaltar ainda, que durante o procedimento de extinção, um organismo aprende que um EC, um sinal para um psicologicamente EI potente, não mais prediz o EI, e a consequência é que o comportamento promovido pelo EC diminui. Apesar da extinção

envolver uma diminuição da resposta, também geralmente implica uma nova aprendizagem, ao invés de desaprendizado (BOUTON 2004; RESCORLA, 2001). Esse fenômeno segue o princípio de que a extinção envolve novo aprendizado que é dependente do contexto (BOUTON, 2002; 2004). Sendo que quatro contextos e/ou fenômenos indicam que a extinção não destrói o aprendizado original, ou seja: reestabelecimento, renovação, recuperação espontânea e reaquisição rápida. O reestabelecimento ocorre quando um EC é apresentado sozinho após extinção, o que causa reestabelecimento da resposta extinguida. A renovação é a recuperação do comportamento extinguido que ocorre quando o contexto é mudado após a extinção. A recuperação espontânea ocorre certo tempo após a extinção e a resposta extinguida pode se recuperar quando o EC é testado novamente, logo a passagem do tempo pode prover naturalmente uma mudança no contexto. E por fim a reaquisição que ocorre quando o EC é pareado com o EI novamente após a extinção (BOUTON, 2002).

1.4. SISTEMA MESOLÍMBICO DOPAMINÉRGICO

A patofisiologia da depressão consiste de alterações em sistemas neurotransmissores e neuroendócrino, sendo os mais estudados e extensamente revisados os das monoaminas, como dopamina (DA), norepinefrina (NE) e serotonina (5-HT), como também o eixo HPA (NEMEROFF, 1998; LEONARD, 2000).

A hipótese monoaminérgica da depressão postula que a desordem depressiva é causada por uma diminuição da função das monoaminas no cérebro, e grande parte dos fármacos antidepressivos disponíveis atualmente agem reestabelecendo essa função, como os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), os inibidores da enzima monoamina oxidase (MAO) e os tricíclicos (BERTON; NESTLER, 2006). Entretanto, esses fármacos têm mostrado apenas uma taxa moderada de resposta, com aproximadamente 30-40% dos pacientes não respondendo ao tratamento, além da longa latência para o início do efeito clínico (TRIVEDI e cols., 2006; HOLTZHEIMER; MAYBERG, 2011). Portanto, estudos adicionais são necessários visando o desenvolvimento de melhores estratégias de tratamento.

Uma razão para a falta de progresso no desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos é que grande parte das pesquisas têm focado nos estudos de drogas já disponíveis e não nos diferentes estados depressivos. Logo há uma necessidade de maior entendimento dos substratos neurais que estão anormais na depressão e síndromes relacionadas. A possibilidade de que a depressão compreende distintos estados da doença também aumenta a possibilidade de diferentes subtipos de depressão serem mediados por patologias localizadas em diferentes regiões cerebrais, as quais devem ser responsivas a diferentes tipos de tratamento (NESTLER; CARLEZON, 2006).

Grande atenção tem sido dada ao envolvimento do hipocampo e do córtex frontal nas desordens do humor, porém existem evidências de que outras regiões também estão envolvidas, como o núcleo accumbens (NAc), que faz parte do estriado ventral, e suas vias dopaminérgicas vindas da área tegmental ventral (VTA), ou seja, o sistema mesolímbico dopaminérgico. Tais estruturas e/ou circuitos devem desempenhar importante papel na mediação dos efeitos de recompensa em relação à comida, sexo e drogas de abuso (NESTLER; CARLEZON, 2006). A Figura 3 ilustra, esquematicamente, a relação anatomo-funcional entre tais estruturas, e os mecanismos que controlam a atividade do sistema mesolímbico dopaminérgico e a motivação (GRACE e cols., 2007).

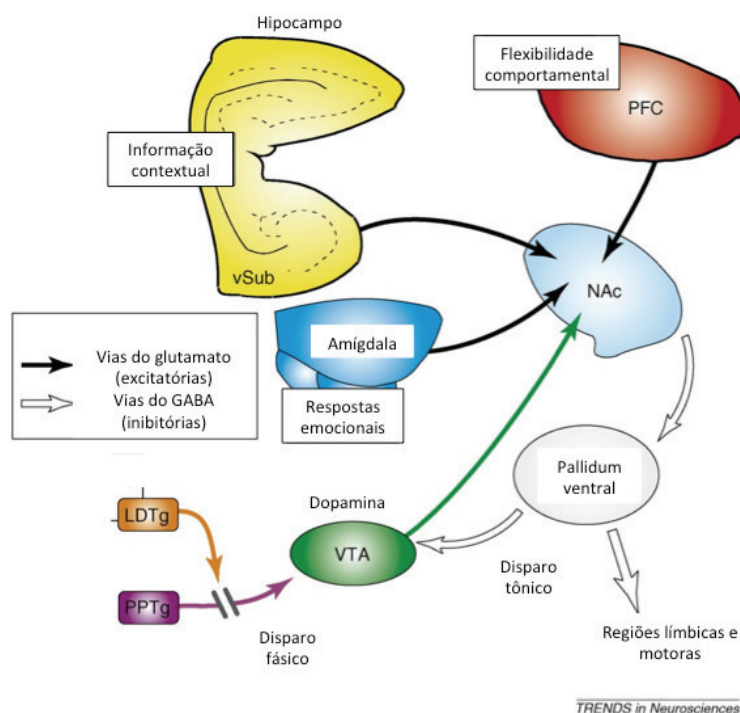


Figura 3: Componentes primários que controlam os disparos dos neurônios dopaminérgicos e o sistema no qual eles atuam para o controle do comportamento motivacional. As atividades tônica e fásica dos neurônios da VTA são reguladas pelas vias vindas do *pallidum ventral* e dos núcleos tegmentais (*pedunculopontine tegmentum* (PPTg) e *laterodorsal tegmentum* (LDTg)), respectivamente. Já a dopamina (DA) regula a interação entre os sistemas de alto nível (hipocampo, córtex pré-frontal (PFC), e amígdala), controlando diferentes aspectos do comportamento dentro do NAc. A saída integrada destas interações é então canalizada no sistema *pallidum ventral* para as regiões de controle límbico e motor (Fonte: GRACE e cols., 2007, com modificação).

1.4.1. A neurotransmissão dopaminérgica

A síntese de DA consiste na conversão da tirosina em dopa, seguida pela descarboxilação para formar DA. Ela é capturada em grande parte após sua liberação nas terminações nervosas por um transportador específico de DA e metabolizada pela MAO e catecol-O-metiltransferase (COMT), sendo os principais produtos o ácido diidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA, derivado metóxi do DOPAC) (Figura 4). O conteúdo de HVA no cérebro é frequentemente utilizado como índice de renovação da DA, já que

fármacos que promovem liberação de DA aumentam a concentração de HVA sem alterar a concentração de DA (RANG e cols., 2004).

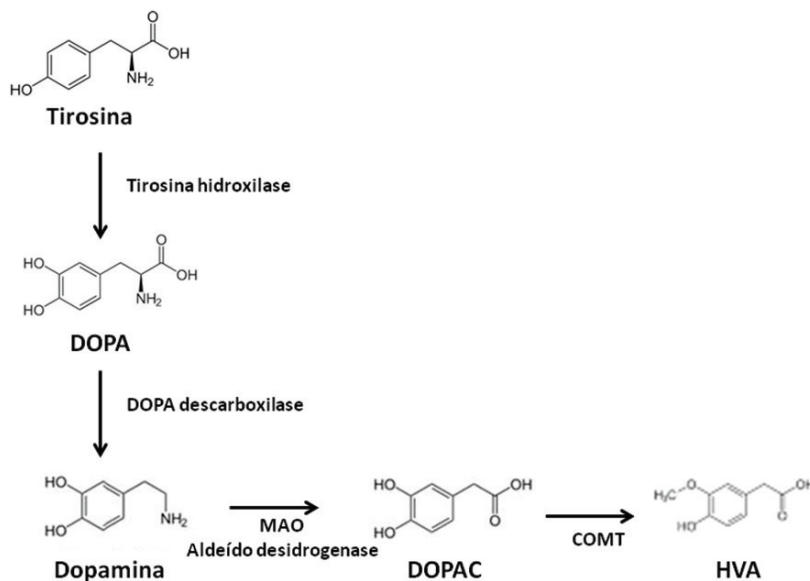


Figura 4: Síntese e metabolização da DA.

Os neurônios dopaminérgicos apresentam três principais padrões de atividade: (i) inativo ou hiperpolarizado; (ii) padrão de disparo lento, irregular ou tônico; e (iii) modo fásico ou de explosão (*burst*) (GRACE; BUNNEY, 1983). O disparo tônico é controlado por potencial intrínseco, semelhante a um marca-passo (GRACE; BUNNEY, 1984a), já a atividade fásica é dependente de vias aferentes (GRACE; BUNNEY, 1984b; GRACE; ONN, 1989) e acredita-se ser o sinal funcionalmente relevante enviado para os neurônios pós-sinápticos para indicar recompensa e modular o comportamento motivacional (BERRIDGE; ROBINSON, 1998; SCHULTZ, 1998; GRACE, 1991). A transição do disparo tônico para o fásico representa a resposta de DA de maior nível (GRACE, 1991; FLORESCO e cols., 2003) que tem sido associada aos sinais de recompensa (SCHULTZ, 1998).

As vias dopaminérgicas que chegam ao NAc exibem uma compartimentalização funcional, tal como ilustrado esquematicamente na figura 5. Frente à estimulação comportamental, aqueles neurônios aferentes emitem disparos fásicos que geram uma grande liberação de DA (concentração em micromolar) no interior do NAc (GARRIS; WIGHTMAN, 1994), a qual saturaria os receptores pós-sinápticos D2 locais (SESACK e cols., 1994). Grande parte da DA liberada é então rapidamente removida através de um sistema de recaptção. Já a atividade tônica dos neurônios dopaminérgicos é responsável pelo estado de equilíbrio de baixo nível de DA (concentração em nanomolar) presente no espaço extracelular do NAc, que não é afetada desproporcionalmente pelo recaptador. Apesar do nível de DA presente no espaço extracelular durante a fase tônica ser apenas 0,01% daquele estimado na fenda sináptica, é ainda suficiente para estimular os receptores pré-sinápticos altamente sensíveis presentes nos terminais aferentes. Este é o

compartimento de DA que é avaliado pelo procedimento de microdiálise (GRACE, 1991; FLORESCO e cols., 2003).

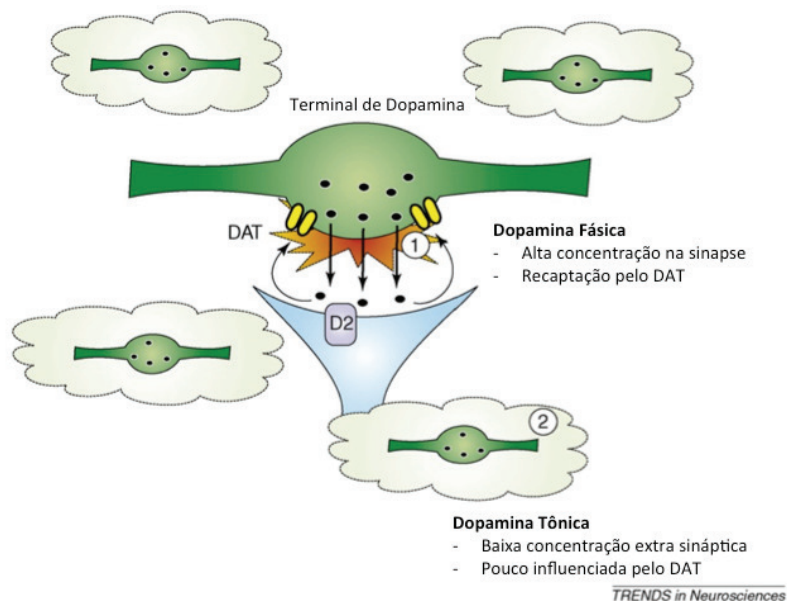


Figura 5: Compartimentalização funcional apresentada pelas vias dopaminérgicas do NAc. DAT = transportador de DA (*dopamine transporter*) (Fonte: GRACE e cols., 2007, com modificação).

Tye e colaboradores (2013) mostraram que a inibição seletiva dos neurônios dopaminérgicos da VTA induz agudamente o comportamento depressivo relacionado com motivação e anedonia e que o estresse crônico leve induz um fenótipo de depressão com múltiplos sintomas, os quais são revertidos pela ativação fásica dos neurônios dopaminérgicos da VTA. Esses pesquisadores demonstraram ainda que os receptores de DA do NAc são requeridos para a ação desses neurônios no comportamento de esquila relacionado com a depressão e que a representação neural do NAc nesta ação comportamental relacionada com a depressão é fundamentalmente modulada pela ativação de neurônios dopaminérgicos da VTA. Logo, estes resultados podem juntos fornecer uma compreensão, à nível do circuito neuronal, da dinâmica causal do comportamento relacionado com a depressão (TYE e col, 2013). Em concordância, estudos anteriores já haviam mostrado uma redução de disparos neuronais na VTA em modelos de depressão, a qual foi restaurada após tratamento com antidepressivos (FRIEDMAN e cols., 2008).

Sabe-se que a busca por reforço positivo ou recompensa é controlada pelo EC e que existe uma relação positiva entre o sistema mesolímbico dopaminérgico e o desempenho do comportamento aprendido dirigido à recompensa (RICHARDSON; GRATTON, 1996; RANALDI e cols., 1999; WIGHTMAN; ROBINSON, 2002), porém o mecanismo pelo qual o estímulo associado à recompensa adquire a capacidade de ativar o sistema dopaminérgico não é completamente compreendido (RANALDI, 2014). Já foi mostrado que o estímulo relacionado com a recompensa torna-se um EC porque ele ganha o acesso ao mesmo circuito neural motivacional que é ativado pela recompensa primária, produzindo ativação

condicionada desses circuitos neurais e causando estado motivacional similar aquele causado pela recompensa primária (BINDRA, 1974; BENINGER; RANALDI, 1994; WISE, 2004). E ainda, que o bloqueio da neurotransmissão dopaminérgica na região mesolímbica reduz ou elimina o efeito da recompensa primária como comida, estimulação cerebral e drogas de abuso (WISE, 2004), porém o preciso mecanismo neural pelo qual o EC adquire o controle das vias dopaminérgicas não é totalmente conhecido. Contudo, baseados em um modelo de aprendizagem associada à recompensa, Ranaldi e cols. (2014) propuseram que: (i) os neurônios dopaminérgicos medeiam à abordagem incondicionada; (ii) o aprendizado relacionado à recompensa condicionada depende da capacidade do EC em ativar os neurônios dopaminérgicos da VTA; (iii) a aquisição do condicionamento e a ativação condicionada dos neurônios dopaminérgicos da VTA é dependente da estimulação de receptores NMDA e de receptores colinérgicos muscarínicos (no caso de recompensa por comida) na VTA; (iv) uma vez adquirido o condicionamento, não há mais dependência dos receptores NMDA, mas sim de outro mecanismo na VTA, possivelmente pela estimulação de receptores AMPA das células dopaminérgicas. Logo, a VTA parece ser um importante local de modificações sinápticas relacionadas com a habilidade de sinais ambientais tornarem-se associados com recompensa alimentar e de drogas.

1.4.2. Núcleo Accumbens

A omissão do reforço positivo (isto é, supressão da recompensa) provoca consequências motivacionais e relacionadas com a atenção, e no que diz respeito aos substratos neurais envolvidos na modulação desses efeitos, diferentes pesquisas têm mostrado que a amígdala é um deles. De fato, a lesão da amígdala interfere com a manifestação daqueles efeitos (HENKE; MAXWELL, 1973; MCDONOUGH e cols., 1977; BUENO e cols., 2012; JUDICE-DAHER e cols., 2012), o que é suportado pelas evidências envolvendo esta estrutura em respostas correlacionadas com processo motivacional (LEDOUX, 2000; BALLEINE; KILLCROSS, 2006). Entretanto, estes efeitos dependem de estruturas além da amígdala, bem como de suas conexões com outros sistemas cerebrais (HOLLAND; GALLAGHER, 1999). As conexões entre diferentes núcleos do complexo amigdalóide e estruturas corticais (ex., córtex pré-frontal) e subcorticais (ex., NAc) podem estar envolvidas nos processos relacionados à recompensa (CARDINAL e cols., 2003; GIERTLER e cols., 2003; 2005), memória (ROOZENDAAL e cols., 2001; 2009) e atenção (MADDUX e cols., 2007), já que estas regiões são profusamente conectadas e juntas podem ser consideradas como uma rede neuronal altamente integrada (O'DOHERTY, 2004). Mais além, o NAc tem sido sugerido como representante da interface límbica-motora (MOGENSEN e cols., 1980), contribuindo para o controle do comportamento operante por

reforços (MOGENSON e cols., 1980; ALEXANDER e cols., 1990; ROOZENDAAL e cols., 2001; CARDINAL e cols., 2003; O'DOHERTY, 2004; MADDUX e cols., 2007; BEZZINA e cols., 2008; ROOZENDAAL e cols., 2009, JUDICE-DAHER; BUENO, 2013).

Estudos anteriores já sugeriram que o NAc tem uma importante função na reorganização do comportamento em resposta a mudanças externas (ANNETT e cols., 1989). Também se mostrou que lesões no NAc prejudicam a habilidade dos animais em prever o tempo de atraso na recompensa quando o retardamento é frequentemente mudado (ACHESON e cols., 2006). Similarmente, lesões no NAc diminuem o desempenho de uma resposta instrumental que foi aprendida pré-operatoriamente quando um atraso na resposta-reforço foi apresentada. Estes resultados sugerem que o NAc tem uma contribuição específica no aprendizado do reforço e performance instrumental quando o reforço não é entregue imediatamente, mas com atraso (CARDINAL; CHEUNG, 2005).

Outros estudos apontam para o envolvimento do NAc na cognição e resposta a estímulos aversivos e de recompensa em modelos animais de depressão e sugerem que o NAc contribui na patofisiologia e sintomatologia da depressão e deve estar envolvido na etiologia da mesma (NESTLER; CARLEZON, 2006). Além disso, têm identificado o NAc e suas vias dopaminérgicas vindas da área ventral tegumentar (VTA) do mesencéfalo, como um dos substratos anatômicos mais importantes associados com motivação, recompensa e hedonia (WISE, 1998; KOOB; LE MOAL, 2001). Ainda, tem sido mostrado que o tratamento com antidepressivos pode alterar a atividade dopaminérgica na VTA e seus alvos, e que a manipulação experimental da transmissão dopaminérgica na via VTA-NAc pode regular comportamento depressivo em modelos animais. Adicionalmente, anormalidades dopaminérgicas dentro das áreas límbicas do cérebro foram observadas em vários modelos animais de depressão (ZAGEN e cols., 2001; KRAM e cols., 2002; DREMENCOV e cols., 2005). Logo, existe uma crescente evidência da função das vias moleculares na VTA-NAc implicada na regulação das respostas comportamentais a recompensas em modelos animais de depressão e na ação antidepressiva de drogas (NESTLER; CARLEZON, 2006).

Vale ainda ressaltar que o NAc apresenta dois compartimentos principais, distintos funcional e anatomicamente, denominados de *shell* (casca, carapaça, periferia) e *core* (núcleo, miolo, centro), e que mostram diferentes funções no desempenho de tarefas comportamentais, emocionais e cognitivas (AMBROGGI e cols., 2008; NICOLA, 2010). Tem se mostrado que o centro e a periferia do NAc recebem aferências de diferentes estruturas (GROENEWEGEN e cols., 1999), apesar de algumas regiões cerebrais se projetarem para ambos compartimentos. Além disso cada compartimento apresenta diferentes alvos, ou seja, inervam diferentes estruturas cerebrais (VOORN e cols., 2004; FIELDS e cols., 2007; HUMPHRIES; PRESCOTT, 2010). Conseqüentemente, os neurônios localizados em cada compartimento do NAc poderiam codificar informações similares, mas ter diferentes efeitos

sobre o comportamento dependendo da região que eles inervam. Ambos compartimentos, central e periférico, do NAc recebem inervações dopaminérgicas do mesencéfalo, porém uma dissociação anatômica tem sido mostrada: enquanto a porção periférica recebe forte inervação dopaminérgica da região medial da VTA, a porção central do NAc recebe da região lateral da VTA, sendo que o estriado ventromedial e suas vias dopaminérgicas parecem estar envolvidos no aprendizado do resultado/efeito relacionado ao estímulo, enquanto o estriado ventrolateral, especialmente o que inerva a porção central do NAc, está envolvido na seleção da resposta apropriada ao estímulo, um processo que é denominado como associação estímulo-ação (IKEMOTO, 2007).

É consenso que a inervação dopaminérgica do NAc desempenha papel chave na motivação por incentivos, processo este equivalente a um condicionamento Pavloviano capaz de influenciar o vigor do comportamento de abordagem (ex., aproximação do animal da fonte de recompensa) (FIBIGER; PHILLIPS 1986; ROBBINS e cols., 1989; BERRIDGE; ROBINSON 1998; CARDINAL e cols., 2002; PARKINSON e cols., 2002). Como mostrado em diferentes estudos, o EC associado à comida ou drogas ativa as células dopaminérgicas da VTA e a liberação de DA no NAc (JOHNSON e cols., 1992; PHILLIPS e cols., 1993; WILSON e cols., 1995; BASSAREO; DI CHIARA, 1999a,b; BASSAREO e cols., 2007). Em contraste, a depleção de DA no NAc prejudica a aquisição do comportamento condicionado (PARKINSON e cols., 1999) e lesões no NAc reduz a autoadministração de cocaína mantida pela apresentação periódica do EC (ITO e cols., 2004). Ainda, injeções intra-NAc de antagonistas de receptores dopaminérgicos D1 (WAKABAYASHI e cols., 2004; YUN e cols., 2004a, b; NICOLA e cols., 2005), D2 (YUN e cols., 2004b) ou mistos D1/D2 (DI CIANO e cols., 2001) reduzem a resposta mantida pelo EC. Reforçando esses achados, vários estudos eletrofisiológicos em roedores tem mostrado que os neurônios do NAc são excitados pela apresentação de sinais que predizem recompensa (NICOLA e cols., 2004; DAY e cols., 2006; WAN; PEOPLES, 2006), e a magnitude dessas respostas eletrofisiológicas correlaciona-se com o valor preditivo do sinal e da ação promovida (TAHA e cols., 2007; ITO; DOYA, 2009; ROESCH e cols., 2009). Corroborando esses dados obtidos em animais, estudos de neuroimagem em humanos mostram uma ativação do NAc durante antecipação da recompensa. De forma interessante, o grau de ativação do NAc correlaciona-se com a quantidade de recompensa percebida (KNUTSON e cols., 2001; BALLARD; KNUTSON, 2009).

Conjuntamente, esses dados indicam fortemente que o NAc representa um elemento chave no processamento das respostas comportamentais frente a situações de recompensa e extinção, podendo, portanto, desempenhar importante papel na fisiopatologia da depressão.

1.5. MICRODIÁLISE *IN VIVO*

Estudos neuroquímicos tem utilizado a técnica de microdiálise para quantificação *in vivo* de neurotransmissores, que na prática é realizada da seguinte forma: uma membrana de diálise tubular é introduzida no tecido ou na região de interesse e tal membrana é perfundida com um líquido que se difunde para o tecido que circunda a mesma e atinge o equilíbrio com o fluido intersticial por difusão em ambas as direções. A complexidade da técnica, entretanto, fica por conta das leis físico-químicas que regem a interação entre a membrana de diálise, o líquido de perfusão e o tecido, interação esta que determinará o grau de equilíbrio entre as fases interna e externa à membrana de diálise. O fluido de perfusão (perfusato) é recolhido, e a concentração dos compostos é determinada por meio de técnicas analíticas apropriadas, refletindo a composição do fluido extracelular da região em estudo (ROBINSON; JUSTICE JR, 1991).

A técnica de microdiálise *in vivo* permite avaliar simultaneamente a atividade comportamental e neuroquímica no mesmo animal. Além disso, o método de microdiálise *in vivo* em animais se movimentando livremente, em combinação com a análise das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção eletroquímica (CLAE-DE) permite a comparação, em tempo real, da atividade comportamental com as mudanças na concentração de neurotransmissores e metabólitos no espaço extracelular antes e após uma determinada manipulação experimental (DI CHIARA, 1990; WESTERINK, 1995, DE SOUZA SILVA; MÜLLER; HUSTON, 2007).

A introdução da CLAE-DE tem provido os neuroquímicos com uma ferramenta mestre para investigar o papel de catecolaminas e indolaminas no sistema nervoso central e periférico. Estes compostos, principalmente a adrenalina (AD), NE, DA e 5-HT e seus respectivos metabólitos podem ser detectados por oxidação em um eletrodo de carbono após separação em coluna cromatográfica apropriada. Este método garante uma análise rápida, relativamente barata e muito sensível de aminas biogênicas em pequenas amostras de cérebro, dialisatos ou plasma (MARDSEN; JOSEPH, 1986).

Além da estimativa da concentração extracelular de DA por microdiálise (VOLKOW e cols., 2003), a função dopaminérgica pode ser monitorada também pelo registro dos disparos dos neurônios de DA (SCHULTZ, 2002), por voltametria (WIGHTMAN; ROBINSON, 2002) e imagens cerebrais (exemplo: tomografia por emissão de pósitrons (PET)) (VOLKOW e cols., 2003). Cada um desses métodos abrange um diferente período de tempo: milissegundos para registros extracelulares, segundos para voltametria e minutos para microdiálise e PET. Estes diferentes métodos não necessariamente estimam o mesmo aspecto da função da DA, já que tem sido proposto que a DA opera em diferentes modalidades dependendo da escala de tempo de sua ação (GRACE, 2000; LAVIN e cols.,

2005). Logo, a modalidade fásica correspondente a DA de curta duração pode ser estimada por voltametria, enquanto que a modalidade tônica por microdiálise (GRACE, 2000).

A microdiálise permite a quantificação extracelular de monoaminas, porém essa concentração extracelular é várias vezes menor que a concentração total do tecido, que predominantemente representa o estoque intracelular de neurotransmissor (WESTERINK e cols., 1987; DI CHIARA, 1991). Um pré-requisito essencial para aceitação da microdiálise como uma técnica tem sido a possibilidade de provar que as concentrações extracelulares refletem diretamente a liberação neuronal provocada por agentes como o cálcio ou a tetrodotoxina (TTX) (IMPERATO; DI CHIARA, 1984; WESTERINK e cols., 1987).

A liberação neuronal refere-se ao processo no qual os neurotransmissores são liberados do terminal pré-sináptico e entram no compartimento extracelular, consistindo de um processo extremamente rápido que não pode ser acompanhado por um método que depende da amostragem minuto a minuto como a microdiálise. O que a microdiálise nos dá é uma medida do aparecimento, persistência e desaparecimento do neurotransmissor no fluido extracelular. Esta medida indireta da liberação é chamada de efluxo (FEENSTRA, 2007).

2. OBJETIVOS

Uma vez que o nível de neurotransmissores e a supressão da recompensa (extinção) estão relacionados com a propensão de desenvolver sintomas depressivos, sendo o NAc parte do substrato neural envolvido na modulação dos efeitos da extinção, o objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos da extinção da recompensa sinalizada (isto é, condicionada) sobre o comportamento e a liberação de DA nos compartimentos central e periférico do NAc de ratos submetidos ao modelo de DIE.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.1. Quantificar os níveis de DA e seus metabólitos em ratos submetidos ao modelo de DIE, utilizando a técnica de microdiálise *in vivo* e quantificação por CLAE-DE;
- 3.2. Avaliar os efeitos comportamentais da extinção em ratos submetidos ao modelo de DIE;
- 3.3. Verificar se as alterações neuroquímicas induzidas pelo modelo de DIE apresentam-se diferentes entre os compartimentos central e periférico do NAc;
- 3.4. Dosar os níveis de esteroides em ratos, após o procedimento de extinção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados 52 ratos Wistar machos adultos (peso: 307.6 ± 6.1 g, média \pm E.P.M) obtidos do biotério local (Universidade de Düsseldorf, Düsseldorf, Alemanha) 2 semanas antes dos experimentos. Eles foram mantidos em caixas de Macrolon (tipo IV) em grupos de 5 animais por caixa com comida e água à vontade até o início da restrição alimentar. Após implantação das cânulas guia, eles foram alojados individualmente. Os animais foram mantidos sob um ciclo invertido claro-escuro de 12 h (luzes acesas: 19:00 h) em uma sala com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade controladas. Após 10 dias de familiarização, os mesmos foram submetidos à restrição alimentar (15 g de pellets padrão/animal/dia), numerados e manipulados por 3 dias antes do início dos experimentos. A restrição alimentar foi continuada até o fim do estudo. O peso dos animais foi monitorado (3 vezes por semana) e eles tiveram livre acesso à água. O estudo (Projeto G144/09) foi realizado de acordo com a Lei Alemã de Proteção Animal e foi aprovado pela autoridade responsável (Bezirksregierung Düsseldorf).

4.2. MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR EXTINÇÃO

Uma câmara (72 x 28 x 34 cm) com paredes feitas de Plexiglas, com chão coberto com borracha preta, com parte superior aberta, foi situada em uma caixa escura e com atenuação de som, contendo um gerador de ruído neutro (Figura 6). Câmeras com infravermelho (Conrad Elektronik) foram montadas no topo e na lateral da caixa para observação comportamental em duas perspectivas. Os módulos do hardware (Coulbourn Industries[®]) foram instalados em uma das paredes. O dispensador de pellets de sacarose integrado com um fotodetector (BioServ[®] Dustless precision pellets) foram situados no meio da parede. O fotodetector marcou a frequência e o tempo que o animal atinge o dispensador de pellets. Uma lâmpada gerando uma ligeira iluminação difusa (1 lux) foi situada no topo da parede, enquanto três lâmpadas de sinalização coloridas (verde, amarela e vermelha) estavam localizadas próximas do dispensador de pellets. Para a sessão de treinamento (*shaping*), um interruptor manual foi conectado ao aparato, para que o experimentador pudesse modular o comportamento do animal em torno do dispensador. Todos os módulos foram conectados a um computador via uma caixa de ligação (PanLab[®]) e controlados pelo software PackWin[®] 2.0.01. Além das variáveis medidas pelo software PackWin[®], a análise do comportamento dos animais foi feita automaticamente por meio da detecção de ponto central e manualmente por um avaliador experiente usando o Ethovision XT 8[®] (Noldus[®]).

Os experimentos foram iniciados após 3 dias de restrição alimentar, sendo que em cada dia de teste, os animais foram levados para o laboratório experimental 1 h antes do teste e depois levados de volta para o biotério para serem alimentados.



Figura 6: Vista lateral (acima à esquerda) e superior (abaixo à esquerda) da câmara de teste. Parede contendo o dispensador de pellets, lâmpada de iluminação difusa e três lâmpadas coloridas de sinalização - verde, amarela e vermelha (direita).

4.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram profundamente anestesiados com uma mistura de hidrocloreto de ketamina (90,0 mg/kg, Ketavet, Pharmacia GmbH, Berlin, Alemanha) e de hidrocloreto de xilazina (8,0 mg/kg, Rompun, Bayer, Leverkusen, Alemanha) e fixados em um aparelho estereotáxico. Em cada animal, duas cânulas guia (14 mm, 22G, aço inoxidável) foram implantadas no NAc, sendo uma direcionada ao compartimento periférico, *shell*, (AP: + 1.2 mm, ML: \pm 0.8 mm, DV: - 6.2 mm) e a outra ao compartimento central, *core*, daquela estrutura (AP: 1.2 mm, ML: \pm 2.8 mm, DV: - 5.8 mm, ângulo: 10°). Cada cânula foi implantada no hemisfério direito ou esquerdo, alternadamente, logo cada animal tinha duas cânulas, uma no hemisfério direito e uma no esquerdo. As coordenadas foram tomadas a partir do bregma, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2005). As cânulas foram fixadas com dois parafusos (aço inoxidável, d: 1.4 mm) e cimento dental. Após a cirurgia os animais receberam uma injeção de Carprofen (5 mg/kg, s.c., Rimadyl, Pfizer, GmbH, Berlin,

Alemanha), foram mantidos em caixas individuais e tiveram 5 dias de recuperação antes do experimento de microdiálise.

4.4. PROCEDIMENTO DE MICRODIÁLISE

Os experimentos foram conduzidos entre 9:00h e 18:00h. As sondas de microdiálise (comprimento da membrana ativa: 2 mm) de formato concêntrico (para construção ver detalhes: BOIX e cols., 1995) foram inseridas através da cânula guia e fixadas. Foram então conectadas a seringas acopladas a uma bomba de microdiálise (CMA 100) e perfundidas com fluxo de 2.0 µl/min com fluido cerebrospinal artificial (Na^+ 146 mmol, K^+ 4 mmol, Ca^{2+} 2.2 mmol, Cl^- 156 mmol). Após um período de estabilização de 2 horas, as amostras foram coletadas a cada 10 min em microtubos contendo 5 µl de 0.05 M HClO_4 , no qual 100 pg de 3,4-diidroxibenzilamina (Experimento 1) ou deoxiepinefrina (Experimento 2) foram dissolvidas e serviram como padrão interno para as análises cromatográficas. As primeiras 6 (Experimento 1) ou 3 (Experimento 2) amostras foram usadas como linha de base. Em seguida, os animais foram submetidos aos diferentes procedimentos de acordo com os protocolos. A coleta de amostras prosseguiu até o fim do experimento.

4.5. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Após a coleta, as amostras foram analisadas para o conteúdo de dopamina (DA) e seus metabólitos, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), usando CLAE-DE. Para separação foi utilizada uma coluna de fase reversa (C18, 5 µm, 125 x 2 mm, Macherey Nagel, Düren, Alemanha), perfundida com uma fase móvel constituída de 9.5 mM ácido cloracético, 0.53 mM octilsulfato de sódio, 0.5 mM ácido etilenodiaminatetraacético, 4 mM KCl, 6% v/v acetonitrila e 0.8% v/v tetraidrofurano (pH ajustado para 3.25 usando solução NaOH 6 M). Quantificação foi realizada por detector eletroquímico (Intro; Antec, Leyden, Holanda), com potencial de +530 mV vs. ISAAC eletrodo de referência, fluxo de 0.2 mL/min e temperatura do forno de 28°C. O limite de detecção foi 1 fmol para amostras de DA com razão sinal:ruído de 2:1.

4.6. ANÁLISE DE ESTEROIDES

Ao final dos experimentos de microdiálise, amostras de sangue foram coletadas do ventrículo esquerdo em microtubos (Sarstedt AG & Co, Germany), centrifugadas por 10 min, a 4000 Rpm e a 4°C. Em seguida, o plasma foi separado, estocado em microtubo e congelado (-70°C).

As amostras foram enviadas para o Instituto de Medicina Clínica e Policlínica III da Universidade Técnica de Dresden, Alemanha (Technischen Universität, Dresden) onde foram analisadas por um método de cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (LC-MS/MS) para quantificação dos esteroides: aldosterona, androstenediona, corticosterona, 11-Deoxycorticosterona, desidroepiandrosterona (DHEA), pregnenolona, progesterona, 21-deoxycortisol, testosterona (PEITZSCH e cols., 2015).

Para análise foi utilizado um espectrômetro de massa AB Sciex QTRAP 5500 triplo quadrupolo acoplado com um sistema de cromatografia líquida de ultra performance Acquity1 (Waters Corporation, Millford, MA, USA). O cromatógrafo foi equipado com sistema binário de solvente, injetor, coluna (Phenomenex Kinetex C18, 2.6 μ m, 2.1x100 mm) e coluna guarda. As amostras foram preparadas usando um processador de Pressão-Positiva-96 (Waters Corporation, Millford, MA, USA) com extração em fase sólida e injetadas na coluna usando um fluxo de 0.35 mL/min e sistema gradiente da fases móveis A (5 mM formiato de amônio) e B (metanol). A coluna foi mantida a 40° C e o injetor a 5° C. Os analitos foram detectados pelo espectrômetro de massa triplo quadrupolo em modo de monitoramento de múltipla reação usando ionização química por pressão atmosférica positiva.

4.7. HISTOLOGIA

Após o procedimento de microdiálise, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos) (Experimento 2) ou colocados em uma câmara com CO₂ (Experimento 1). Após a coleta das amostras de sangue, os animais foram transcardiacamente perfundidos com salina fosfato tamponada (PBS), seguida de formalina 10%. Os cérebros foram removidos e estocados em formalina 10% até serem cortados no micrótomo, corados com violeta de cresil e analisados em microscópio para verificação da exatidão do local da sonda de microdiálise por comparação com o Atlas de Paxinos e Watson (2005). Apenas os animais com sonda de microdiálise no local exato foram considerados para análise estatística dos resultados.

4.8. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Dois diferentes protocolos experimentais foram usados para realização desse estudo, conforme esquematizados na Figura 7.

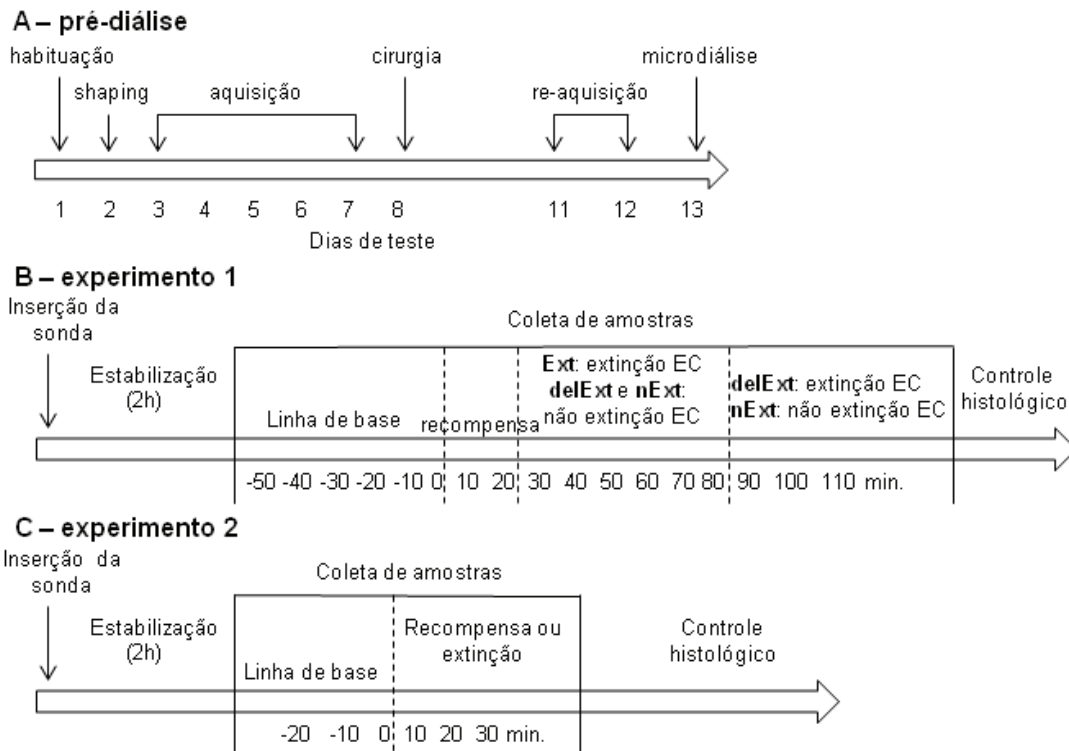


Figura 7: (A) Protocolo pré-díalise. (B) Experimento 1: Protocolo no dia da microdiálise (dia 13). (C) Experimento 2: Protocolo no dia da microdiálise. Ext: grupo extinção; delExt: grupo extinção atrasada (*delayed extinction*); nExt: grupo não extinção; EC = estímulo condicionado.

Experimento 1: Nível de DA nas regiões central e periférica do NAc durante os períodos de recompensa e extinção da recompensa

O objetivo desse experimento foi verificar como variam os níveis de DA nas porções central e periférica do NAc, nas seguintes condições: (a) durante um período de 20 minutos de liberação de recompensa sinalizada, (b) durante um período subsequente de 60 minutos de extinção (isto é, presença do EC, porém, ausência da recompensa) e (c) durante um período de 30 minutos de extinção instituída uma hora após a recompensa (com a introdução do EC ao grupo que anteriormente não foi submetido à extinção ao EC).

Este protocolo permite uma comparação direta entre a condição de presença versus ausência das lâmpadas sinalizadoras condicionadas (estímulo discriminativo), ou seja, extinção versus não extinção do comportamento apetitoso ao estímulo luminoso condicionado. Durante a diálise todos animais receberam primeiro uma recompensa sinalizada seguida de cessação da liberação de recompensa, durante a qual em um grupo as luzes sinalizadoras foram apresentadas (extinção), enquanto nos outros dois grupos as luzes sinalizadoras não foram mais apresentadas (não extinção). Em um dos últimos dois grupos as luzes sinalizadoras foram mais tarde novamente apresentadas (extinção) após 60 minutos.

Nesse protocolo, um treinamento pré-diálise (Fig. 7, esquema A) foi utilizado a fim de simular o curso temporal do procedimento usado no experimento de microdiálise subsequente. No primeiro dia de teste, os animais receberam uma sessão de *habituação* de 20 min, para livre exploração do aparato sem o uso das lâmpadas sinalizadoras. No segundo dia, os animais receberam uma sessão de treinamento de 30 min, *shaping* ou modelagem, na qual cada tentativa ou aproximação ao dispensador de pellets foi recompensada manualmente via um interruptor manual, sendo que a cada pressionamento do interruptor as três lâmpadas coloridas acendiam e um pellet (BioServ® Dustless *precision pellets*) era liberado no dispensador. Para os 5 dias de aquisição, foi usado um intervalo variável de 60 a 120 s (as lâmpadas sinalizadoras acendiam a cada 57, 72, 87, 102 ou 117 s por 3 s e 2 pellets eram liberados imediatamente após o apagamento das lâmpadas sinalizadoras), no qual as lâmpadas sinalizadoras e a liberação de pellets foram pareadas 22 vezes durante a sessão de 30 min. Os animais foram colocados na câmara 1 h antes e removidos 10 min após cada treino de aquisição (duração total do treino: 1h e 40 min). Os animais foram então submetidos à cirurgia estereotáxica, tiveram um tempo de recuperação de 5 dias e foram submetidos aos treinos de reaquisição (terceiro e quarto dias após a cirurgia), o mesmo que durante a aquisição.

No dia do procedimento de microdiálise (Fig. 7, esquema B), os animais foram divididos em 3 grupos. Após a coleta das amostras de linha de base, o tratamento foi aplicado: durante os primeiros 20 minutos, em todos os grupos, as lâmpadas sinalizadoras e a liberação de pellets (recompensa) foram pareadas 15 vezes usando um intervalo variável 60-120 s. Em seguida, para o Grupo 1 (condição de extinção; Ext, n=12) as lâmpadas sinalizadoras foram apresentadas (50 vezes) sem coincidente liberação de pellets durante 1 h usando um intervalo variável (60-120 s). Para o Grupo 2 (condição de não extinção seguida de extinção atrasada; delExt (*delayed extinction*), n=8) os animais foram mantidos na câmara por 1 h sem que as lâmpadas sinalizadoras fossem acesas e então foram submetidos a uma sessão de 30 min, durante a qual as lâmpadas foram apresentadas (25 vezes, intervalo variável 60-120 s) sem coincidente liberação de pellets (condição de extinção). Os animais do Grupo 3 (condição de não extinção; nExt, n=10) permaneceram na câmara por 1 h e 30 min sem apresentação das lâmpadas sinalizadoras.

As seguintes categorias de comportamento foram analisadas usando Ethovision® software (Noldus®): (i) atividade locomotora (distância percorrida, cm), (ii) número de tentativas no dispensador de pellets, e (iii) distância média do animal em relação ao dispensador de pellets. A permanência no dispensador de pellets (um contato foi registrado quando o animal tocou o dispensador com a boca ou com as patas dianteiras), frequência e duração de levantamentos (*rearing* - movimentos verticais), de comportamento de autolimpeza (*grooming*) e de olhares em direção às lâmpadas sinalizadoras foram

registradas manualmente por um avaliador experiente, porém alheio aos experimentos/tratamentos, através de imagens obtidas de 2 câmeras infravermelhas, uma colocada no topo e uma na lateral da câmara, que permitiram a observação do comportamento de duas perspectivas.

Experimento 2: Nível de DA nas regiões central e periférica do NAc durante recompensa e extinção atrasada

O objetivo deste protocolo foi confirmar os resultados encontrados no experimento 1, de que os níveis de DA diminuem no compartimento central do NAc, mas não no periférico, se existir um intervalo entre o período de recompensa e de extinção. Para testar esta hipótese, os animais receberam um treinamento pré-diálise (Fig. 7, esquema A) de recompensa sinalizada tal como feito para o experimento 1. Entretanto, o último dia de treinamento, no qual os animais receberam a recompensa, precedeu a diálise em 24 h, ou seja, um intervalo de 24 h entre a última entrega da recompensa e a extinção. Um outro grupo que recebeu 30 minutos de recompensa sinalizada foi adicionado apenas para confirmar que a DA aumenta no centro do NAc durante a apresentação da recompensa. Logo, no 'grupo recompensa' as lâmpadas sinalizadoras foram pareadas com a recompensa e no 'grupo extinção' as lâmpadas sinalizadoras foram apresentadas na ausência da recompensa.

Neste protocolo, os primeiros dois dias (habituação e *shaping*) foram os mesmos que no experimento 1. Nos próximos cinco dias, fase de *aquisição*, os animais foram colocados na câmara e após 1 h, um treino de aquisição de 30 min foi realizado. Durante os 2 primeiros dias de aquisição as lâmpadas sinalizadoras acendiam a cada 57 s durante 3s (intervalo fixo: 60s) e dois pellets eram liberados imediatamente após o apagamento das lâmpadas. Do terceiro ao quinto dia da aquisição foi usado um intervalo variável 15-90 s (as lâmpadas sinalizadoras acendiam a cada 12, 27, 42, 57, 72 ou 87 s por 3 s e dois pellets eram liberados imediatamente após o apagamento das lâmpadas), para tanto as lâmpadas e a liberação dos pellets foram pareadas 30 vezes durante cada sessão. Os animais foram removidos da câmara 1 h após o treino, logo o tempo total do treino de aquisição foi de 2,5 h (1 h adaptação, 30 min de recompensa sinalizada, 1 h após fim do período de recompensa), com o intuito de habituar os animais ao procedimento de microdiálise. No dia seguinte ao último dia de aquisição, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação da cânula guia. A seguir, eles tiveram um período de recuperação de 5 dias, sendo que no terceiro e quarto dia foram submetidos ao treino de *reaquisição*, o mesmo procedimento que a aquisição (Fig. 7, esquema A).

No dia do procedimento de microdiálise (Fig. 7, esquema C), os animais foram randomicamente divididos em dois grupos: após a coleta das amostras da linha de base, as

lâmpadas sinalizadoras foram apresentadas (32 vezes; intervalo variável 15-90 s) sem coincidente liberação de pellets (grupo extinção, n=12) ou com coincidente liberação de pellets (grupo recompensa, n=9) durante 30 min.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média \pm E.P.M.. Os dados comportamentais foram separados em 3 blocos, dependendo da fase experimental, chamados de aquisição, reaquisição e extinção, e submetidos a análises de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguida da ANOVA de uma via para cada período de tempo e variável, se necessário. Para aquisição e reaquisição, ANOVA incluiu apenas o fator “tempo/tentativas”. Já para extinção, o fator tratamento/grupo foi adicionado. Quando indicado, o teste *t* de Student para amostras independentes foi realizado a fim de comparar os grupos.

Os dados neuroquímicos foram apresentados como porcentagem da média das 6 (experimento 1) ou 3 (experimento 2) primeiras amostras (linha de base) consideradas como 100%. ANOVA de duas vias com medidas repetidas foi calculada para o fator tempo (17 ou 6 pontos) e tratamento (extinção/não extinção ou extinção/recompensa). Quando apropriado, este foi seguido do teste *t* de Student para amostras independentes a fim de comparar os grupos. Os grupos com sondas de microdiálise colocadas nas porções central e periférica do NAc foram analisados separadamente, já que apenas os animais com as sondas localizadas corretamente foram considerados na análise e alguns foram considerados apenas para a porção periférica ou para a porção central do NAc, ou para ambas, resultando em diferentes números de amostra por grupo.

A atividade comportamental e os níveis de neurotransmissor e metabólitos foram também analisados usando ANOVA de uma via com medidas repetidas (17 ou 6 intervalos de tempo) seguida do teste de Fisher`s LSD (*Least Significant Difference*) em comparação às amostras de linha de base.

Os resultados da quantificação de esteroides do experimento 1 foram analisados, quando os três grupos foram considerados separadamente, pela ANOVA de uma via, e quando apropriado, esta foi seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett. Para comparação dos grupos Ext e nExt e dos grupos delExt e nExt utilizou-se o teste *t* de Student para amostras independentes. Os resultados da quantificação de esteroides do experimento 2 foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras independentes para comparação do grupo recompensa e extinção. Foi considerado o nível de significância (duas caudas) de $p \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. EXPERIMENTO 1: Níveis de DA e metabólitos no NAc e análise comportamental durante recompensa e extinção

Neste experimento, os seguintes questionamentos foram feitos: (i) Os níveis de DA aumentam nos compartimentos central e periférico do NAc durante o período de recompensa sinalizada?; (ii) Os níveis de DA diferem entre o 'grupo extinção' (Ext) e o 'grupo não-extinção' (nExt)? Lembrando, extinção implica na apresentação do EC sem a liberação de recompensa, enquanto a não-extinção implica que o EC não é apresentado; (iii) Qual é a influência nos níveis de DA no NAc quando a extinção é atrasada em 1 hora, ou seja, quando a extinção é realizada após 1 hora da última entrega da recompensa?

Aquisição e reaquisição (pré-dialise): ANOVA de medidas repetidas foi realizada para o número de tentativas no dispensador de pellets durante os cinco dias de aquisição e dois dias de reaquisição. Apenas o desenvolvimento geral ao longo dos dias foi considerado, já que os animais ainda não haviam sido atribuídos aos grupos de tratamento. Ao longo dos treinos o número de tentativas no dispensador de pellets diminuiu até um nível de performance estável (de 429.96 ± 33.94 para 311.57 ± 25.96) ($F_{6,90} = 6.520$, $p = 0.0001$). Nos primeiros treinos os animais visitaram o dispensador de pellets seguindo um padrão irregular, independente do sinal luminoso para a liberação da recompensa, mas ao longo dos dias o número de tentativas no dispensador diminuiu, indicando que os animais aprenderam a contingência das lâmpadas sinalizadoras e a subsequente recompensa. Não houve diferença significativa entre os grupos que mais tarde foram separados em 'grupo extinção' (Ext), 'grupo extinção atrasada (delExt)' e 'grupo não-extinção' (nExt).

A. Efeitos da recompensa e da extinção imediata (que sucede a recompensa) nos níveis de DA em ambos os compartimentos do NAc

O número de animais por grupo considerados para a análise estatística foram: NAc central: Ext, $n=7$; nExt, $n=14$; NAc periférico: Ext, $n=7$; nExt, $n=13$.

A Figura 8 mostra esquematicamente a localização das sondas de microdialise nos compartimentos central e periférico do NAc.

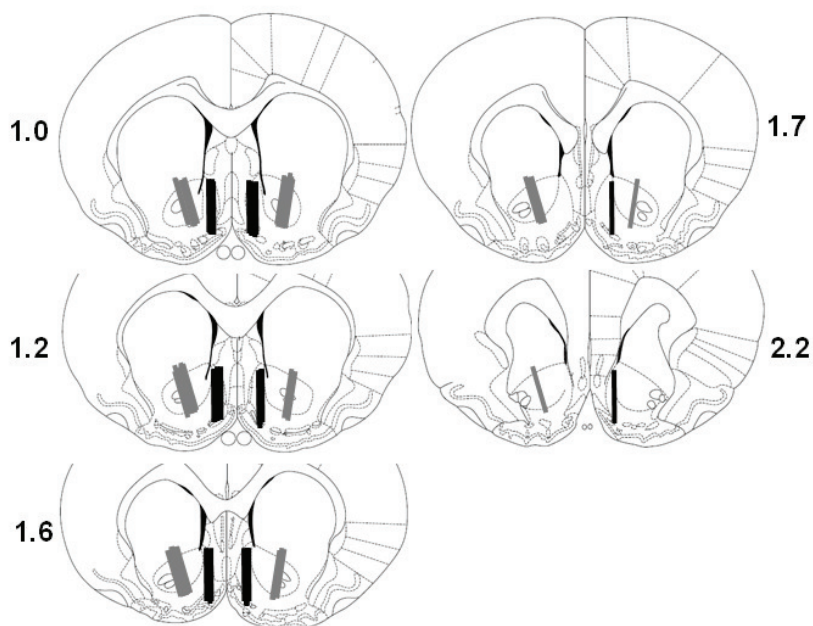


Figura 8: Representação esquemática do posicionamento das sondas de diálise nas porções central e periférica do NAc. As barras cinzas representam a localização das membranas no NAc central, e as pretas no NAc periférico. Números indicam a distância do bregma (em mm) (PAXINOS; WATSON, 2005).

Foram analisadas as amostras coletadas no período entre -50 e 80 minutos, incluindo os períodos de linha de base, recompensa e extinção. A ANOVA com medidas repetidas revelou um efeito global de tempo bastante expressivo no centro do NAc ($F_{13,234} = 4.038$, $p = 0.0001$), porém, bem menos expressivo na sua porção periférica ($F_{13,234} = 1.786$, $p = 0.046$). Não houve efeito global de grupo em ambos os compartimentos (centro: $F_{1,18} = 0.862$, $p = 0.365$; periferia: $F_{1,18} = 0.240$, $p = 0.630$) nem efeito de interação tempo x grupo (centro: $F_{13,234} = 1.072$, $p = 0.384$; periferia: $F_{13,234} = 0.735$, $p = 0.727$).

ANOVAs de uma via com medidas repetidas foram realizadas para comparar, dentro de cada grupo (Ext e nExt), as amostras individuais de cada tempo com as amostras de linha de base. A Fig. 9A mostra que no grupo Ext o nível de DA aumentou significativamente na porção central do NAc ($F_{13,78} = 2.206$, $p = 0.017$), sendo significativamente diferente aos 10 e 20 min (durante o período de recompensa), e aos 30, 40, 60 e 70 minutos (período de extinção) (Fisher's LSD test: $p < 0.05$). No grupo nExt também houve um aumento nos níveis de DA ($F_{13,156} = 2.685$, $p = 0.002$), alcançando significância estatística aos 10 e 20 min (durante o período de recompensa) e aos 30 e 50 min (período após recompensa) (Fisher's LSD test: $p < 0.05$). Na porção periférica do NAc (Fig. 9B), ANOVA não indicou nenhuma mudança significativa de DA nos grupos Ext ($F_{13,78} = 1.418$, $p = 0.170$) e nExt ($F_{13,156} = 0.932$, $p = 0.521$).

Em resumo, (a) durante o período de recompensa, os níveis de DA aumentaram significativamente no compartimento central, mas não no periférico, do NAc; (b) durante o período pós recompensa, a DA se manteve significativamente aumentada tanto no grupo

submetido a extinção quanto no grupo não submetido à extinção do EC; c) durante a extinção, os níveis de DA não diferiram significativamente entre os grupos submetidos à extinção (com o EC apresentado na ausência da recompensa) e os grupos não submetidos (não apresentação do EC), não fornecendo evidência de uma diminuição de DA durante extinção imediata em ambas regiões do NAc.

B. Efeito da extinção atrasada (1 h após a entrega da recompensa) nos níveis de DA em ambos os compartimentos do NAc

Para esse propósito, o grupo que não foi submetido à extinção inicial durante o período de 30 a 80 min, foi então separado em um grupo submetido à extinção atrasada durante 30 min pela apresentação do EC sem a recompensa (delExt) e um outro grupo não extinção que continuou a ser testado sem a apresentação do EC (nExt) (NAc central: nExt, n = 7; delExt, n = 7. NAc periférico: nExt, n = 7; delExt, n = 6) (Fig. 9A,B, 80-110 min).

ANOVA de duas vias com medidas repetidas realizada nos grupos delExt e nExt para as amostras coletadas de 80 a 110 min revelou apenas uma significativa interação tempo x grupo no centro do NAc ($F_{3,36} = 3.042$, $p = 0.040$). Não houveram efeitos de tempo (centro: $F_{3,36} = 0.348$, $p = 0.791$; periferia: $F_{3,30} = 0.899$, $p = 0.453$), de grupo (centro: $F_{1,12} = 2.609$, $p = 0.132$; periferia: $F_{1,10} = 0.843$, $p = 0.380$) nem interação tempo x grupo no NAc periférico ($F_{3,30} = 1.140$, $p = 0.349$).

ANOVAs de uma via com medidas repetidas foram realizadas para comparar as amostras coletadas de 90-110 min com a última amostra coletada antes do tratamento (80 min) em cada grupo: no centro do NAc (Fig. 9A) houve um significativo efeito ($F_{3,18} = 3.336$, $p = 0.043$), confirmado pela significativa diminuição de DA no tempo de 100 min no grupo delExt (teste post-hoc, $p < 0.05$). Não houve efeito no grupo nExt ($F_{3,18} = 0.919$, $p = 0.452$). Na porção periférica do NAc (Fig. 9B) nenhum efeito foi constatado (grupo delExt: $F_{3,12} = 2.690$, $p = 0.093$; grupo nExt: $F_{3,18} = 0.199$, $p = 0.896$).

Logo, os níveis de DA diminuíram significativamente durante o período de extinção no compartimento central do NAc quando houve um intervalo de 1 h entre os períodos de recompensa sinalizada e a apresentação do sinal luminoso na ausência da recompensa (extinção).

C. Efeitos da recompensa e da extinção imediata nos níveis de DOPAC

Efeitos de tempo foram detectados pela ANOVA em ambos os compartimentos do NAc (centro: $F_{13,247} = 2.154$, $p = 0.012$; periferia: $F_{13,234} = 4.705$, $p = 0.0001$). Não houve efeito de grupo em ambas as áreas (centro: $F_{1,19} = 2.984$, $p = 0.100$; periferia: $F_{1,18} = 0.102$, $p = 0.753$). Uma interação tempo x grupo foi constatada apenas no compartimento central do NAc ($F_{13,247} = 2.099$, $p = 0.015$), mas não no periférico ($F_{13,234} = 0.730$, $p = 0.733$). Verificou-

se que a concentração de DOPAC aumentou significativamente no centro do NAc do grupo nExt (Fig. 9C) ($F_{13,169} = 4.308$, $p = 0.0001$). Testes post-hoc confirmaram o aumento significativo de DOPAC aos 10 e 20 min (durante o período recompensa) e aos 30, 40, 50, 60, 70 e 80 min (período pós recompensa) ($p < 0.05$). No grupo Ext, DOPAC não se alterou em relação à linha de base ($F_{13,78} = 1.236$, $p = 0.271$). No compartimento periférico do NAc (Fig. 9D), a concentração de DOPAC se alterou significativamente no grupo Ext ($F_{13,78} = 2.482$, $p = 0.007$). Testes post-hoc confirmaram o aumento significativo de DOPAC aos 10 e 20 min (durante o período de recompensa) e aos 30, 40 e 50 min (período de extinção) ($p < 0.05$). No grupo nExt também houve um significativo aumento de DOPAC ($F_{13,156} = 3.958$, $p = 0.001$). Testes post-hoc confirmaram o aumento significativo de DOPAC aos 20 min (durante período de recompensa) e aos 30, 40, 50, 60 e 80 min (durante período de não extinção).

D. Efeitos da extinção atrasada nos níveis de DOPAC

Para ambos os grupos delExt e nExt, examinados no período de 80 a 110 min, o nível de DOPAC não se alterou ao longo do tempo em ambos os compartimentos, central ($F_{3,36} = 0.587$, $p = 0.627$) e periférico ($F_{3,30} = 0.686$, $p = 0.568$). Também não houve diferença entre grupos (centro: $F_{1,12} = 0.011$, $p = 0.919$; periferia: $F_{1,10} = 2.799$, $p = 0.125$), nem interação tempo x grupo (centro: $F_{3,36} = 0.170$, $p = 0.916$; periferia: $F_{3,30} = 0.421$, $p = 0.739$). Não verificou-se diferenças significativas entre as amostras coletadas de 90-110 min comparadas com a última amostra coletada antes do tratamento (80 min) nos diferentes grupos no compartimento central do NAc (delExt: $F_{3,18} = 0.144$, $p = 0.932$; nExt: $F_{3,18} = 0.702$, $p = 0.563$), nem no compartimento periférico do NAc (delExt: $F_{3,12} = 0.138$, $p = 0.935$; nExt: $F_{3,18} = 0.948$, $p = 0.438$) (Fig. 9C e 9D, respectivamente).

E. Efeitos da recompensa e extinção imediata nos níveis de HVA

As ANOVAs detectaram efeitos significantes de tempo na porção central ($F_{13,247} = 7.734$, $p = 0.0001$) e periférica ($F_{13,221} = 4.210$, $p = 0.0001$) do NAc. Não houve efeito de grupo em ambas as regiões (centro: $F_{1,19} = 4.155$, $p = 0.056$; periferia: $F_{1,17} = 0.467$, $p = 0.503$). Interação tempo x grupo foi detectada apenas no centro do NAc ($F_{13,2470} = 2.142$, $p = 0.013$), mas não no NAc periférico ($F_{13,221} = 0.693$, $p = 0.769$). Verificou-se que no compartimento central do NAc (Fig. 9E), a concentração de HVA se alterou significativamente ao longo do tempo ($F_{13,169} = 10.617$, $p = 0.0001$) no grupo nExt. Testes post-hoc confirmaram o aumento de HVA aos 10 e 20 min (durante período de recompensa) e aos 30, 40, 50, 60, 70 e 80 min (período não extinção) ($p < 0.05$). No grupo Ext não houve alteração nos níveis de HVA no centro do NAc ($F_{13,78} = 1.742$, $p = 0.068$). Perfil semelhante de alteração do HVA ocorreu na porção periférica do NAc do grupo nExt (Fig. 9F), ($F_{13,156} = 5.100$, $p = 0.001$). Testes post-hoc confirmaram um aumento significativo de HVA aos 10 e

20 min (durante período de recompensa) e aos 30, 40, 50, 60, 70 e 80 min (período pós recompensa) ($p < 0.05$). Nenhuma alteração foi observada no grupo Ext ($F_{13,65} = 1.216$, $p = 0.289$).

F. Efeitos da extinção atrasada nos níveis de HVA

ANOVA de duas vias com medidas repetidas para os grupos delExt e nExt de amostras coletadas dos 80 aos 110 min não revelaram efeitos significativos de tempo (centro: $F_{3,36} = 0.654$, $p = 0.586$; periferia: $F_{3,30} = 0.987$, $p = 0.412$), de grupo (centro: $F_{1,12} = 0.001$, $p = 0.988$; periferia: $F_{1,10} = 0.081$, $p = 0.752$), nem interação tempo x grupo (centro: $F_{3,36} = 0.762$, $p = 0.523$; periferia: $F_{3,30} = 0.329$, $p = 0.804$). Não verificou-se diferenças significativas nos níveis de HVA entre as amostras coletadas de 90-110 min comparadas com a última amostra coletada antes do tratamento (80 min) nos diferentes grupos no compartimento central do NAc (delExt: $F_{3,18} = 1.589$, $p = 0.227$; nExt: $F_{3,18} = 0.303$, $p = 0.823$) (Fig. 9E), nem no periférico (delExt: $F_{3,12} = 0.1044$, $p = 0.409$; nExt: $F_{3,18} = 0.835$, $p = 0.492$).

Em resumo, com relação aos metabólitos da DA, no compartimento central do NAc, ambos DOPAC e HVA aumentaram durante o período de recompensa e mantiveram-se elevados durante o período pós-recompensa apenas no grupo que não foi submetido à extinção do EC. No compartimento periférico do NAc, DOPAC aumentou durante o período de recompensa e manteve-se elevado durante o período pós-recompensa em ambos grupos, no submetido à extinção do EC e no grupo não submetido à extinção. HVA também aumentou durante o período de recompensa e manteve-se elevado durante o período pós recompensa, mas apenas no grupo que não foi submetido à extinção do EC.

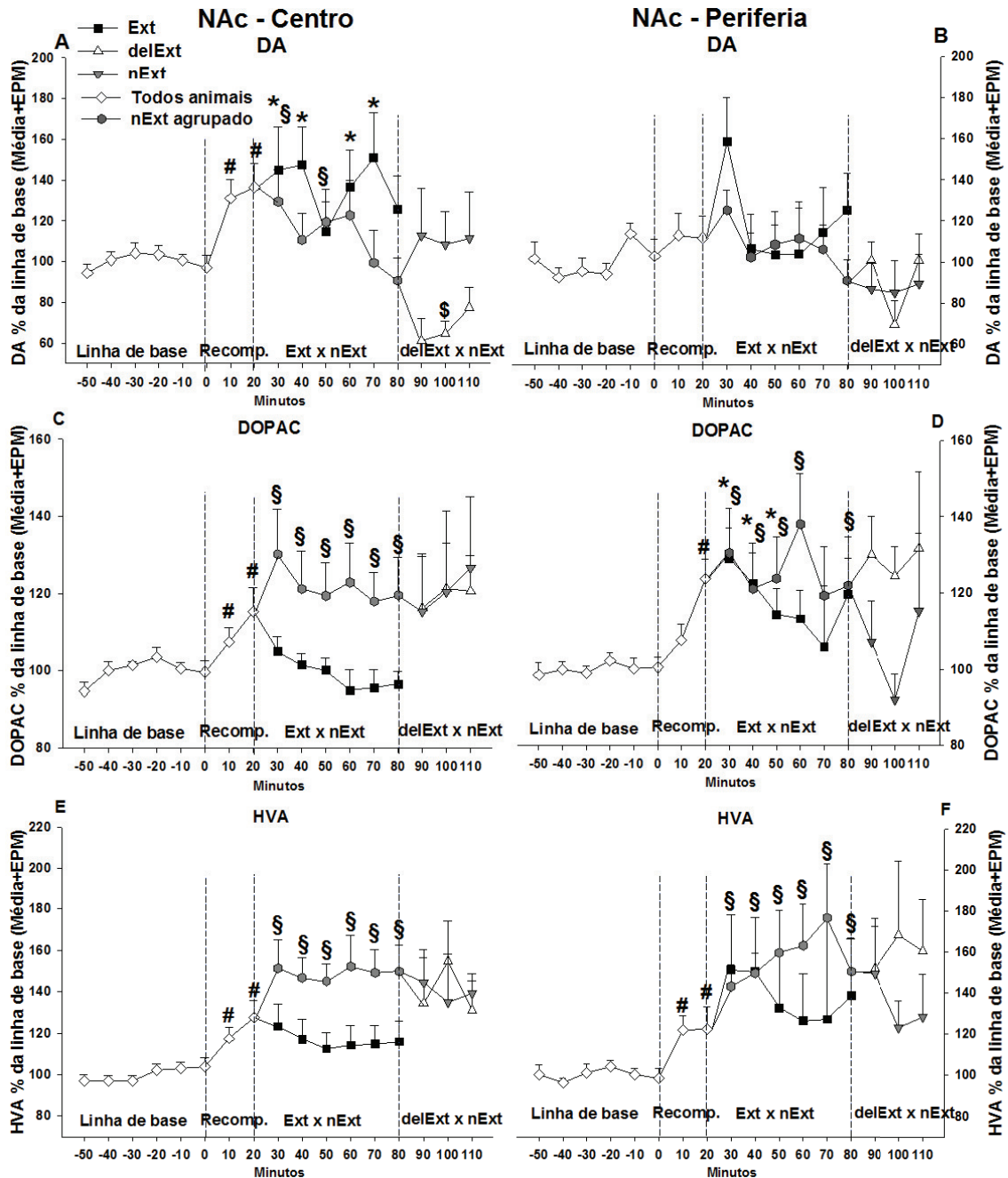


Figura 9: Níveis de DA, DOPAC e HVA nos compartimentos central e periférico do NAc expressos como média (+EPM) da porcentagem da linha de base, com a média de seis amostras de linha de base tomadas como 100%. NAc central: Ext, n=7; delExt, n=7; nExt, n=7; NAc periférico: Ext, n=7; delExt, n=6; nExt, n=7; * $p < 0.05$, comparado com linha de base do grupo Ext; \$ $p < 0.05$, comparado com linha de base do grupo nExt; # $p < 0.05$, comparado com linha de base do grupo contendo todos animais agrupados; \$ $p < 0.05$, comparado com amostra aos 80 min do grupo delExt. Recomp.=Recompensa. Grupos foram agrupados na figura quando submetidos aos mesmo procedimento, mas não para análise estatística.

G. Análise Comportamental durante microdiálise

Os parâmetros comportamentais foram analisados durante a condição de recompensa (10 – 20 min), condição de extinção imediata (30 – 80 min) e condição de extinção atrasada (90 – 110 min) (Figura 10):

Levantamentos: Análises dos grupos Ext e nExt (-50 aos 80 min) usando ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou que, ao longo do tempo, houve alterações significativas sobre a duração (Fig. 10A; $F_{13,338} = 12.885$, $p = 0.0001$) e a frequência (Fig. 10B; $F_{13,351} = 16.005$, $p = 0.0001$) de levantamentos, mas não houve interação tempo x grupo (duração: $F_{13,338} = 0.915$, $p = 0.537$; frequência: $F_{13,351} = 0.584$, $p = 0.867$) nem efeito de grupo (duração: $F_{1,26} = 1.979$, $p = 0.171$; frequência: $F_{1,27} = 0.752$, $p = 0.393$). ANOVA de uma via com medidas repetidas, realizada para comparar o comportamento a cada bloco de 10 min com a linha de base mostrou que no grupo Ext houve um aumento na duração dos levantamentos ($F_{13,143} = 6.993$, $p = 0.0001$) aos 10 e 20 min (período de recompensa) e aos 30 e 40 min (período de extinção pós recompensa), bem como na frequência de levantamentos ($F_{13,143} = 7.837$, $p = 0.0001$) aos 10 e 20 min (recompensa) e aos 30, 40 e 60 min (extinção pós recompensa) ($p < 0.05$). No grupo nExt houve um aumento da duração ($F_{13,195} = 5.571$, $p = 0.0001$) aos 10 e 20 min (recompensa) e aos 30 e 40 min (pós recompensa) ($p = 0.05$) e da frequência de levantamentos ($F_{13,208} = 7.953$, $p = 0.0001$) aos 10 e 20 min (recompensa) e aos 30 min (pós recompensa) ($p < 0.05$).

Nos grupos delExt e nExt examinados no período de 80 a 110 min não houve nenhum efeito de tempo sobre a duração e frequência ($F_{3,48} = 2.098 - 2.132$, $p > 0.05$) de levantamentos. Também não houve diferença entre os grupos (duração/frequência: $F_{1,16} = 0.275 - 0.361$, $p > 0.05$), nem interação tempo x grupo (duração/frequência: $F_{3,48} = 0.809 - 1.164$, $p > 0.05$). ANOVAs de uma via com medidas repetidas realizadas para comparar os tempo 90 a 110 min com o último bloco de tempo antes do tratamento (80 min) não mostrou mudança significativa no grupo delExt (duração/frequência: $F_{3,21} = 0.489 - 1.345$, $p > 0.05$) nem no grupo nExt (duração/frequência: $F_{3,27} = 1.549 - 2.162$, $p > 0.05$).

Logo, o comportamento de levantamento aumentou durante os períodos de recompensa e pós-recompensa em ambos os grupos, mas persistiu por mais tempo no grupo submetido à extinção. Por isso, a frequência e duração de levantamentos são considerados como marcadores de comportamentos induzidos por extinção.

Comportamento de Autolimpeza: Comparando os grupos Ext e nExt no período entre -50 e 80 min, a duração e a frequência do comportamento de autolimpeza aumentaram ($F_{13,351} = 4.086 - 4.808$, $p = 0.0001$), porém não houve interação tempo x grupo (duração/frequência: $F_{13,351} = 0.97 - 1.494$, $p > 0.05$) nem efeito de grupo (duração/frequência: $F_{1,27} = 0.59 - 1.43$, $p > 0.05$). No grupo Ext houve um aumento da duração da autolimpeza aos 10 e 20 min

(período de recompensa) e aos 30, 40, 50, 60 e 70 min (período de extinção pós recompensa) ($F_{13,143} = 3.504$, $p = 0.0001$). Também aumentou a frequência de autolimpeza ($F_{13,143} = 2.717$, $p = 0.002$) aos 30, 40 e 50 min (extinção pós recompensa) (todos: $p < 0.05$). No grupo nExt houve um aumento na duração ($F_{13,208} = 2.303$, $p = 0.007$) aos 20 min (período de recompensa) e aos 30 e 40 min (pós recompensa), mas sem mudanças na frequência do comportamento de autolimpeza ($F_{13,208} = 1.314$, $p = 0.207$).

ANOVA de duas vias de medidas repetidas dos grupos delExt e nExt, no período de 80 a 110 min, não mostrou efeito de tempo (duração/frequência: $F_{3,48} = 0.56 - 2.37$, $p > 0.05$), de grupo (duração/frequência: $F_{1,16} = 1.46 - 1.89$, $p > 0.05$), nem interação tempo x grupo (duração/frequência: $F_{3,48} = 1.03 - 1.20$, $p > 0.05$). A comparação dos tempos 90 a 110 min com o último bloco de tempo antes do tratamento (80 min) não mostrou mudança significativa nos grupos delExt (duração/frequência: $F_{3,21} = 1.12 - 2.34$, $p > 0.05$) e nExt (duração/frequência: $F_{3,27} = 0.85 - 1.75$, $p > 0.05$).

Em resumo, um aumento da frequência do comportamento de autolimpeza durante período imediato após a recompensa apenas apareceu no grupo submetido à extinção. Logo, a frequência do comportamento de autolimpeza é um marcador de comportamento induzido por extinção.

Duração e frequência no dispensador de pellets: Análises dos grupos Ext e nExt (-50 aos 80 min) mostraram que ao longo do tempo, a duração ($F_{13,351} = 33.87$, $p = 0.0001$) e a frequência ($F_{13,351} = 52.54$, $p = 0.0001$) no dispensador de pellets mudaram, mas não houve efeito de grupo (duração/frequência: $F_{1,27} = 0.11 - 0.38$, $p > 0.05$) nem interação tempo x grupo (duração/frequência: $F_{13,351} = 0.67 - 0.99$, $p > 0.05$). No grupo Ext, a duração da permanência no dispensador de pellets aumentou em relação à linha de base ($F_{13,143} = 17.02$, $p = 0.0001$) nos tempos 10 e 20 min (período de recompensa) e aos 30 e 40 min (período pós recompensa). A frequência no dispensador de pellets também aumentou ($F_{13,143} = 22.84$, $p = 0.0001$) aos 10 e 20 min (período de recompensa) e aos 30, 40, 50 e 60 min (período pós recompensa) ($p < 0.05$). No grupo nExt houve um aumento da duração e da frequência no dispensador de pellets ($F_{13,208} = 19.77 - 31.18$, $p = 0.0001$) aos 10 e 20 min (período de recompensa) e aos 30 e 40 min (período pós recompensa) ($p < 0.05$).

Para os grupos delExt e nExt do tempo 80 a 110 min não se mostrou efeito de tempo (duração/frequência: $F_{3,48} = 0.54 - 2.66$, $p > 0.05$), de grupo (duração/frequência: $F_{1,16} = 0.97 - 1.06$, $p > 0.05$) nem interação tempo x grupo (duração/frequência: $F_{3,48} = 0.73 - 1.75$, $p > 0.05$). ANOVAs de uma via com medidas repetidas realizadas para comparar os tempo 90 a 110 min com o último bloco de tempo antes do tratamento (80 min) não mostraram mudanças significativas nos grupos delExt (duração/frequência: $F_{3,21} = 0.53 - 2.09$, $p > 0.05$) e nExt (duração/frequência: $F_{3,27} = 0.28 - 1.32$, $p > 0.05$).

Logo, a duração e frequência de permanência no dispensador de pellets diminuíram ao longo do tempo durante o período pós recompensa no grupo extinção e não extinção, mas persistiram por muito mais tempo no grupo extinção, mostrando o curso temporal do comportamento de extinção.

Duração e frequência de olhares em direção às lâmpadas sinalizadoras (*sign tracking*): Análises dos grupos Ext e nExt (-50 aos 80 min) mostraram um efeito de tempo na duração e frequência de olhares em direção as lâmpadas sinalizadoras ($F_{13,351} = 10.12 - 15.24$, $p = 0.0001$). Uma interação tempo x grupo foi constatada somente para o parâmetro frequência ($F_{13,351} = 1.60$, $p = 0.042$), mas não houve interação tempo x grupo na duração ($F_{13,351} = 1.282$, $p = 0.222$). Também não houve diferença entre os grupos quanto à duração e frequência de olhares em direção às lâmpadas ($F_{1,27} = 2.16 - 2.68$, $p > 0.05$). Verificou-se que no grupo Ext a duração de olhares às lâmpadas sinalizadoras aumentou ($F_{13,143} = 4.578$, $p = 0.0001$) aos 10 min (período de recompensa) e aos 30 min (período de extinção pós recompensa) e a frequência de olhares aumentou ($F_{13,143} = 5.926$, $p = 0.0001$) aos 10 min (período de recompensa) e aos 30 e 40 min (extinção pós recompensa) ($p < 0.05$). E no grupo nExt houve um aumento da duração ($F_{13,208} = 6.380$, $p = 0.0001$) aos 10 e 20 min (recompensa) ($p < 0.05$) e da frequência de olhares ($F_{13,208} = 12.167$, $p = 0.0001$) aos 10 e 20 min (recompensa) e aos 30 min (período pós recompensa) ($p < 0.05$).

Nos grupos delExt e nExt, examinados no período de 80 a 110 min, não houve efeito de tempo (duração/frequência: $F_{3,48} = 1.39 - 1.54$, $p > 0.05$), de grupo (duração/frequência: $F_{1,16} = 1.89 - 1.91$, $p > 0.05$) e nem interação tempo x grupo (duração/frequência: $F_{3,48} = 1.99 - 2.27$, $p > 0.05$). Comparando-se os tempos 90 a 110 min com o último bloco de tempo antes do tratamento (80 min) não houveram mudanças na duração e frequência de olhares em ambos os grupos delExt ($F_{3,21} = 1.40 - 1.52$, $p > 0.05$) e nExt ($F_{3,27} = 0.57 - 1.59$, $p > 0.05$).

Logo, a duração de olhares em direção as lâmpadas sinalizadoras se estendeu ao período pós recompensa apenas no grupo extinção, indicando este comportamento como um marcador de resistência à extinção. O seu declínio depende do tempo e serve como uma medida da extinção comportamental.

Os efeitos comportamentais podem ser sumarizados da seguinte forma: 1. Durante o período de recompensa sinalizada houve um aumento do comportamento de levantamento, autolimpeza, tempo de permanência no dispensador de pellets e olhares em direção às lâmpadas sinalizadoras. 2. Durante o período imediato após a recompensa (a) os olhares em direção às lâmpadas sinalizadoras diminuíram ao longo do tempo em ambos os grupos, extinção e não extinção, mas se mantiveram em um nível mais alto no grupo extinção, no qual as lâmpadas sinalizadoras foram apresentadas, (b) o comportamento de autolimpeza

aumentou ao longo do tempo no grupo submetido à extinção e, logo, é um marcador do comportamento induzido por extinção e (c) o comportamento de levantamentos diminuiu ao longo do tempo, comparavelmente, em ambos os grupos, extinção e não extinção. 3. Durante o período de 90 a 110 min, o grupo submetido à extinção atrasada olhou com mais frequência as lâmpadas sinalizadoras, as quais foram introduzidas durante o período para estabelecer a extinção ao EC.

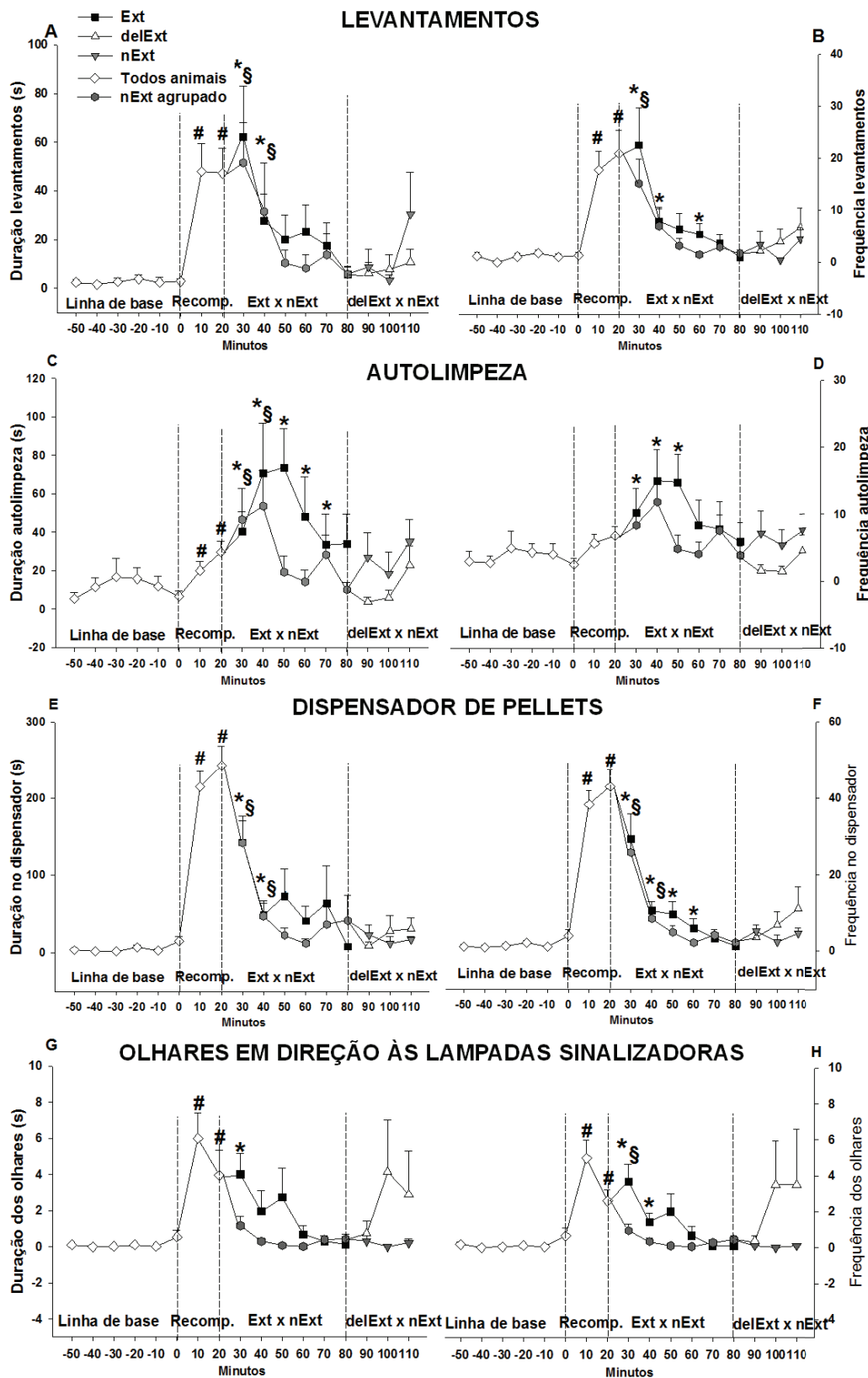


Figura 10: Duração e frequência de levantamentos (A e B), autolimpeza (C e D), permanência no dispensador de pellets (E e F) e olhares em direção às lâmpadas sinalizadoras (G e H). Dados expressos como média (+EPM). Ext, n=11-12; delExt, n=8; nExt, n=9-10. * $p < 0.05$, comparado com linha de base do grupo Ext; § $p < 0.05$, comparado com linha de base do grupo nExt; # $p < 0.05$, comparado com linha de base do grupo contendo todos animais agrupados. Grupos foram agrupados na figura quando submetidos aos mesmo procedimento. Recomp.=Recompensa.

5.2. EXPERIMENTO 2: Níveis de DA e metabólitos no NAc durante recompensa e extinção atrasada

O objetivo deste experimento foi (a) confirmar os resultados do experimento 1 de que os níveis de DA diminuem no compartimento central do NAc, mas não na sua periferia, se houver um intervalo entre o período de apresentação da recompensa e a supressão da mesma (extinção) e (b) confirmar que a DA aumenta no NAc central durante a apresentação da recompensa.

Aquisição e reaquisição (pré-diálise): ANOVAs de medidas repetidas foram realizadas para a distância média do dispensador de pellets durante os cinco dias de aquisição e os dois dias de reaquisição. Apenas o desenvolvimento geral ao longo dos dias foi considerado, já que os animais ainda não haviam sido atribuídos aos grupos de tratamento. Ao longo dos treinos, a distância média do dispensador de pellets diminuiu significativamente ($F_{6,72} = 2.528$, $p = 0.028$), mostrando que os animais aprenderam sobre a contingência das lâmpadas sinalizadoras e consecutiva recompensa alimentar. Não houve diferença significativa entre os grupos que mais tarde foram separados em recompensa e extinção.

DA e metabólitos – Centro vs. periferia do NAc

O número de animais por grupo considerado para a análise estatística foi: NAc centro: extinção, $n=8$; recompensa, $n=8$; NAc periferia: extinção, $n=9$; recompensa, $n=6$. A localização das membranas de diálise nos compartimentos central e periférico do NAc estão representadas na Figura 8.

DA. Os níveis médios basais de DA foram 5.73 ± 0.60 pg no centro, e 6.79 ± 0.85 pg na periferia do NAc, não havendo diferença entre os grupos ($p > 0.05$). No centro do NAc os níveis de DA foram significativamente elevados ($F_{1,14} = 14.960$, $p = 0.002$) no grupo recompensa comparado ao grupo extinção (Fig. 11A). Não houve efeito de tempo ($F_{5,70} = 1.036$, $p = 0.403$), porém, uma significativa interação tempo x grupo foi mostrada ($F_{5,70} = 3.347$, $p = 0.009$). Em contraste, no compartimento periférico do NAc (Fig. 11B), os níveis de DA não se alteraram significativamente em função dos grupos ($F_{1,13} = 3.133$, $p = 0.100$), do tempo ($F_{5,65} = 1.002$, $p = 0.424$), nem houve interação tempo x grupo ($F_{5,65} = 2.092$, $p = 0.078$). Comparado com a linha de base, o nível de DA se alterou no centro do NAc do grupo extinção ($F_{5,35} = 2.199$, $p = 0.038$), sendo significativamente reduzido nos tempos 10 minutos ($p < 0.001$) e 20 minutos ($p < 0.05$). Em contraste, no grupo recompensa o nível de DA elevou-se gradativamente no centro do NAc, atingindo significância estatística no tempo de 30 minutos ($p < 0.05$ vs. linha de base). Em resumo, a ausência de recompensa durante

a apresentação das lâmpadas sinalizadoras (extinção) causou uma significativa diminuição de DA na região central do NAc, mas não na região periférica. Contrariamente, a presença de recompensa sinalizada elevou os níveis de DA no centro do NAc, mas não na sua porção periférica.

DOPAC. A média basal dos níveis de DOPAC foram 1145.70 ± 46.08 pg no compartimento central e 952.60 ± 70.67 pg no compartimento periférico do NAc, não havendo diferença entre os grupos ($p > 0.05$). No centro do NAc, o nível de DOPAC (Fig. 11C) sofreu um efeito de grupo ($F_{1,14} = 5.420$, $p = 0.035$), mas não de tempo ($F_{5,70} = 0.408$, $p = 0.841$) e nem de interação tempo x grupo ($F_{5,70} = 1.383$, $p = 0.241$). Na porção periférica do NAc, o nível de DOPAC (Fig. 11D) sofreu efeitos de grupo ($F_{1,13} = 6.024$, $p = 0.029$), de tempo ($F_{5,65} = 5.291$, $p = 0.0001$) e interação tempo x grupo ($F_{5,65} = 4.423$, $p = 0.002$). O teste post-hoc revela que em ambas regiões o nível de DOPAC foi significativamente mais alto no grupo recompensa comparado com o grupo extinção ($p < 0.05$). ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando tratamento com linha de base não mostrou mudanças significativas de DOPAC no centro do NAc do grupo extinção ($F_{5,35} = 0.887$, $p = 0.5$) nem do grupo recompensa ($F_{5,35} = 0.90$, $p = 0.492$). O nível de DOPAC aumentou, contudo, na periferia do NAc após a recompensa ($F_{5,25} = 4.337$, $p = 0.006$) com significância estatística aos 30 min (post-hoc, $p < 0.05$). No grupo extinção, entretanto, DOPAC não se alterou na porção periférica do NAc ($F_{5,40} = 0.517$, $p = 0.762$). Em resumo, os níveis de DOPAC aumentaram significativamente apenas no compartimento periférico do NAc, no grupo recompensa comparado com a linha de base.

HVA. Os níveis basais de HVA foram 447.60 ± 35.02 pg no centro, e 206.09 ± 20.76 pg na periferia do NAc. Estes não diferiram entre grupos ($p > 0.05$). Efeitos de tempo ($F_{5,65} = 3.808$, $p = 0.004$), de grupo ($F_{1,13} = 7.443$, $p = 0.017$) e interação tempo x grupo ($F_{5,65} = 3.714$, $p = 0.005$) foram detectados na periferia do NAc (Fig. 11F). Na porção central do NAc (Fig. 11E), somente um efeito de grupo foi detectado sobre os níveis de HVA ($F_{1,14} = 4.451$, $p = 0.0053$), mas não efeito de tempo ($F_{5,70} = 0.935$, $p = 0.464$), nem interação tempo x grupo ($F_{5,70} = 1.702$, $p = 0.146$). ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando tratamento com as amostras de linha de base mostrou que o nível de HVA aumentou significativamente no centro do NAc do grupo recompensa ($F_{5,35} = 2.496$, $p = 0.049$), como confirmado pelo teste post-hoc aos 20 e 30 min ($p < 0.05$), mas não mudou no grupo extinção ($F_{5,35} = 0.600$, $p = 0.700$). Na periferia do NAc do grupo recompensa também houve um aumento significativo de HVA ($F_{5,25} = 3.845$, $p = 0.010$), confirmado pelo teste post-hoc aos 30 min ($p < 0.05$), mas não no grupo extinção ($F_{5,40} = 0.528$, $p = 0.754$). Em resumo, os

níveis de HVA em ambos os compartimentos do NAc, central e periférico, aumentaram durante o período de recompensa sinalizada.

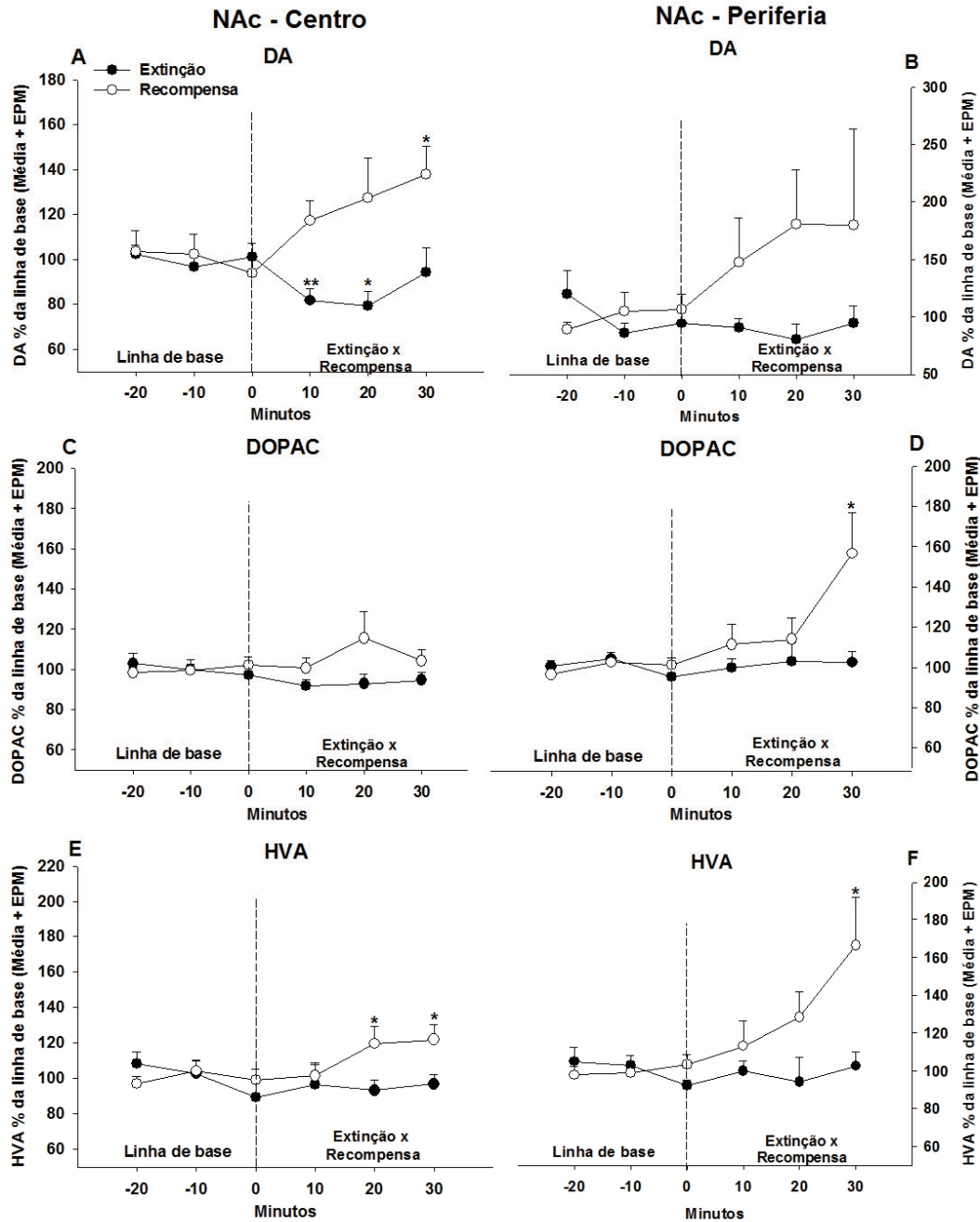


Figura 11: Níveis de DA, DOPAC e HVA nos compartimentos central e periférico do NAc expressos como média (+EPM) per cento da linha de base, com a média das 3 linhas de base tomadas como 100%. NAc centro: extinção, n=8; recompensa, n=8; NAc periferia: extinção, n=9; recompensa, n=6; *p < 0.05, **p < 0.001 comparado com as amostras de linha de base.

5.3. ANÁLISE DE ESTEROIDES

No experimento 1, quando os três grupos foram comparados separadamente (Ext, delExt, nExt), não houve diferenças nos níveis de aldosterona, aldrostenediona,

corticosterona, 11-deoxicorticosterona, dihidroepiandrosterona (DHEA), progesterona, pregnenolona, e testosterona (ANOVA de uma via: $F_{2,29/2,6} = 0.029 - 2.123$, $p > 0.05$).

Considerando grupos delExt e nExt como um só, a comparação entre os grupos Ext e nExt não mostrou diferença entre eles para os níveis daqueles esteroides referidos acima ($t_{5-28} = -0.019$ a 1.682 , $p > 0.05$). Também não houve diferenças entre os grupos delExt e nExt ($t_{3-16} = -0.293$ a 1.271 , $p > 0.05$).

No experimento 2, entretanto, o nível de progesterona foi maior no grupo extinção quando comparado ao grupo recompensa ($t_{26} = 2.221$, $p = 0.035$) (Figura 12). O nível de aldosterona também aumentou no grupo extinção, porém, não alcançou significância estatística ($t_{20} = 1.768$, $p = 0.092$) (Figura 13). Os níveis dos demais esteroides não foram diferentes entre os grupos extinção e recompensa ($t_{16-26} = 0.006$ a 1.373 , $p > 0.05$).

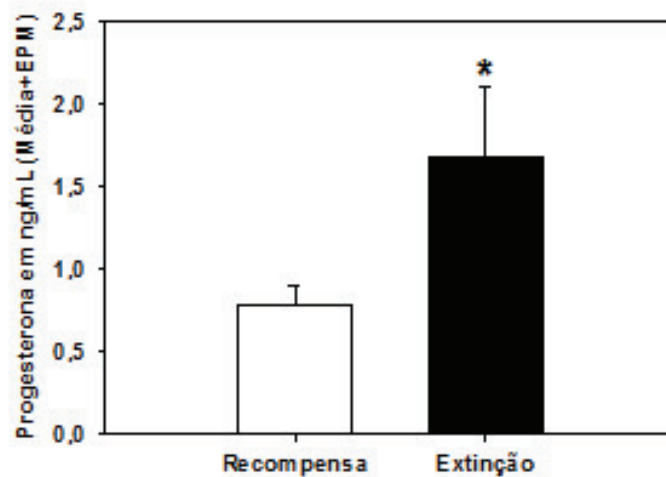


Figura 12: Nível de progesterona em ng/mL. Grupo recompensa, n=16; Grupo extinção, n=12. * $p < 0.05$ comparado com o grupo recompensa.

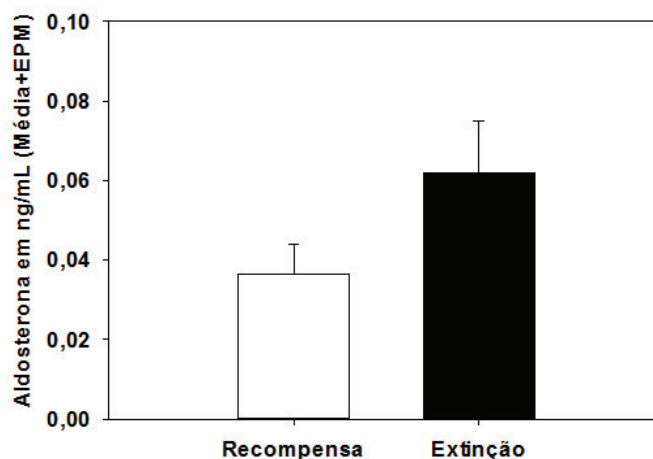


Figura 13: Nível de aldosterona in ng/mL. Grupo recompensa, n=15; Grupo extinção, n=7.

6. DISCUSSÃO

6.1. ANÁLISE NEUROQUÍMICA E COMPORTAMENTAL

No experimento 1 mostrou-se que durante o período de recompensa sinalizada (0 - 20 min), o nível de DA aumentou significativamente no compartimento central do NAc, mas não no compartimento periférico. Este aumento persistiu durante o período seguinte de pós-recompensa (20 - 80 min) tanto no grupo submetido à extinção (ausência da recompensa na presença das lâmpadas sinalizadoras, EC), quanto no grupo que não foi submetido à extinção (não apresentação do EC durante a ausência de recompensa). Estes dados não fornecem evidência de uma diminuição da DA durante a extinção em qualquer das regiões do NAc. Por outro lado, indicam que o aumento nos níveis de DA persiste significativamente elevado para além do período de apresentação da recompensa. Entretanto, quando houve um intervalo de 1 hora entre o período de recompensa e de extinção, o nível de DA na região central do NAc, mas não na região periférica, diminuiu durante o período de extinção (80 - 110 min), fornecendo uma primeira evidência de que, durante a extinção, há uma diminuição de DA no centro do NAc. Essa diminuição ocorre, contudo, quando há um intervalo entre a recompensa e a extinção.

O experimento 2 confirmou os resultados do experimento 1, mostrando que durante o período de recompensa sinalizada (0 - 30 min), os níveis de DA aumentaram significativamente no centro do NAc, mas não na sua periferia. E mais importante, também confirmou que quando houve um intervalo entre recompensa e extinção (neste caso de 24 h), o nível de DA diminuiu significativamente no centro do NAc, mas não na periferia, tal como observado no experimento 1.

Estes achados de um aumento da liberação de DA durante a recompensa sinalizada apenas no compartimento central do NAc estão de acordo com outros estudos usando a microdiálise em ratos. Apesar de ter sido mostrado que estímulos apetitosos promovem a liberação de DA tanto no centro quanto na periferia do NAc (BASSAREO; DI CHIARA, 1997; HAJNAL e cols., 2004), a responsividade da DA é diferente entre as regiões central e periférica do NAc, já que tal responsividade é dependente da valência hedônica (isto é, se apetitosa ou aversiva) (BASSAREO e cols., 2002) e da novidade relativa do estímulo gustativo (BASSAREO; DI CHIARA, 1997; 1999a; BASSAREO e cols., 2002).

Bassareo e colaboradores (2002) mostraram que a liberação de DA na porção periférica do NAc é ativada por estímulos apetitosos desconhecidos, mas não é afetada ou é até mesmo diminuída por sabores aversivos, e que a responsividade da DA naquela região do NAc habitua-se após uma única exposição ao estímulo apetitoso de maneira sabor-específica (BASSAREO; DI CHIARA, 1997; 1999b; BASSAREO e cols., 2002). Por outro

lado, na porção central do NAc o estímulo gustativo promoveu a liberação de DA independente da valência hedônica positiva (prazeroso) ou negativa (aversivo), e não mostrou habituação após exposição (BASSAREO; DI CHIARA, 1997; BASSAREO e cols., 2002). Além disso, Bassareo e colaboradores (2015) investigaram o papel da contingência de resposta e de sinais relacionados com sacarose na transmissão dopaminérgica medida em ambas as regiões do NAc, mostrando que a ingestão repetida de sacarose induziu habituação da responsividade da DA na região periférica do NAc, já que a ingestão de sacarose aumentou a concentração de DA no dialisato apenas no primeiro dia da ingestão, mas não nos dias seguintes. A habituação da responsividade da DA frente a alimentação também tem sido mostrada para alimentos salgados e doces (BASSAREO; DI CHIARA, 1997, 1999b).

Nossos resultados mostrando que a DA aumenta no centro, mas não na periferia, do NAc durante a entrega da recompensa estão de acordo com os estudos citados acima, já que no nosso protocolo os animais foram submetidos a considerável treinamento de aquisição com os pellets de sacarose antes das sessões de microdiálise e, então, podem ser considerados habituados ao sabor e novidade.

Ambroggi e colaboradores (2011) publicaram resultados de alta relevância para o presente estudo, principalmente no que tange à diferença de participação dos compartimentos central e periférico do NAc na performance de tarefas frente a estímulos discriminativos. A inativação da região central do NAc, mas não da periferia, diminuiu a resposta aos sinais preditivos de recompensa; em contraste, a inativação da porção periférica do NAc, mas não da região central, aumentou significativamente a resposta ao sinal indicador da recompensa. Ainda, os sinais preditivos da recompensa geraram maior e mais frequente magnitude de resposta na parte central do NAc, em comparação à periferia, e um número maior de neurônios da região periférica do NAc respondeu seletivamente aos estímulos de não recompensa.

Modelos de recompensa com diferença temporal eficiente postulam que o erro de predição do resultado é crucial para a teoria Pavloviana e do condicionamento operante (RESCORLA; WAGNER, 1972; SUTTON; BARTO, 1981). A resposta da DA frente à entrega da recompensa parece codificar um erro de predição; uma recompensa com valor maior que o esperado promove uma ativação (erro de predição positivo), enquanto que uma recompensa completamente predita não gera resposta. Por outro lado, uma recompensa de valor menor que o predito induz uma depressão dopaminérgica (erro negativo) (SCHULTZ, 2010). A resposta ao erro varia quantitativamente conforme a diferença entre o valor da recompensa recebida e o valor da recompensa esperada (FIORILLO e cols., 2003; SATOH e cols., 2003; MORRIS e cols., 2004; NAKAHARA e cols., 2004; BAYER; GLIMCHER, 2005; TOBLER e cols., 2005). O erro de predição da resposta é também sensível ao tempo da

recompensa; uma recompensa atrasada diminui a atividade dopaminérgica no momento em que a ocorrência da recompensa é esperada, bem como ativa os neurônios no momento da sua entrega (ZAGHLOUL e cols., 2009; FIORILLO e cols., 2008).

Resultados de neuroimagem humana enfatizam a rede altamente interconectada das áreas cerebrais incluindo córtex pré frontal, amígdala, NAc e sistema dopaminérgico mesencéfalo no processamento da recompensa (O'DOHERTY e cols., 2004). O recebimento da recompensa aumenta, enquanto a omissão da mesma reduz a atividade no NAc, amígdala e córtex pré frontal (BREITER e cols., 2001; DELGADO e cols., 2000; KNUTSON e cols., 2001; O'DOHERTY e cols., 2001). O NAc exibe maior ativação frente a tentativas recompensadas quando comparada a não recompensadas, e parece ser sensível à violação do resultado de recompensa esperadas (SPICER e cols., 2007). Estes estudos estão de acordo com nossos resultados de redução da liberação de DA no centro do NAc durante a retirada da recompensa.

Os experimentos também mostraram a diminuição da DA após extinção atrasada. Existem várias explicações possíveis para o achado de que a retirada da recompensa após um período, mas não imediatamente, resultou na diminuição de DA na porção central do NAc. É possível que, imediatamente após a apresentação da recompensa, o incentivo do EC prevalescente representado pelo contexto da câmara (no caso do grupo nExt) ou pelas lâmpadas sinalizadoras mais o contexto (no caso do grupo Ext), tenha mantido a estimulação dopaminérgica aumentada no NAc. No caso de haver um intervalo entre a recompensa e a extinção, é possível que atividade dopaminérgica tenha se dissipado e não pode mais superar ou mascarar a diminuição na DA que marca a extinção da resposta a um EC sinalizado ou estímulo discriminativo.

Tal explicação presumiria que o aumento na liberação de DA, que acompanha a disponibilidade da recompensa, ultrapassa o período de recompensa de maneira tempo-dependente em relação a ação pós-consumo da recompensa ou em dependência da habilidade dos sinais de incentivo condicionado ainda iniciar o comportamento apetitoso (isto é, tão longo quanto a extinção do EC não esteja completa). Em ambos os casos, seria importante distinguir entre a extinção imediata e atrasada em uma descrição teórica e empírica dos processos envolvidos na retirada da recompensa esperada. Não se sabe de literatura relevante que trata diretamente de tal distinção, entretanto, Francois e colaboradores (2014) mostraram que no NAc (subregião não especificada) os níveis de oxigênio no tecido cerebral aumentaram frente a apresentação da recompensa sinalizada, durante a aquisição e nos primeiros dias de extinção, indicando que o NAc mantém-se ativado pelo tempo em que um EC recompensado desencadeia comportamento apetitoso durante as tentativas iniciais de extinção, assim como nossos resultados atuais. De forma similar, Ahn & Phillips (2007) reportaram que o efluxo de DA do NAc aumentou durante a

extinção à um EC que sinalizava recompensa alimentar, mas apenas durante as primeiras tentativas. Entretanto, os autores não encontraram uma subsequente diminuição da DA em tentativas posteriores como no presente estudo.

Com relação aos dados comportamentais, as análises do experimento 1 mostraram que a frequência e duração do comportamento de levantamento aumentaram durante o período de recompensa e se mantiveram elevadas durante o período pós-recompensa em ambos os grupos, mas persistiram por mais tempo no grupo submetido à extinção. Além disso, um aumento na frequência do comportamento de autolimpeza durante o período imediato após a recompensa apareceu apenas no grupo submetido à extinção. Ambos os comportamentos, levantamento e autolimpeza, induzidos por extinção têm sido mostrados que são influenciados pelo tratamento com drogas antidepressivas (TOPIC e cols., 2012; HUSTON e cols., 2013). Outro estudo também relatou que o comportamento de autolimpeza é influenciado pelo tratamento com antidepressivos (YALCIN; BELZUNG; SURGET, 2008). Mais além, o comportamento de levantamento tem sido associado com estado motivacional, atenção, nível de excitação e emotividade (GIRONI e cols., 1990; SADILE, 1995), e o de autolimpeza tem sido interpretado como atividade de mudança que funciona como redução do estresse (SPRUIJT; VANHOOFF; GISPEN, 1992); logo, o aumento na atividade de levantamento e autolimpeza pode ser considerado um marcador comportamental de estresse em roedores (FILE; MABBUTT; WALKER, 1988; KALUEFF; TUOHIMAA, 2005; KYZAR e cols., 2011; NAKAZATO, 2013).

Também mostrou-se que a duração e frequência com que o animal se aproxima do dispensador de pellets diminuíram ao longo do tempo durante o período pós-recompensa nos grupos submetidos ou não à extinção, mas persistiram por mais tempo no grupo extinção, indicando o curso temporal da extinção comportamental. Além disso, a duração de olhares em direção às lâmpadas sinalizadoras se estendeu ao período pós-recompensa apenas no grupo submetido à extinção, indicando essa medida como um índice de resistência à extinção do sinal do EC (e não ao contexto do EC). Este comportamento diminuiu de maneira tempo dependente, servindo como um marcador da extinção comportamental. Portanto, a análise comportamental indicou que enquanto levantamentos e autolimpeza são indicadores de comportamento induzido por extinção, olhares em direção às lâmpadas sinalizadoras são indicadores de resistência à extinção.

No que concerne à relação entre extinção, depressão e DA, vários estudos têm indicado o envolvimento do NAc na cognição e na resposta a estímulos aversivos e de recompensa em modelos animais de depressão, sendo o NAc considerado como importante contribuinte para a patofisiologia, sintomatologia e etiologia da depressão (NESTLER; CARLEZON, 2006). Além disso, estudos de neuroimagem indicam que pacientes depressivos, comparados com indivíduos controles saudáveis, exibem menor ativação do

NAc em performances relacionados com recompensa (PIZZAGALLI e cols., 2009). Similarmente, pacientes depressivos mostraram menor atividade no estriado ventral quando reexaminaram recompensas em uma tarefa de aprendizado reverso, mas não quando reavaliaram punições (ROBINSON e cols., 2011). Pacientes depressivos também mostraram maior dificuldade em manter o humor positivo após uma recompensa, em associação com uma inabilidade de sustentar a atividade no NAc ao longo do tempo (HELLER e cols., 2009), sugerindo que a atividade diminuída no córtex pré frontal dorsal deve reduzir a sensibilidade da recompensa no NAc (DISNER e cols., 2011).

Várias substâncias que aumentam a transmissão dopaminérgica e a disponibilidade de DA no NAc têm mostrado propriedades antidepressivas em estudos com animais (WILLNER, 1997). Além da disponibilidade de DA como um neurotransmissor, também tem sido mostrado que mudanças na sensibilidade e número de receptores de DA no NAc têm um papel na gênese da depressão (D'AQUILA e cols., 2000). Adicionalmente, tem sido mostrado a existência de receptores dopaminérgicos D1 e D2 no NAc e que esta estrutura cerebral está envolvida em uma complexa integração de vias dopaminérgicas excitatórias (D1) e inibitórias (D2), sendo que a VTA tende a ter uma resposta de ativação uniforme frente a estímulos de recompensa (DI CHIARA; IMPERATO, 1988; LEONE e cols., 1991) e aversivos (DUNN, 1988; MCFARLAND e cols., 2004), logo, a habilidade do NAc em integrar estes sinais inibitórios e excitatórios dos neurônios dopaminérgicos vindos da região mesolímbica tem um papel chave na regulação do humor e atribuição de valência (CARLEZON; THOMAS, 2009).

Estudos anteriores em ratos, usando paradigmas da depressão como os apresentados nesse trabalho, ou a extinção do comportamento de fuga em um labirinto aquático, têm mostrado que a retirada da recompensa esperada ou da recompensa de fuga esperada gera mudanças comportamentais e psicológicas que podem ser interpretadas como sendo expressão de depressão/desespero (HUSTON e cols., 2009; 2013). Tais comportamentos de depressão induzidos por extinção têm sido descritos em 3 diferentes paradigmas, um usando pressionamento de alavanca para liberação da recompensa alimentar (HUSTON e cols., 2012), outro usando uma programação de entrega da comida sinalizada com tempo fixo (KOMOROWSKI e cols., 2012), e outro usando a extinção do comportamento de fuga (TOPIC e cols., 2012). Os comportamentos induzidos por extinção incluem aumento na distância da fonte de recompensa, levantamentos, autolimpeza e mordidas, sendo todos eles atenuados pelo tratamento com drogas antidepressivas. Somado aos comportamentos de depressão induzida por extinção, a retirada da recompensa ou diminuição da sua magnitude tem sido acompanhada por indicadores comportamentais de ansiedade, os quais têm aparecido frequentemente em co-morbidade com a depressão maior em humanos (PAPINI e cols., 2015).

Vale ressaltar que os experimentos apresentados foram realizados para verificar a hipótese de que a extinção é acompanhada pela diminuição da liberação de DA no NAc, ou seja, durante a retirada da recompensa, a DA se comportaria em direção oposta à sua resposta na presença da recompensa. Os resultados fornecem evidência para tal ação da DA, cuja diminuição ocorreu seletivamente no compartimento central do NAc, mas apenas quando houve tempo suficiente entre a estimulação pela disponibilidade da recompensa e sua ausência. Tal intervalo para a diminuição do efluxo de DA como um marcador de depressão/desespero faz sentido em termos de nossa hipótese, já que é esperado que o estado de desespero se inicie apenas quando o incentivo do EC tenha perdido sua habilidade de gerar comportamento orientado ou quando as consequências hedônicas da recompensa tenham sido totalmente dissipadas.

Não é sabido, contudo, se antidepressivos que bloqueiam a recaptção neuronal de DA podem reverter a diminuição do efluxo de DA induzida por extinção em conjunto com os marcadores comportamentais de DIE. Tem sido mostrado, entretanto, que a administração intranasal de DA tem propriedades antidepressivas no teste do nado forçado (BUDDENBERG e cols., 2008), como também no paradigma da depressão induzida por extinção operante (resultados ainda não publicados), sugerindo que o subtipo de depressão que é consequência da retirada da recompensa pode ser atenuado pela reposição de DA.

6.2. ANÁLISE DE ESTEROIDES

A análise de esteroides no experimento 1 não mostrou diferenças significativas nos níveis de aldosterona, aldostenediona, corticosterona, 11-deoxicorticosterona, DHEA, progesterona, pregnenolona e testosterona. Entretanto, no experimento 2 constatou-se um aumento no nível de progesterona no grupo submetido à extinção quando comparado ao não submetido à extinção, bem como um aumento (não significativo estatisticamente) nos níveis de aldosterona no mesmo grupo.

Tem sido mostrado que a ausência da recompensa esperada é percebida como um evento estressante, gerando aumento da secreção de cortisol/corticosterona (COOVER; GOODMAN; LEVINE, 1971; KAWASAKI; IWASAKI, 1997; LEWIS; RAMSEY, 2005; OTT e cols., 2011). Este aumento não apareceu, contudo, nos experimentos do presente estudo. Algumas possíveis explicações podem ser levantadas: (a) os animais foram submetidos à apenas uma sessão de extinção, o que pode não ter sido suficiente para gerar aumento dos níveis de cortisol; (b) após o procedimento de extinção os animais permaneceram por um período (1 h no experimento 2) dentro da câmara antes de serem anestesiados e das amostras de sangue serem coletadas, de forma que a flutuação nos níveis de cortisol não tenham sido percebidas; (c) tem sido sugerido que a ativação adrenal ocorre apenas quando

a ausência da recompensa (extinção) está associada com a realização de uma resposta instrumental (ex., pressionamento da alavanca) (DAVIS e cols., 1976), o que não ocorreu no experimento apresentado, já que os animais não tinham que desempenhar uma resposta instrumental para adquirir a recompensa.

Sabe-se que o nível de cortisol varia com o passar do dia, apresentando um pico cerca de 1h antes de acordar e diminuindo com o passar do dia. Esse efeito resulta da variação cíclica de 24 h nos sinais provenientes do hipotálamo que causam a secreção do cortisol (JOELS; BARAM, 2009). Além disso, cerca de 90-95% do cortisol do plasma ligam-se a proteínas plasmáticas, o que diminui a velocidade de eliminação do cortisol do plasma; por conseguinte esta ligação dos esteroides adrenais às proteínas plasmáticas pode servir como reservatório para diminuir rápidas flutuações nas concentrações de hormônios livre, como poderia ocorrer, por exemplo, com o cortisol durante breves períodos de estresse e de secreção episódica de ACTH (JOELS; BARAM, 2009).

Portanto, o único resultado estatisticamente significativo na análise dos esteroides foi um aumento no nível de progesterona no grupo submetido à extinção, porém não encontramos dados similares na literatura que justifiquem tal aumento, logo os resultados das análises de esteroides não se mostraram conclusivos, necessitando de experimentos adicionais.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho confirma a importância da liberação de DA no NAc durante estados relacionados com recompensa. Também fornece primeira evidência de que durante a retirada da recompensa esperada, a liberação de DA diminui no compartimento central, mas não no periférico, do NAc, e que esta diminuição aparece apenas após um intervalo entre a liberação da recompensa e a extinção. Esta diminuição na liberação de DA deve refletir a resposta de neurônios dopaminérgicos a erros de predição (SCHULTZ, 2010).

Hipotetiza-se que a diminuição de DA no centro do NAc deve ser também um marcador de depressão/desespero, estado este que acompanha a perda de recompensas esperadas (HUSTON e cols., 2013). A direção da causa e efeito em tal relação mantém-se obscura. Portanto, seria importante saber se a indução experimental da diminuição da liberação de DA no centro do NAc resulta em comportamentos emocionais que acompanham a retirada da recompensa (extinção) ou se a mudança na liberação de DA é consequência da resposta emocional à extinção.

REFERÊNCIAS

ACHESON, A.; FARRAR, A.M.; PATAK, M.; HAUSKNECHT, K.A.; KIERES, A.K; CHOI, S. Nucleus accumbens lesions decrease sensitivity to rapid changes in the delay to reinforcement. **Behav Brain Res**, v. 173, p. 217–228, 2006.

AHN, S.; PHILLIPS, A. G. Dopamine efflux in the nucleus accumbens during within-session extinction, outcome-dependent, and habit-based instrumental responding for food reward. **Psychopharmacology**, v. 191, p. 641–651, 2007.

ALEXANDER, G.E.; CRUTCHER, M.D.; DELONG, M.R. Basal ganglia-thalamo cortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, prefrontal and limbic functions. **ProgBrain Res**, v. 85, p. 119–146, 1990.

AMBROGGI, F.; ISHIKAWA, A.; FIELDS, H.L.; NICOLA, S.M. Basolateral amygdala neurons facilitate reward-seeking behavior by exciting nucleus accumbens neurons. **Neuron**, v. 59, p. 648–661, 2008.

AMBROGGI, F.; GHAZIZADEH, A.; NICOLA, S. M.; FIELDS, H. L. Roles of Nucleus Accumbens Core and Shell in Incentive-Cue Responding and Behavioral Inhibition. **The Journal of Neuroscience**, v. 31(18), p. 6820-6830, 2011.

ANISMAN, H.; MATHESON, K. Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 525-546, 2005.

ANNETT, L.E.; MCGREGOR, A.; ROBBINS, T.W. The effects of ibotenic acid lesions of the nucleus accumbens on spatial learning and extinction in the rat. **Behav Brain Res**, v. 31(3), p. 231–242, 1989.

ASSOCIAÇÃO PSIQUIÁTRICA AMERICANA. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5ª ed, Text Revision. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.

AZRIN, N.H.; HUTCHINSON, R.R.; HAKE, D.F. Extinction-induced aggression. **Journal of Experimental Analysis of Behavior**, v. 9, p. 191-204, 1966.

BALLARD, K.; KNUTSON, B. Dissociable neural representations of future reward magnitude and delay during temporal discounting. **Neuroimage**, v. 45, p. 143–150, 2009.

BALLEINE, B.W.; KILLCROSS, S. Parallel incentive processing: an integrated view of amygdala function. **Trends Neurosci**, v. 29, p. 272–279, 2006.

BASSAREO, V.; DI CHIARA, G. Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. **Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 851–861, 1997.

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

BASSAREO, V.; DI CHIARA, G. Modulation of feeling-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 4389-4397, 1999b.

BASSAREO, V.; DE LUCA M. A.; DI CHIARA G. Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. **J Neurosci.**, v. 22(11), p. 4709-4719, 2002.

BASSAREO, V.; DE LUCA, M.A.; DI CHIARA, G. Differential impact of pavlovian drug conditioned stimuli on *in vivo* dopamine transmission in the rat accumbens shell and core and in the prefrontal cortex. **Psychopharmacology**, v. 191, p. 689-703, 2007.

BASSAREO, V.; CUCCA, F.; MUSIO, P.; LECCA, D.; FRAU, R.; DI CHIARA G. Nucleus accumbens shell and core dopamine responsiveness to sucrose in rats: role of response contingency and discriminative/conditioned cues. **European Journal of Neuroscience**, v. 41, p. 802-809, 2015.

BAYER, H. M; GLIMCHER, P. W. Midbrain dopamine neurons encode a quantitative reward prediction error signal. **Neuron**, v. 47, p. 129-141, 2005.

BENINGER, R.J.; RANALDI, R. Dopaminergic Agents with Different Mechanisms of Action Differentially Affect Responding for Conditioned Reward. In: PALOMO, T.; ARCHER, T. Strategies for Studying Brain Disorders: Depressive, Anxiety and Drug Abuse Disorders, Farrand Press, Londres, v. 1, p. 411-428, 1994.

BENTOSELA, M.; BARRERA, G.; JACOVCEVIC, A.; ELGIER, A.M.; MUSTACA, A.E. Effect of reinforcement, reinforcer omission and extinction on a communicative response in domestic dogs (*Canis familiaris*). **Behavioral Processes**, v. 78, p. 464-469, 2008.

BERRIDGE, K.C.; ROBINSON, T.E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 28, p. 309-369, 1998.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 137-151, 2006.

BERTON, O.; HAHN, C.G.; THASE, M.E. Are we getting closer to valid translational models for major depression? **Science**, v. 338, p. 75-79, 2012.

BEZZINA, G.; BODY, S.; CHEUNG, T.H.C.; HAMPSON, C.L.; DEAKIN, J.F.W.; ANDERSON, I.M.; BRADSHAW, C.M. Effect of quinolinic acid-induced lesions of the nucleus accumbens *core* on performance on a progressive ratio schedule of reinforcement: implications for inter-temporal choice. **Psychopharmacol**, v. 197, p. 339-350, 2008.

BINDRA, D. A motivational view of learning, performance, and behavior modification. **Psychol. Rev.**, v. 81, p. 199-213, 1974.

BOGDAN, R.; PIZZAGALLI, D.A. Acute stress reduces reward responsiveness: implications for depression. **Biological Psychiatry**, v. 10, p. 1147-1154, 2006.

BOIX, F.; SANDOR, P.; NOGUEIRA, P. J.; HUSTON, J. P.; SCHWARTING, R.K. Relationship between dopamine release in nucleus accumbens and place preference induced by substance P injected into the nucleus basalis magnocellularis region. **Neuroscience**, v. 64, p. 1045-1055, 1995.

BOUTON, M.E. Context, ambiguity, and unlearning: Sources of relapse after behavioral extinction. **Biol Psychiatry**, v. 52, p. 976-986, 2002.

BOUTON, M.E. Context and behavioral processes in extinction. **Learn Mem**, v. 11, p. 485–494, 2004.

BREITER, H.C.; AHARON, I.; KAHNEMAN, D.; DALE, A.; SHIZGAL, P. Functional imaging of neural responses to expectancy and experience of monetary gains and losses. **Neuron**, v. 30, p. 619–639, 2001.

BROWN, G.W., ANDREWS, B., HARRIS, T., ADLER, Z., BRIDGE, L. Social support, self-esteem and depression. **Psychological Medicine**, v.16, p. 813-831, 1986.

BUDDENBERG, T.; TOPIC, B.; DE SOUZA SILVA, M.A.; HUSTON, J.P.; MATTERN C. Behavioral actions of intranasal application of dopamine: effects on forced swimming, elevated plus maze and open field parameters. **Neuropsychobiology**, v. 57(1-2), p. 70-79, 2008.

BUENO, J.L.O.; JUDICE-DAHER, D.M.; TAVARES, T.F. Role of the amygdala in the reinforcement omission effect. **Psychol Neurosci**, v. 5(2), p. 265–273, 2012.

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

CARDINAL, R.N.; PARKINSON, J.A.; HALL, J.; EVERITT, B.J. The contribution of the amygdala, nucleus accumbens, and prefrontal cortex to emotion and motivated behavior. **Internat Congr Ser**, v. 1250, p. 347–370, 2003.

CARDINAL, R.N.; CHEUNG, T.H.C. Nucleus accumbens *core* lesions retard instrumental learning and performance with delayed reinforcement in the rat. **BMC Neurosci**, v. 6(9), p. 1–23, 2005.

CARLEZON, W.A.; THOMAS, M.J. Biological substrates of reward and aversion: A nucleus accumbens activity hypothesis. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 122–132, 2009.

CARVALHO, J.P.; HOPKO, D.R. Behavioral theory of depression: Reinforcement as a mediating variable between avoidance and depression. **Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry**, v. 42, p. 154-162, 2011.

COOVER, G.D.; GOLDMAN, L.; LEVINE, S. Plasma corticosterone increases produced by extinction of operant behavior in rats. **Physiology and Behavior**, v. 6, p. 261-263, 1971.

COWEN, P.J. Not fade away: the HPA axis and depression. **Psychological Medicine**, v. 40, p. 1-4, 2010.

CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 571-62, 2005.

DALY, H.B. Reinforcing properties of escape from frustration aroused in various learning situations. **Learning and Motivation**, v. 8, p. 187-231, 1974.

DANTZER, R.; ARMONE, M.; MORMEDE, P. Effects of frustration on behaviour and plasma corticosterone levels in pigs. **Physiology and Behavior**, v. 24, p. 1-4, 1980.

D'AQUILA, P.S.; COLLU, M.; GESSA, G.L.; SERRA, G. The role of dopamine in the

mechanism of action of antidepressant drugs. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, p. 365-373, 2000.

DAVIDSON, R.J.; PIZZAGALLI, D.; NITSCHKE, J.B.; PUTNAM, K. Depression: Perspectives from affective neuroscience. **Annual Review of Psychology**, v. 53, p. 545-574, 2002.

DAVIS, H.; MEMMOTT, J.; MACFADDEN, L.; LEVINE, S. Pituitary-adrenal activity under different appetitive extinction procedures. **Physiology and Behavior**, v. 7, p. 687-690, 1976.

DAY, J.J.; WHEELER, R.A.; ROITMAN, M.F.; CARELLI, R.M. Nucleus accumbens neurons encode pavlovian approach behaviors: evidence from an autoshaping paradigm. **Eur J Neurosci**, v. 23, p. 1341-1351, 2006.

DELGADO, M.R.; NYSTROM, L.E.; FISSELL, C.; NOLL, D.C.; FIEZ, J.A. Tracking the hemodynamic responses to reward and punishment in the striatum. **J Neurophysiol**, v. 84, p. 3072-3077, 2000.

DE SOUZA SILVA, M.A.; MÜLLER, C.P.; HUSTON, J.P. Microdialysis in anaesthetized vs freely moving animals. In: WESTERINK, B.; CREMERS, T. *Handbook of Microdialysis: Methods, Applications and Perspectives*, Elsevier, Amsterdam, 2007.

DEVENPORT, L.D. Extinction-induced spatial dispersion in the radial arm maze: Arrest by ethanol. **Behavioral Neuroscience**, v. 98, p. 979-985, 1984.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 85, p. 5274-5278, 1988.

DI CHIARA, G. In-vivo brain dialysis of neurotransmitters. **Trends Pharmacol.Sci.**, v. 11, p. 116-121, 1990.

DI CHIARA, G. Brain dialysis of monoamines. In: ROBINSON, T.E.; JUSTICE, J.B. *Microdialysis in the Neurosciences*. Elsevier, Amsterdam, p. 175-187, 1991.

DI CIANO, P.; CARDINAL, R.N.; COWELL, R.A.; LITTLE, S.J.; EVERITT, B.J. Differential involvement of NMDA, AMPA/kainate, and dopamine receptors in the nucleus accumbens core in the acquisition and performance of pavlovian approach behavior. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 9471-9477, 2001.

DISNER, S. G.; BEEVERS, C. G.; HAIGH, E. A.; BECK, A. T. Neural mechanisms of the cognitive model of depression. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 12, p. 467-477, 2011.

DOOB, A.N., KIRSHENBAUM, H.M. The effects of arousal of frustration and aggressive films. **Journal of Experimental Social Psychology**, v. 9, p. 57-64, 1973.

DOUGLAS; V.I., PARRY, P.A. Effects of reward and nonreward on frustration and attention in attention deficit disorder. **Journal of Abnormal Child Psychology**, v. 22, p. 281-302, 1994.

DREMENCOV, E.; NEWMAN, M.E.; KINOR, N.; BLATMAN-JAN, G.; SCHINDLER, C.J.; OVERSTREET, D.H.; YADID, G. Hyperfunctionality of serotonin-2C receptor-mediated inhibition of accumbal dopamine release in an animal model of depression is reversed by antidepressant treatment. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 34-42, 2005.

DUNN, A.J. Stress-related activation of cerebral dopaminergic systems. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 537, p. 188–205, 1988.

EDWARDS, S.; KOOB, G.F. Experimental psychiatric illness and drug abuse models: from human to animal, an overview. In: FIRAS, H.; KOBEISSY. *Psychiatric Disorders: Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology***, v. 829, p. 31-48, 2012.

ESHEL, N.; ROISER, J.P. Reward and punishment processing in depression. **Biological Psychiatry**, v. 68, p. 118-124, 2010.

FEENSTRA, M.G.P. Microdialysis of dopamine and norepinephrine during conditioning and operant behavior. In: WESTERINK, B.; CREMERS, T. *Handbook of Microdialysis*, v. 16, p. 317-350, Elsevier, Amsterdam, 2007.

FERSTER, C.B. A functional analysis of depression. **American Psychologist**, v. 28, p. 857-870, 1973.

FIBIGER, H.C.; PHILLIPS, A.G. Reward, motivation and cognition: psychobiology of mesotelencephalic dopamine systems. In: MOUNTCASTLE, V.B.; BLOOM, F.E.; GERGES, S.R. *Handbook of physiology: the nervous system*, American Physiological Society, Bethesda, v. 4, p. 647–675, 1986.

FIELDS, H.L.; HJELMSTAD, G.O.; MARGOLIS, E.B.; NICOLA, S.M. Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. **Annu Rev Neurosci**, v. 30, p. 289-316, 2007.

FILE, S.E.; MABBUTT, P.S.; WALKER, J.H. Comparison of adaptive responses in familiar and novel environments: Modulatory factors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 525, p. 69-79, 1988.

FIORILLO, C.D.; TOBLER, P.N.; SCHULTZ, W. Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons. **Science**, v. 299, p. 1898-1902, 2003.

FIORILLO, C.D.; NEWSOME, W.T.; SCHULTZ, W. The temporal precision of reward prediction in dopamine neurons. **Nat Neurosci.**, v. 11, p. 966-973, 2008.

FLAHERTY, C.F.; TRONCOSO, B.; DESCHU, N. Open field behaviors correlated with reward availability and reward shift in three rat strains. **American Journal of Psychology**, v. 92, p. 385-400, 1979.

FLAHERTY, C.F. Incentive contrast: A review of behavioral changes following shifts in reward. **Animal Learning and Behavior**, v. 10, p. 409-440, 1982.

FLORESCO, S.B.; WEST, A.R.; ASH, B.; MOORE, H.; GRACE, A.A. Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. **Nat. Neurosci.**, v. 6, p. 968–973, 2003.

FONE, K.C.; PORKESS, M.V. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, p. 1087-1102, 2008.

FRANCOIS, J.; HUXTER, J.; CONWAY, M. W.; LOWRY, J. P.; TRICKLEBANK, M. D.; GILMOUR, G. Differential Contributions of Infralimbic Prefrontal Cortex and Nucleus

Accumbens during Reward-Based Learning and Extinction. **The Journal of Neuroscience**, v. 34(2), p. 596–607, 2014.

FRIEDMAN, A.; FRIEDMAN, Y.; DREMENCOV, E.; YADID, G. VTA dopamine neuron bursting is altered in an animal model of depression and corrected by desipramine. **J. Mol. Neurosci.**, v. 34, p. 201–209, 2008.

GARRIS, P.A.; WIGHTMAN, R.M. Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study. **J. Neurosci.**, v. 14, p. 442–450, 1994.

GIERTLER, C.; BOHN, I.; HAUBER, W. The rat nucleus accumbens is involved in guiding of instrumental response by stimuli predicting reward magnitude. **Eur J Neurosci**, v. 18, p. 1993–1996, 2003.

GIERTLER, C.; BOHN, I.; HAUBER, W. Involvement of NMDA and AMPA/KA receptors in the nucleus accumbens *core* in instrumental learning guided by reward-predictive cues. **Eur J Neurosci**, v. 21, p. 1689–1702, 2005.

GIRONI CARNEVALE, U. A.; VITULLO, E.; SADILE, A. G. Post-trial NMDA receptor allosteric blockade differentially influences habituation of behavioural responses to novelty in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 39, p. 187–195, 1990.

GOLD, P.W.; DREVETS, W.C.; CHARNEY, D.S. New insights into the role of cortisol and the glucocorticoid receptor in severe depression. **Biological psychiatry**, v. 52, p. 381–385, 2002.

GRACE, A.A.; BUNNEY, B.S. Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons—1. Identification and characterization. **Neuroscience**, v. 10, p. 301–315, 1983.

GRACE, A.A.; BUNNEY, B.S. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. **J. Neurosci.**, v. 4, p. 2866–2876, 1984a.

GRACE, A.A.; BUNNEY, B.S. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. **J. Neurosci.**, v. 4, p. 2877–2890, 1984b.

GRACE, A.A.; ONN, S.P. Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. **J. Neurosci.**, v. 9, p. 3463–3481, 1989.

GRACE, A.A. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. **Neuroscience**, v. 41, p. 1–24, 1991.

GRACE, A.A. The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. **Addiction**, v. 95, S119–S128, 2000.

GRACE, A.A.; FLORESCO, S.B., GOTO, Y., LODGE, D.J. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. **Trends in Neurosciences**, v.30 (5), p. 220–227, 2007.

GROENEWEGEN, H.J.; WRIGHT, C.I.; BEIJER, A.V.; VOORN, P. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. **Ann N Y Acad Sci**, v. 877, p. 49–63, 1999.

GUYTON, C.A.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 12ª edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2011.

HALL, F.S., Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. **Critical Reviews in Neurobiology**, v. 12, p. 129-162, 1998.

HAMMEN, C. Stress and depression. **Annual Reviews in Clinical Psychology**, v. 1, p. 293-319, 2005.

HAJNAL, A.; SMITH, G. P.; NORNGREN, R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. **J Physiol Regul Integr Comp Physiol J**, v. 286(1), p. 31-37, 2004.

HELLER, A. S.; JOHNSTONE, T.; SHACKMAN, A. J.; LIGHT, S. N.; PETERSON, M. J.; KOLDEN, G. G., KALIN, N. H., DAVIDSON, R. J. Reduced capacity to sustain positive emotion in major depression reflects diminished maintenance of fronto-striatal brain activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 22445–22450, 2009.

HENKE, P.G.; MAXWELL, D. Lesions in the amygdala and the frustration effect. **Physiol Behav**, v. 10, p. 647–650, 1973.

HINKELMANN, K.; MORITZ, S.; BOTZENHARDT, J.; MUHTZ, C.; WIEDEMANN, K.; KELLNER, M.; OTTE, C. Changes in cortisol secretion during antidepressive treatment and cognitive improvement in patients with major depression: a longitudinal study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, p. 685-692, 2012.

HOLLAND, P.C.; GALLAGHER, M. Amygdala circuitry in attentional and representational processes. **Trends Cogn Sci**, v. 3, p. 65–73, 1999.

HOLAHAN, C.J., MOOS, R.H., HOLAHAN, C.K., CRONKITE, R.C. Resource loss, resource gain and depressive symptoms. A 10 year model. **Journal of Personality and Social Psychology**, v. 77, p. 620-629, 1999.

HOLTZHEIMER, P.E.; MAYBERG, H.S. Stuck in a rut: rethinking depression and its treatment. **Trends in Neurosciences**, v. 34, p. 1–9, 2011.

HOPKO, D.R.; LEJUEZ, C.W.; RUGGIERO, K.J.; EIFERT, G.H. Contemporary behavioral activation treatments for depression: procedures, principles, and progress. **Clinical Psychological Review**, v. 23, p. 699-717, 2003.

HORESH, N., IANCU, I. A comparison of life events in patients with unipolar disorder or bipolar disorder and controls. **Comprehensive Psychiatry**, v. 51, p. 157-164, 2010.

HUMPHRIES, M.D.; PRESCOTT, T.J. The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy, and reward. **Prog Neurobiol**, v. 90, p. 385– 417, 2010.

HUSTON, J.P.; SCHULZ, D.; TOPIC, B. Toward an animal model of extinction induced despair: Focus on aging and physiological indices. **J Neural Trans**, v. 116, p. 1029–1036, 2009.

HUSTON, J.P., VAN DEN BRINK, J., KOMORWOSKI, M., HUQ, Y., TOPIC, B. Antidepressants reduce extinction-induced withdrawal behaviours: a model for depressive-like behaviour. **Neuroscience**, v. 210, p. 249-257, 2012.

HUSTON, J.P.; DE SOUZA SILVA, M.A.; KOMOROWSKI, M.; SCHULZ, D.; TOPIC, B. Animal models of extinction-induced depression: Loss of reward and its consequences. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 37, p. 2059-2070, 2013.

IKEMOTO, S. Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. **Brain Research Reviews**, v. 56, p. 27-78, 2007.

IMPERATO, A.; DI CHIARA, G. Trans-striatal dialysis coupled to reverse phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection: a new method for the study of the in vivo release of endogenous dopamine and metabolites. **J. Neurosci.**, v. 4, p. 966–977, 1984.

ITO, R.; ROBBINS, T.W.; EVERITT, B.J. Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. **Nat. Neurosci.**, v. 7, p. 389-397, 2004.

ITO, M.; DOYA, K. Validation of decision-making models and analysis of decision variables in the rat basal ganglia. **J Neurosci**, v. 29, p. 9861–9874, 2009.

JOELS, M.; BARAM, T.Z. The neuro-symphony of stress. **Nat Rev Neurosci.**, v. 10(6), p. 459–466, 2009.

JOHNSON, S.W.; SEUTIN, V.; NORTH, R.A. Burst firing in dopamine neurons induced by *N*-methyl- d-aspartate: role of electrogenic sodium pump. **Science**, v. 258, p. 665-667, 1992.

JUDICE-DAHER, D.M.; TAVARES, T.F.; BUENO, J.L.O. Involvement of the basolateral complex and central nucleus of amygdala in the reinforcement omission effects of different magnitudes. **Behavioural Brain Research**, v. 233(1), p. 149–56, 2012.

JUDICE-DAHER, D.M.; BUENO, J.L.O. Lesions of the nucleus accumbens disrupt reinforcement omission effects in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 252, p. 439–443, 2013.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Contrasting grooming phenotypes in three mouse strains markedly different in anxiety and activity (129S1, BALB/c and NMRI). **Behavioural Brain Research**, v. 160, p. 1–10, 2005.

KAWASAKI, K.; IWASAKI, T. Corticosterone levels during extinction of runway response in rats. **Life Science**, v. 61, p. 1721-1728, 1997.

KELLER, M.C.; NESSE, R.M. Is low mood an adaptation? Evidence for subtypes with symptoms that match precipitants. **Journal of Affective Disorders**, v. 86, p. 27-35, 2005.

KELLY, J.F; HAKE, D.F. An extinction-induced increase in an aggressive response with humans. **Journal of Experimental Analysis of Behavior**, v. 14, p.153-164, 1970.

KNUTSON, B.; FONG, G.W.; ADAMS, C.M.; VARNER, J.L.; HOMMER, D. Dissociation of reward anticipation and outcome with event-related fMRI. **NeuroReport**, v. 12, p. 3683–3687, 2001.

KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 97–129, 2001.

KOMOROWSKI, M.; HUSTON, J.P.; KLINGENHEGEL, I.; PAULAT, J.; SACKERS, J.; TOPIC, B. Distance from source of reward as a marker for extinction-induced “despair”: modulation by the antidepressants clomipramine and citalopram. **Neuroscience**, v. 223, p. 152-162, 2012.

KRAM, M.L.; KRAMER, G.L.; RONAN, P.J.; STECIUK, M.; PETTY, F. Dopamine receptors and learned helplessness in the rat: an autoradiographic study. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 26, p. 639–645, 2002.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E.J. Animal models of depression: molecular perspectives. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 7, p. 121-147, 2011.

KYZAR, E.; GAIKWAD, S.; ROTH, A.; FGREEN, J.; PHAM, M.; STEWART, A. Towards high-throughput phenotyping of complex patterned behaviours in rodents: Focus on mouse self-grooming and its sequencing. **Behavioural Brain Research**, v. 225, p. 426–431, 2011.

LAM, R.W. Depression. Oxford University Press, Oxford, 2012.

LAVIN, A.; NOGUEIRA, L.; LAPISH, C.C.; WIGHTMAN, R.M.; PHILLIPS, P.E.; SEAMANS, J.K. Mesocortical dopamine neurons operate in distinct temporal domains using multimodal signaling. **J Neurosci**, v. 25(20), p. 5013-23, 2005.

LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci**, v. 23, p. 155–84, 2000.

LEONARD, B.E. Evidence for a biochemical lesion in depression. *J.Clin.Psychiatry*, v. 61, p. 12-17, 2000.

LEONE, P.; POCOCK, D.; WISE, R.A. Morphine-dopamine interaction: ventral tegmental morphine increases nucleus accumbens dopamine release. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 39, p. 469–472, 1991.

LEVENTHAL, A.M. Sadness, depression, and avoidance behavior. **Behavior Modification**, v. 32, p. 759-779, 2008.

LEWINSOHN, P.M. A behavioral approach to depression. In: FRIEDMANN, R.J.; KATZ, M.M., *Psychology of Depression. Contemporary Theory and Research*, John Wiley, Oxford, 1974.

LEWIS, M.; ALESSANDRI, S.M.; SULLIVAN, M.W. Violation of expectancy, loss of control, and anger expressions in young infants. **Developmental Psychology**, v. 26, p. 745-751, 1990.

LEWIS, M.; HITCHCOCK, D.F.A.; SILLIVAN, M.W. Physiological and emotional reactivity to learning and frustration. **Infancy**, v. 6, p. 121-143, 2004.

LEWIS, M.; RAMSEY, D. Infant emotional response and Cortisol response to goal blockage. **Child Development**, v. 76, p. 518-530, 2005.

MADDUX, J.M.; KERFOOT, E.C.; CHATTERJEE, S.; HOLLAND, P.C. Dissociation of attention in learning and action: effects of lesions of the amygdala central nucleus, medial prefrontal cortex, and posterior parietal cortex. **Behav Neurosci**, v. 121(1), p. 63–79, 2007.

MALBERG, J.E.; EISCH, A.J.; NESTLER, E.J.; DUMAN, R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v.

20, p. 9104-9110, 2000.

MARCO, E.M.; ADRIANI, W.; LLORENTE, R.; LAVIOLA, G.; VIVEROS, M.P. Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, p. 498-507, 2009.

MARDSSEN, C.A.; JOSEPH, M.H. In: LIM, C.K. HPLC of small molecules, a practical approach. IRL Press, Oxford, p. 29-47, 1986.

MATSUMOTO, K.; PINNA, G.; PUIA, G.; GUIDOTTI, A.; COSTA, E. Social isolation stress-induced aggression in mice: a model to study the pharmacology of neurosteroidogenesis. **Stress**, v. 8, p. 85-93, 2005.

MCDONOUGH, J.H.; MANNING, F.J. The effects of lesion in amygdala or dorsomedialfrontal cortex on reinforcement omission and noncontingent reinforcement in rats. **Physiol Psychol**, v.7, p.167-72, 1979.

MCEWEN, B.S. Stress and the aging hippocampus. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 20, p. 49-70, 1999a.

MCEWEN, B.S. Stress and hippocampal plasticity. **Annual Review of Neuroscience**, v. 22, p. 105-122, 1999b.

MCFARLAND, K.; DAVIDGE, S.B.; LAPISH, C.C.; KALIVAS, P.W. Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. **J. Neurosci.**, v. 24, p. 1551-1560, 2004.

MINEKA, S.; WATSON, D.; CLARK, L. A. Comorbidity of anxiety and unipolar mood disorders. **Annual Review of Psychology**, v. 49, p. 377-412, 1998.

MIZOGUCHI, K.; ISHIGE, M.; ABURADA, M.; TABIRA, T. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: Involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. **Neuroscience**, v. 119, p. 887-897, 2003.

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

MORRIS, G.; ARKADIR, D.; NEVET, A.; VAADIA, E.; BERGMAN, H. Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons. **Neuron**, v. 43, p. 133-143, 2004.

NAKAHARA, H.; ITOH, H.; KAWAGOE, R.; TAKIKAWA, Y.; HIKOSAKA, O. Dopamine neurons can represent context-dependent prediction error. **Neuron**, v. 41, p. 269-280, 2004.

NAKAZATO, T. Dual modes of extracellular serotonin changes in the rat ventral striatum modulate adaptation to a social stress environment, studies with wireless voltammetry. **Experimental Brain Research**, v. 230, p. 583-596, 2013.

NEMEROFF, C.B. The neurobiology of depression. **Scientific American**, v. 278, p. 42-49, 1998.

NESTLER, E.J.; CARLEZON, W.A. The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. **Biol Psychiatry**, v. 59, p. 1151-1159, 2006.

NESTLER, E.J.; HYMAN, S.E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 13, p. 1161-1169, 2010.

NICOLA, S.M.; YUN, I.A.; WAKABAYASHI, K.T.; FIELDS, H.L. Firing of nucleus accumbens neurons during the consummatory phase of a discriminative stimulus task depends on previous reward predictive cues. **J Neurophysiol**, v. 91, p. 1866-1882, 2004.

NICOLA, S.M.; TAHA, S.A.; KIM, S.W.; FIELDS, H.L. Nucleus accumbens dopamine release is necessary and sufficient to promote the behavioral response to reward-predictive cues. **Neuroscience**, v. 135, p. 1025-1033, 2005.

NICOLA, S.M. The flexible approach hypothesis: unification of effort and cue-responding hypotheses for the role of nucleus accumbens dopamine in the activation of reward-seeking behavior. **J Neurosci**, v. 30, p. 16585–16600, 2010.

NORRIS, J.N.; PEREZ-ACOSTA, A.M.; ORTEGA, L.A.; PAPINI, M.R. Naloxone facilitates appetitive extinction and eliminates escape from frustration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, p. 81-87, 2009.

O'DOHERTY, J.; KRINGELBACH, M.L.; ROLLS, E.T.; HORNAK, J.; ANDREWS, C. Abstract reward and punishment representations in the human orbitofrontal cortex. **Nat Neurosci**, v. 4, p. 95–102, 2001.

O'DOHERTY, J. Reward representations and reward-related learning in the human brain: insights from neuroimaging. **Curr Opin Neurobiol**, v. 14, p. 769–76, 2004.

OTT, V.; FRIEDRICH, M.; PRILOP, S.; LEHNERT, H.; JAUCH-CHARA, K.; BORN, J.; HALLSCHMID, M. Food anticipation and subsequent withdrawal increase serum cortisol in healthy men. **Physiology and Behavior**, v. 103, p. 594-599, 2011.

PAPINI, M.R.; DUDLEY, T. Consequences of surprising reward omissions. **Rev GenPsychol**, v. 1, p. 175–197, 1997.

PAPINI, M. R.; FUCHS, P. N.; TORRES, C. Behavioral neuroscience of psychological pain. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 48, p. 53-69, 2015.

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

PARKINSON, J.A.; DALLEY, J.W.; CARDINAL, R.N.; BAMFORD, A.; FEHNERT, B.; LACHENAL, G.; RUDARAKANCHANA, N.; HALKERSTON, K.M.; ROBBINS, T.W.; EVERITT, B.J. Nucleus accumbens dopamine depletion impairs both acquisition and performance of appetitive Pavlovian approach behaviour: implications for mesoaccumbens dopamine function. **Behav Brain Res**, v. 137, p. 149–163, 2002.

PARIANTE, C.M.; LIGHTMAN, S.L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends in Neurosciences**, v. 31, p. 464-468, 2010.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, 5.ed., Academic press Inc, San Diego, 2005.

PEITZSCH, M.; DEKKERS, T.; HAASE, M.; SWEEP, F.C.; QUACK, I.; ANTOCH, G.; SIEGERT, G.; LENDERS, J.W.; DEINUM, J.; WILLENBERG, H.S.; EISENHOFER, G. An LC-MS/MS method for steroid profiling during adrenal venous sampling for investigation of primary aldosteronism. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 145, p. 75-84, 2015.

PHILLIPS, A.G.; ATKINSON, L.J.; BLACKBURN, J.R.; BLAHA, C.D. Increased extracellular dopamine in the nucleus accumbens of the rat elicited by a conditional stimulus for food: an electrochemical study. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 71, p. 387-393, 1993.

PIZZAGALLI, D. A.; HOLMES, A. J.; DILLON, D. G.; GOETZ, E. L.; BIRK, J. L.; BOGDAN, R.; DOUGHERTY, D. D.; IOSIFESCU, D. V.; RAUCH, S. L.; FAVA, M. Reduced caudate and nucleus accumbens response to rewards in unmedicated individuals with major depressive disorder. **The American Journal of Psychiatry**, v. 166, p. 702-710, 2009.

PORSOLT, R. D.; LEPICHON, M.; JALFRE, M. Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p. 730-732, 1977.

RANALDI, R.; POCOCCO, D.; ZEREIK, R.; WISE, R.A. Dopamine fluctuations in the nucleus accumbens during maintenance, extinction, and reinstatement of intravenous amphetamine self-administration. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 4102-4109, 1999.

RANALDI, R. Dopamine and reward seeking: the role of ventral tegmental area. **Rev. Neurosci.**, v. 25, p. 621-630, 2014.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Farmacologia*, 5ª edição, Elsevier, Rio de Janeiro, p. 543-544, 2004.

RESCORLA, R. A.; WAGNER, A. R. A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. In: BLACK, A.H.; PROKASY, W.F. *Classical Conditioning II: Current Research and Theory*, Appleton Century Crofts, New York, p. 64-99, 1972.

RESCORLA, R.A. Experimental extinction. In: MOWRER, R.R.; KLEIN, S.B. *Handbook of Contemporary Learning Theories*, Lawrence Erlbaum Associates, Mahwah, 2001.

RICHARDSON, N.R.; GRATTON, A. Behavior-relevant changes in nucleus accumbens dopamine transmission elicited by food reinforcement: an electrochemical study in rat. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 8160-8169, 1996.

ROBBINS, T.W.; CADOR, M.; TAYLOR, J.R.; EVERITT, B.J. Limbic-striatal interactions in reward-related processes. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 13, p. 155-162, 1989.

ROBINSON; T.E.; JUSTICE JR, J.B. *Microdialysis in the neurosciences*. Elsevier, Amsterdam, p. 3-22, 1991.

ROBINSON, O. J.; COOLS, R.; CARLISI, C. O.; SAHAKIAN, B. J.; DREVETS, W. C. Ventral striatum response during reward and punishment reversal learning in unmedicated major depressive disorder. **The American Journal of Psychiatry**, v. 169 (2), p. 152-159, 2011.

ROESCH, M.R.; SINGH, T.; BROWN, P.L.; MULLINS, S.E.; SCHOENBAUM, G. Ventral striatal neurons encode the value of the chosen action in rats deciding between differently delayed or sized rewards. **J Neurosci**, v. 29, p. 13365-13376, 2009.

ROOZENDAAL, B.; QUERVAIN, D.J.F.; FERRY, B.; SETLOW, B.; MCGAUGH, J.L. Basolateral amygdala – nucleus accumbens interactions in mediating glucocorticoid enhancement of memory consolidation. **J Neurosci**, v 21(7), p. 2518–2525, 2001.

ROOZENDAAL, B.; MCREYNOLDS, J.R.; ZEE, E.A.V.; LEE, S.; MCGAUGH, J.L.; MCINTYRE, C.K. Gluco-corticoid effects on memory consolidation depend on functional interactions between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala. **J Neurosci**, v. 29(45), p.14299–14308, 2009.

SADILE, A. G. Long-term habituation of theta-related activity components of albino rats in the L-maze. In: SANDBERG, P. R.; OSSENKOPP, K. P.; KAVALIERS, M. Motor activity and movement disorders: measurement and analysis, Humana, New York, 1-54, 1995.

SATOH, T.; NAKAI, S.; SATO, T.; KIMURA, M. Correlated coding of motivation and outcome of decision by dopamine neurons. **J Neurosci**, v. 23, p. 9913-9923, 2003.

SESACK, S.R.; AOKI, C.; PICKEL, V.M. Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. **J. Neurosci.**, v. 14, p. 88–106, 1994.

SCHULTZ, W. Predictive reward signal of dopamine neurons. **J. Neurophysiol.**, v. 80, p. 1–27, 1998.

SCHULTZ, W. Getting formal with dopamine and reward. **Neuron**, v. 36(2), p. 241-63, 2002.

SCHULTZ, W. Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. **Behavioral and Brain Functions**, v. 6(24), p. 1-9, 2010.

SCHULZ, D.; TOPIC, B.; DE SOUSA SILVA, M.A.; HUSTON, J.P. Extinction induced immobility in the water maze and its neurochemical concomitants in aged and adult rats: a possible model for depression? **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 82, p. 128–141, 2004.

SCHULZ, D.; BUDDENBERG, T.; HUSTON, J.P. Extinction-induced “despair” in the water maze, exploratory behavior and fear: effects of chronic antidepressant treatment. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, p. 624–634, 2007a.

SCHULZ, D.; HUSTON, J.P.; BUDDENBERG, T.; TOPIC, B. “Despair” induced by extinction trials in the water maze: relationship with measures of anxiety in aged and adult rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, p. 309–323, 2007b.

SPICER, J.; GALVAN, A.; HARE, T.A.; HENNING, V.; GLOVER, G.; CASEY, B.J. Sensitivity of the nucleus accumbens to violations in expectation of reward. **NeuroImage**, v. 34(1), p. 455–61, 2007.

SPRUIJT, B. M., VAN HOOFF, J. A. R. A. M., GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behaviour. **Physiological Reviews**, v. 72, p. 825–852, 1992.

STOKES, P.E. The potential role of excessive cortisol induced by HPA hyperfunction in the pathogenesis of depression. **European Neuropsychopharmacology Supplement**, p. 77-82, 1995.

SUTTON, R. S.; BARTO, A. G. Toward a modern theory of adaptive networks: expectation and prediction. **Psychol Rev**, v. 8, p.135-170, 1981.

TAHA, S.A.; NICOLA, S.M.; FIELDS, H.L. Cue-evoked encoding of movement planning and execution in the rat nucleus accumbens. **J Physiol**, v. 584, p. 801-818, 2007.

THOMSON, F.; CRAIGHEAD, M. Innovative approaches for the treatment of depression: Targeting the HPA-axis. **Neurochemical Research**, v. 33, p. 691-707, 2008.

TOBLER, P. N.; FIORILLO, C. D.; SCHULTZ, W. Adaptive coding of reward value by dopamine neurons. **Science**, v. 307, p. 1642-1645, 2005.

TOPIC, B.; HUSTON, J.P.; NAMESTKOVA, K.; ZHU, S.W.; MOHAMMED, A.H.; SCHULZ, D. Extinction-induced "despair" in aged and adult rats: links to neurotrophins in frontal cortex and hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, p. 519–526, 2008a.

TOPIC, B.; OITZL, M.S.; MEIJER, O.C.; HUSTON, J.P.; DE SOUZA SILVA, M.A. Differential susceptibility to extinction-induced despair and age-dependent alterations in hypothalamic–pituitary–adrenal axis and neurochemical parameters. **Neuropsychobiology**, v. 58, p.138–153, 2008b.

TOPIC, B.; KRÖGER, I.; VILDIRASOVA, P.G.; HUSTON, J.P. Indices of extinction-induced "depression" after operant learning using a runway vs. a cued free-reward delivery schedule. **Neurobiol Learn Mem**, v. 98, p. 329–40, 2012.

TREW, J.L. Exploring the roles of approach and avoidance in depression: an integrative model. **Clinical Psychology Review**, v. 31, p. 1156-1168, 2011.

TRIVEDI, M.H.; RUSH, A.J.; WISNIEWSKI, S.R.; NIERENBERG, A.A.; WARDEN, D.; RITZ, L.; NORQUIST, G.; HOWLAND, R.H.; LEBOWITZ, B.; MCGRATH, P.J.; SHORES-WILSON, K.; BIGGS, M.M.; BALASUBRAMANI, G.K.; FAVA, M. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care inSTAR*D: implications for clinical practice. **The American Journal of Psychiatry**, v. 163, p. 28-40, 2006.

TYE, K.M.; MIRZABEKOV, J.J.; WARDEN, M.R.; FERENCZI, E.A.; TSAI, H.C.; FINKELSTEIN, J.; KIM, S.Y.; ADHIKARI, A.; THOMPSON, K.R.; ANDALMAN, A.S.; GUNAYDIN, L.A.; WITTEN, I.B.; DEISSEROTH, K. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behavior. **Nature**, v. 493, p. 537-543, 2013.

VOLKOW, N.D.; WANG, G.J.; MAYNARD, L.; JAYNE, M.; FOWLER, J.S.; ZHU, W.; LOGAN, J.; GATLEY, S.J.; DING, Y.S.; WONG, C.; PAPPAS, N. Brain dopamine is associated with eating behaviors in humans. **Int J Eat Disord**, v. 33(2), p. 136-42, 2003.

VOORN, P.; VANDERSCHUREN, L.J.; GROENEWEGEN, H.J.; ROBBINS, T.W.; PENNARTZ, C.M. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. **Trends Neurosci.**, v. 27, p. 468–474, 2004.

ZAGHLOUL, K. A.; BLANCO, J. A.; WEIDEMANN, C. T.; MCGILL, K.; JAGGI, J. L.; BALTUCH, G. H.; KAHANA, M. J. Human substantia nigra neurons encode unexpected financial rewards. **Science**, v. 323, p. 1496-1499, 2009.

ZANGEN, A.; NAKASH, R.; OVERSTREET, D.H.; YADID, G. Association between depressive behavior and absence of serotonin–dopamine interaction in the nucleus accumbens. **Psychopharmacology**, v. 155, p. 434-439, 2001.

WAKABAYASHI, K.T.; FIELDS, H.L.; NICOLA, S.M. Dissociation of the role of nucleus accumbens dopamine in responding to reward-predictive cues and waiting for reward. **Behavioural Brain Research.**, v. 15 , p. 19-30, 2004.

WAN, X.; PEOPLES, L.L. Firing patterns of accumbal neurons during a pavlovian-conditioned approach task. **J Neurophysiol**, v. 96, p. 652-660, 2006.

WESTERINK, B.H.C.; DAMSMA, G.; ROLLEMA, H.; DE VRIES, J.B.; HORN, A.S. Scope and limitations of in vivo brain dialysis: a comparison of its application to various neurotransmitter systems. **Life Sci.**, v. 4, p. 1763–1776, 1987.

WESTERINK, B. H. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 70, p. 103-124, 1995.

WIGHTMAN, R.M.; ROBINSON, D.L. Transient changes in mesolimbic dopamine and their association with 'reward'. **J. Neurochem.**, v. 82, p. 721–735, 2002.

WILLNER, P. The mesolimbic dopamine system as a substrate for (rapid?) antidepressant action. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 12 (3), p. S7–S14, 1997.

WILSON, C.; NOMIKOS, G.G.; COLLU, M.; FIBIGER, H.C. Dopaminergic correlates of motivated behavior: importance of drive. **J. Neurosci.**, v. 15 , p. 5169-5178, 1995.

WISE, R.A. Drug-activation of brain reward pathways. **Drug Alcohol Dependence**, v. 51, p. 13–22, 1998.

WISE, R.A. Dopamine, learning and motivation. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 5, p. 483-494, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The global burden of disease: 2004 update. WHO Press, Geneva, 2008.

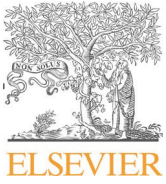
YALCIN, I.; BELZUNG, C.; SURGET, A. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: A four-antidepressant survey. **Behavioural Brain Research**, v. 193, p. 140–143, 2008.

YUN, I.A.; NICOLA, S.M.; FIELDS, H.L. Contrasting effects of dopamine and glutamate receptor antagonist injection in the nucleus accumbens suggest a neural mechanism underlying cueevoked goal-directed behavior. **Eur. J. Neurosci.**, v. 20, p. 249-263, 2004a.

YUN, I.A.; WAKABAYASHI, K.T.; FIELDS, H.L.; NICOLA, S.M. The ventral tegmental area is required for the behavioral and nucleus accumbens neuronal firing responses to incentive cues. **J. Neurosci.**, v. 24, p. 2923-2933, 2004b.

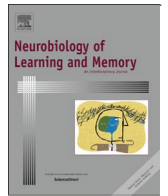
ANEXO A – Artigo publicado na revista *Neurobiology of Learning and Memory* (fator de impacto=4.035), intitulado: “Dopamine in the nucleus accumbens core, but not shell, increases during signaled food reward and decreases during delayed extinction”.

ANEXO B – Certificado de apresentação e resumo de trabalho apresentado no 30th Joint Conference of Biomedical Science em Taiwan, realizado em 21-22 de março de 2015.



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Learning and Memory

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

Dopamine in the nucleus accumbens core, but not shell, increases during signaled food reward and decreases during delayed extinction

C. Biesdorf^{a,b,1}, A.-L. Wang^{a,2}, B. Topic^{a,2}, D. Petri^{a,2}, H. Milani^{b,3}, J.P. Huston^{a,1,2}, M.A. de Souza Silva^{a,2}^a Center for Behavioral Neuroscience, Institute of Experimental Psychology, Heinrich-Heine University of Duesseldorf, Duesseldorf, Germany^b Department of Pharmacology and Therapeutic, Health Science Center, State University of Maringá, Maringá, Brazil

a r t i c l e i n f o

Article history:

Received 28 April 2015

Revised 29 May 2015

Accepted 1 June 2015

Available online 10 June 2015

Keywords:

In vivo microdialysis

Ventral striatum

Depression model

Extinction-induced depression

Nucleus accumbens

Reward

a b s t r a c t

Microdialysis studies in rat have generally shown that appetitive stimuli release dopamine (DA) in the nucleus accumbens (NAc) shell and core. Here we examined the release of DA in the NAc during delivery of reward (food) and during extinction of food reward in the freely moving animal by use of in vivo microdialysis and HPLC. Fifty-two male Wistar rats were trained to receive food reward associated with appearance of cue-lights in a Skinner-box during in vivo microdialysis. Different behavioral protocols were used to assess the effects of extinction on DA and its metabolites.

Results Exp. 1: (a) During a 20-min period of cued reward delivery, DA increased significantly in the NAc core, but not shell subregion; (b) for the next 60 min period half of the rats underwent immediate extinction (with the CS light presented during non-reward) and the other half did not undergo extinction to the cue lights (CS was not presented during non-reward). DA remained significantly increased in both groups, providing no evidence for a decrease in DA during extinction in either NAc core or shell regions. (c) In half of the animals of the group that was not subjected to extinction, the cue lights were turned on for 30 min, thus, initiating extinction to cue CS at a 1 h delay from the period of reward. In this group DA in the NAc core, but not shell, significantly decreased. Behavioral analysis showed that while grooming is an indicator of extinction-induced behavior, glances toward the cue-lights (sign tracking) are an index of resistance to extinction.

Results Exp. 2: (a) As in Exp. 1, during a 30-min period of cued reward delivery, DA levels again increased significantly in the NAc core but not in the NAc shell. (b) When extinction (the absence of reward with the cue lights presented) was administered 24 h after the last reward session, DA again significantly decreased in the NAc core, but not in the NAc shell.

Conclusions: (a) These results confirm the importance of DA release in the NAc for reward-related states, with DA increasing in the core, but not shell subregion. (b) They provide first evidence that during the withholding of expected reward, DA decreases in the NAc core, but not shell region. (c) This decrease in DA appears only after a delay between delivery of reward and extinction likely due to it being masked by persisting DA release. We hypothesize the decrease in extinction-induced release of DA in the NAc core to be a marker for the despair/depression that is known to accompany the failure to obtain expected rewards/reinforcers.

2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

[†] Corresponding author. Fax: +49 211 682713.E-mail addresses: cbiesdorf@gmail.com (C. Biesdorf), an-li.wang@uni-duesseldorf.de (A.-L. Wang), topic@hhu.de (B. Topic), David.Petri@uni-duesseldorf.de (D. Petri), hmilani@uem.br (H. Milani), jph@uni-duesseldorf.de (J.P. Huston), desouza@uni-duesseldorf.de (M.A. de Souza Silva).¹ Fax: +55 4430256257.² Fax: +49 211 81 12024.³ Fax: +55 4430114998.

1. Introduction

The absence of or loss of rewards or reinforcers hold a major role in the development of depression in humans and impact the onset and maintenance of psychiatric diseases, especially depressive disorder (Leventhal, 2008). In humans, the loss of reward falls into the category of stressful life events encompassing, for instance, loss of employment, partnership and health (Hammen, 2005). Behavioral conceptualizations of depression emphasize that depressive symptoms arise when positive reinforcement decreases or is withheld (extinction) and that there is a relationship between

avoidance behavior and depression that is largely explained by the mediating role of reduced positive reinforcement (Ferster, 1973; Lewinsohn, 1974; Manos, Kanter, & Busch, 2010; Martell, Addis, & Jacobson, 2001). Cognitive and behavioral avoidance increases the risk for depression by escalation of further losses of reinforcers; e.g., it was shown that the degree of cognitive and behavioral avoidance was positively related to severity of depression (Carvalho & Hopko, 2011).

Two types of animal models of extinction-induced depression (EID) have recently been established, based on the extinction of either negatively or positively reinforced behaviors (for review see Huston, De Souza Silva, Komorowski, Schulz, & Topic, 2013): The extinction of negatively reinforced escape behavior in the Morris Water Maze induced despair-like behaviors, such as an increased frequency and duration of immobility, which were attenuated by chronic antidepressant treatment (Schulz, Buddenberg, & Huston, 2007a; Schulz, Huston, Buddenberg, & Topic, 2007b; Schulz, Topic, De Souza Silva, & Huston, 2004). Extinction of water-maze escape was also accompanied by changes in monoamines neurotransmitters, neurotrophins and HPA-related stress markers, indicative of a depression-like state (Huston, Schulz, & Topic, 2009; Schulz et al., 2004; Topic, Oitzl, Meijer, Huston, & De Souza Silva, 2008b; Topic et al., 2008a).

The extinction of positively reinforced behaviors (food reward) in rats was shown to incur despair-like behaviors, such as an increase in distance from the former source of reinforcement, rearing and biting behavior, which was attenuated by treatment with antidepressant drugs, thus providing an animal model for extinction-induced depression (Huston, Van Den Brink, Komorowski, Huq, & Topic, 2012; Huston et al., 2013; Komorowski et al., 2012). The withholding or reduction in reward in rats also induces anxiety, which is well known to be comorbid with depression (Manzo, Donaire, Sabariego, Papini, & Torres, 2015; Papini, Fuchs, & Torres, 2015).

The nucleus accumbens (NAc) plays a focal role in the neural organization that controls responses to aversive and rewarding events and has been proposed to contribute importantly to the pathophysiology, symptomatology and etiology of depression (Nestler & Carlezon, 2006). The NAc and its dopaminergic inputs from the ventral tegmental area (VTA) of the midbrain have long been considered to serve as a central anatomical substrate of behaviors related to motivation, reward, and hedonia (Koob & Le Moal, 2001; Wise, 1998). Moreover, it has been shown that antidepressant treatments can alter dopaminergic activity in the VTA or its targets (Nestler & Carlezon, 2006), and that experimental manipulation of dopaminergic transmission in the VTA–NAc pathway can regulate depression-like behavior in animal models (Nestler & Carlezon, 2006). Dopaminergic abnormalities within the “limbic” areas of the brain have been observed in several animal models of depression (Dremencov et al., 2005; Kram, Kramer, Ronan, Steciuk, & Petty, 2002; Zangen, Nakash, Overstreet, & Yadid, 2001). Thus, there is growing evidence that specific molecular pathways in the VTA–NAc, which were originally implicated in the action of addictive drugs and of natural rewards, also subserve depression and antidepressant action (Nestler & Carlezon, 2006).

The NAc is divided into at least two anatomically and functionally distinct subregions, the core and the shell (Zahm & Brog, 1992), and both regions receive a strong and functionally important (Blackburn, Pfau, & Phillips, 1992; Ikemoto & Panksepp, 1999; Salamone, 1994) dopaminergic (DA) innervation from the ventral tegmental area (VTA). They have distinct input sources and output targets, with the core projecting mainly to motor structures and the shell projecting to more limbic regions, suggesting that the subregions may mediate different behavioral processes. While the afferent projections of the core region mainly arise from the substantia nigra pars compacta and lateral portions of the VTA,

the shell region receives inputs from the posteromedial VTA (Brog, Salyapongse, Deutsch, & Zahm, 1993; Ikemoto, 2007; Voorn, Jorritsma-Byham, van Dijk, & Buijs, 1986). The shell of the NAc has been attributed a role in the acquisition and expression of incentive motivation while the core compartment is thought to be involved mainly in the motor expression of motivated behavior (Bassareo & Di Chiara, 1999a,b; Berridge & Robinson, 1998; Brauer, Haeuber, & Arendt, 2000; Zahm & Brog, 1992).

The aim of the present study was to evaluate the effect of the extinction of free signaled food reward on the release of dopamine in the NAc shell and core subregions of rats by *in vivo* microdialysis. Many studies have demonstrated an increase in DA release in the NAc in relation to the presentation of conventional rewards, such as food (Bassareo, De Luca, & Di Chiara, 2002; Bassareo & Di Chiara, 1997, 1999a,b; Hajnal & Norgren, 2002; Hajnal, Smith, & Norgren, 2004; Hernandez & Hoebel, 1988; Roitman, Stuber, Phillips, Wightman, & Carelli, 2004) and a variety of self-administered drugs (Anselme, 2009; Di Chiara, 2002; Di Chiara & Bassareo, 2007; Di Chiara et al., 2004; Hernandez & Hoebel, 1988). However, there is sparse literature on the effects of withholding an expected reward (extinction) on DA levels in the NAc. We hypothesized that DA in the NAc during extinction would behave in a reciprocal direction to its response to delivery of reward. Thus, we measured DA and its metabolites during presentation of free signaled food delivered on a time schedule and also during withholding of the food reward during presentation of the conditioned light cue (discriminative stimulus). The main experimental questions posed were: A. Does DA increase in NAc core vs NAc shell during the period of signaled free reward presented on a fixed time schedule? B. Does DA change during non-reward (extinction) when only the signal (conditioned stimulus) is presented?

2. Methods

2.1. Subjects

Fifty-two (weight: 307.6 ± 6.1 g, mean \pm S.E.M.) male Wistar rats were obtained 2 weeks prior to the start of experiments from the local breeding facility (Tierversuchsanlage, University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany). They were kept in Makrolon cages (Type IV) in groups of five/cage with food and water provided *ad libitum* and maintained under a reversed 12-h light/dark cycle (lights on: 19:00 h) in a temperature- (22 ± 2 °C) and humidity-controlled room. After 10 days of familiarization to the new environment, they were submitted to a food deprivation (15 g/animal/day) schedule, which was continued until the end of the study. Moreover, they were marked on the tail with ink for identification and handled over 3 days prior to the beginning of the experiment. The weight of the animals was monitored 3 times per week and they had water freely available. After implantation of guide-cannulae they were housed individually. The study was carried out according to the German Law of Animal Protection and approved by the regional administration authority (Bezirksregierung Düsseldorf).

2.2. Apparatus and procedure

An rectangular operant chamber (72 × 28 × 34 cm), made of dimmed Plexiglas, with floor covered by a black rubber mat, with an open top, was situated in a dark, sound-attenuating box, containing a masking white noise generator. Infra-red cameras (Conrad Elektronik) were mounted on the top and side of the chamber to allow observation of behavior from two perspectives. The hardware modules (Coulbourn Industries) were placed on one of the short end-walls. The food cup with an integrated

photodetector and the food magazine were fastened in the middle of the wall. The photodetector gathered the frequency and duration of access the food cup. A light bulb with a partially open hood, offering slight diffuse illumination (1 lux), was placed at the top of the wall, whereas a triple cue lamp (green, yellow, red) was located next to the food cup. For the training session, an additional hand-switch was connected to the magazine, allowing experimenters manually to shape the animals' behavior toward the feeder. All modules were connected to a computer via a link box from PanLab and controlled by the related PackWin 2.0.01 Software. Apart from the variables measured by the PackWin Software, automatic tracking of the animals' behavior was done via center-point detection plus manually by an experienced, blinded rater with Ethovision XT 8 (Noldus). Experiments in the operant chamber began after 3 days of food deprivation. On every test day, the animals were brought to the behavioral laboratory one hour prior to start of tests and thereafter taken back to the husbandry room for feeding.

2.3. Surgery

Animals were deeply anesthetized with a mixture of ketamine hydrochloride (90.0 mg/kg, Ketavet, Pharmacia GmbH, Berlin, Germany) and xylazine hydrochloride (8.0 mg/kg, Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany) and fixed in a Kopf stereotactic frame. Two guide-cannulae with a thread on the top (14 mm, 22 G, stainless steel) were implanted, aimed at the nucleus accumbens shell (AP: +1.2 mm, ML: \pm 0.8 mm, DV: \pm 6.2 mm) and the nucleus accumbens core (AP: 1.2 mm, ML: \pm 2.8 mm, DV: 5.8 mm, 10° angle tilted laterally) in the left and right hemisphere respectively. Each animal had one guide-cannulae implanted in the left and the other in the right hemisphere. Laterality was counterbalanced within each experimental group, such that half the animals of a particular group were implanted in the right core and left shell region and vice versa. Coordinates were taken relative to bregma, according to the atlas of Paxinos and Watson (1986). They were fixed to the skull with two screws (stainless steel, d = 1.4 mm) and dental cement. After the surgery the animals were given carprofen (5 mg/kg, Rimadyl, Pfizer, GmbH, Berlin, Germany) subcutaneously. After surgery they were housed individually and allowed to recover for at least 5 days before beginning of microdialysis experimentation.

2.4. Microdialysis procedure

Experiments were conducted between 9:00 am and 6:00 pm. The dialysis probes (2.0 mm active membrane length) of a concentric design (for construction details see: Boix, Sandor, Nogueira, Huston, & Schwarting, 1995) were inserted through the guide-cannulae and fixed to the thread. Next, they were connected to syringes attached to a microdialysis pump (CMA 100) and perfused at a flow rate of 2.0 μ l/min with artificial cerebrospinal fluid containing Na⁺ 146 mM, K⁺ 4 mM, Ca²⁺ 2.2 mM and Cl⁻ 156 mM. After a stabilization period of 2 h, the samples were collected every 10 min into vials containing 5 μ l of 0.05 M HClO₄, in which 100 pg of deoxyepinephrine (Experiment 2) or 3,4-dihydroxybenzilamine (Experiment 1) was dissolved; these served as an internal standard for chromatographic analysis. The first three (Experiment 2) or six (Experiment 1) samples were taken as baseline; then the animals were submitted to the different procedures according to the protocols.

2.5. Analysis

Immediately after collection, the samples were analyzed for the content of dopamine (DA) and its metabolites 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA), using high

performance liquid chromatography. For the separation, a 125 \times 2 mm reversed phase column (120-5 C18; Macherey Nagel, Düren, Germany), perfused with a mobile phase composed of 9.5 mM chloroacetic acid, 0.53 mM sodium octyl sulfate, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 4 mM KCl, with 6% v/v acetonitrile, and 0.8% v/v tetrahydrofuran, pH adjusted to 3.25 using 6 M NaOH solution, was used. Quantification was performed by amperometric detection (Intro; Antec, Leyden, Netherlands) with the potential set at +530 mV vs an ISAAC reference electrode (Antec) at 28 °C. The limit of detection was 1 fmol per sample for DA at a signal-to-noise ratio of 2:1.

2.6. Histology

After completion of the last sampling interval, the animals were administered an overdose of pentobarbital (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Experiment 2) or placed in a chamber with CO₂ (Experiment 1) and transcardially perfused with phosphate-buffered saline, followed by 10% formalin. The brains were removed and stored in formalin (10%) until they were sliced on a cryotome, stained with Cresyl Violet and examined under a light microscope for probe localization by comparing the slices to plates from Paxinos and Watson (1986). Only animals with correct probe placed within the boundaries of the NAc shell and NAc core were considered for data analysis.

Two different experimental protocols were used (Fig. 1).

2.7. Experiment 1: DA in the NAc core vs shell during reward and extinction

The purpose of this experiment was to assess the response of dopamine in the NAc core and shell (a) during a 20-min period of cued food reward delivery, (b) during a subsequent period of extinction (with cue conditioned stimulus (CS) present in the absence of reward during 60-min period of non-reward), and (c) during a 1-h delayed 30-min extinction period (with introduction of CS to group that formerly did not undergo extinction to CS).

This protocol (Fig. 1) allows for a direct comparison between the effects of presence vs non-presence of the conditioned cue lights (discriminative stimuli), i.e. extinction vs non-extinction of appetitive behavior to the conditioned light stimuli. All animals first received signaled reward followed by cessation of reward delivery, during which in one group the cue lights were presented (extinction), whereas in two other groups the cue lights were no longer presented (non-extinction). In one of the two latter groups the cue lights were then again presented (extinction) after 60 min.

Pre-dialysis training: The following training regime (Fig. 1) was employed in order to simulate the time course of the procedure used in the subsequent microdialysis experiment: the subjects received one habituation session lasting 20 min on the first day, to allow free exploration of the apparatus without presentation of cue lights. On the second day, the subjects received a 30 min long training session. During this trial, approach or manipulation of the food cup was reinforced by a single food pellet (BioServ Dustless precision pellets) delivered to the food cup. In this trial, food pellets delivery was controlled manually via a hand-switch connected to the food magazine. For the following 5 days of acquisition trials we used a variable interval schedule (i.e. the cue-lights turned on every 57, 72, 87, 102, or 117 s for 3 s (VI: 60–120 s) and two food pellets were delivered immediately at the onset of the cue-lights), in which the cue-lights and food delivery were paired 22 times during the 30-min reinforcement procedure. The animals were placed into the operant chamber 1 h before and removed 10 min after the reinforcement procedure (total trial duration: 1 h 40 min). After the last acquisition trial, the animals were submitted to stereotactic surgery, had a recovery

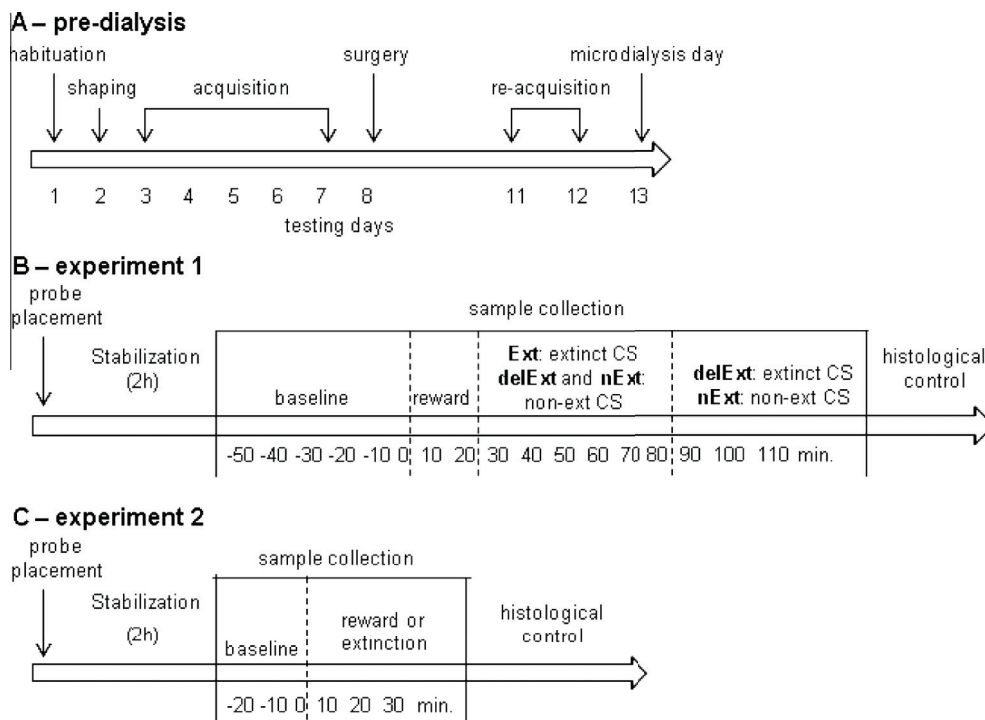


Fig. 1. Timeline of protocol: A. pre-dialysis. B. Microdialysis Experiment 1. C. Microdialysis Experiment 2.

time of five days and underwent reacquisition trials (third and fourth days after the surgery), as during acquisition.

Microdialysis: On the day of the microdialysis procedure, the animals were randomly divided into three groups (Fig. 1). After collecting the baseline sample, the treatment were applied: during the first 20 min the cue-lights and food delivery were paired 15 times using a variable interval schedule (VI: 60–120 s) for all groups. Then, in group one – extinction condition (Ext, $n = 12$): the cue-lights were presented (50 times) without food delivery during 1 h using a variable interval schedule (VI: 60–120 s). For group two – non-extinction followed by extinction condition (delExt, $n = 8$): (a) the animals were kept in the operant chamber for 1 h without cue lights being turned on and then were subjected to one session of 30 min, during which the cue lights were presented (25 times, VI: 60–120 s) without food delivery (extinction condition). The animals from the third group – non-extinction condition (nExt, $n = 10$) (b) stayed in the chamber for 1 h 30 min without cue lights.

The following categories of behavior were extracted: distance moved (cm), number of beam-breaks in the food cup (goal tracking) and mean distance to the food cup were scored using the Ethovision software (Noldus). The frequency and duration at the food cup (a contact was counted manually when the animal entered food cup with snout or touched it with forelimbs), the frequency and duration of rearing, grooming and glances/rears toward the cue-lights (sign tracking) were recorded manually by an experienced and blinded observer from the image obtained using two infra-red cameras, one mounted on the top and one on the side of the chamber, which allowed observation of behavior from two perspectives.

2.8. Experiment 2: DA in the NAc core vs shell during reward and delayed extinction

The main purpose of this experiment was to confirm the finding of experiment 1 that DA levels decrease in the NAc core, but not NAc shell if there is a delay between the period of reward

presentation and the onset of non-reinforcement (extinction). To test this hypothesis, the animals received pre-dialysis training to expect signaled reward exactly as in experiment 1. However the last day of training preceded dialysis by 24 h, hence, leading to a 24 h delay between acquisition training and extinction.

Another group which received 30 min of signaled reward was added simply to confirm that DA increases in the NAc core during presentation of reward. Thus, in the reward group the cue lights were paired with food reward and in the extinction group the cue lights were presented in the absence of reward.

Protocol. The first two days (habituation and shaping) were the same as in experiment 1. Over the next 5 days, the animals were placed into the operant chamber for a 1 h period without reward, followed by a 30 min period of signaled food reward. During the first 2 trials, the cue lights turned on every 57 s for 3 s (fixed interval FI: 60 s) and two food pellets were delivered immediately at the onset of the cue lights. From the third until the fifth day of these daily trials a 15–90 s variable interval schedule was applied (i.e. the cue-lights turned on every 12, 27, 42, 57, 72 or 87 s for 3 s (variable interval VI: 15–90 s) and two food pellets were delivered immediately at the onset of the cue-lights); thus, the cue lights and food delivery were paired thirty times during each session. The animals were removed from the operant chamber one hour after the end of the reinforcement procedure; thus, the total acquisition trial lasted 2.5 h (1 h adaptation, 30 min reinforcement procedure, 1 h time out from reward). The days following the last day of acquisition, the animals were submitted to stereotactic surgery for implantation of the guide-cannulae. Then, they had a recovery period of five days before the microdialysis procedure. On the third and fourth days they were submitted to reacquisition trials according to the protocol applied in the last three acquisition trials before guide-cannulae implantation (Fig. 1A). On the day of the microdialysis procedure (Fig. 1C), the animals were randomly assigned to the different groups: after the baseline samples were collected, the cue lights were presented (thirty-two times; VI: 15–90 s) without coincident food delivery (extinction group, $n = 12$) or with coincident food delivery (reward group, $n = 9$) during 30 min.

2.9. Statistical analysis

The behavioral data were separated into blocks, depending on the experimental phase, e.g. acquisition, re-acquisition and extinction, and analyzed by two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA), followed by one way repeated-measure ANOVAs for each of the time periods and variables, when justified. For the acquisition and re-acquisition periods, the ANOVAs included only the factor “time/trials” as within-subject factor. For the extinction condition, “treatment” was added as the between-subject factor. When indicated, independent t-tests were performed in order to compare two groups.

The neurochemical data were expressed as percentage of the mean of six (Experiment 1) or three (Experiment 2) baseline samples taken as 100%. Two-way ANOVAs with repeated measures were calculated with the factors “time” (17 or 12 time points) and “treatment” (extinction/no extinction or extinction/reward). When appropriate, this was followed by independent t-test to compare two groups. The groups with dialysis probes in NAc core and shell were analyzed separately. After histological analysis for probe placement some animals were considered only for NAc shell or only for NAc core or for both, resulting in different ns per group.

Behavioral activity, neurotransmitter and metabolites levels were also assessed using within group one-way ANOVAs for repeated measures (12- and 17-time intervals) followed by Fisher’s LSD-test vs baseline samples.

The significance level (two-tailed) was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment 1: DA in the NAc core vs shell and behaviors during reward and extinction

3.1.1. Main experimental questions

A. Reward: Does DA increase in NAc core vs NAc shell during the period of signaled reward?

B. Extinction: Do DA levels differ between the group that underwent extinction (Ext), with CS light presented during non-reward and the group in which the CS was not presented (Non-Ext)?

C. Delayed extinction: What is the influence on DA levels in NAc core and shell regions when extinction is delayed by 1 h? See also Fig. 1 for an overview.

3.1.2. Acquisition and reacquisition (pre-dialysis)

Repeated-measures ANOVAs were performed for number of beambreaks in the food cup (goal tracking) over the five acquisition and two reacquisition days. Only the general development over the trials was of interest, since the subjects were not yet assigned to treatment groups. Over the trials the number of beam-breaks significantly decreased (from 429.96 ± 33.94 to 311.57 ± 25.96) to a stable performance level ($F(6,90) = 6.520$, $p = 0.0001$). Thus, in the first trials the animals visited the food cup in an irregular pattern, independent of the light signal for delivery of food, but over trials the number of beam-breaks decreased, indicating that the subjects learned the contingency of the cue-light and the subsequent food reward. There was no significant difference between the groups that were later used for the Extinction- and Non-Extinction groups.

3.2. A. Does DA change during the period of reward and during immediate extinction?

3.2.1. DOPAMINE in NAc Core vs NAc Shell

The number of animals per group considered for statistical analyses were: NAc core: Ext, $n = 7$; nExt, $n = 14$; NAc shell: Ext, $n = 7$; nExt, $n = 13$.

The location of the dialysis membranes in the NAc core and shell is shown in Fig. 2. There was not prevalence of side, right or left, in either NAc core or shell.

Two-way ANOVAs for repeated measures were performed on the DA levels from 50 to 80 min (including baseline, reward and extinction periods) for the NAc core and NAc shell groups:

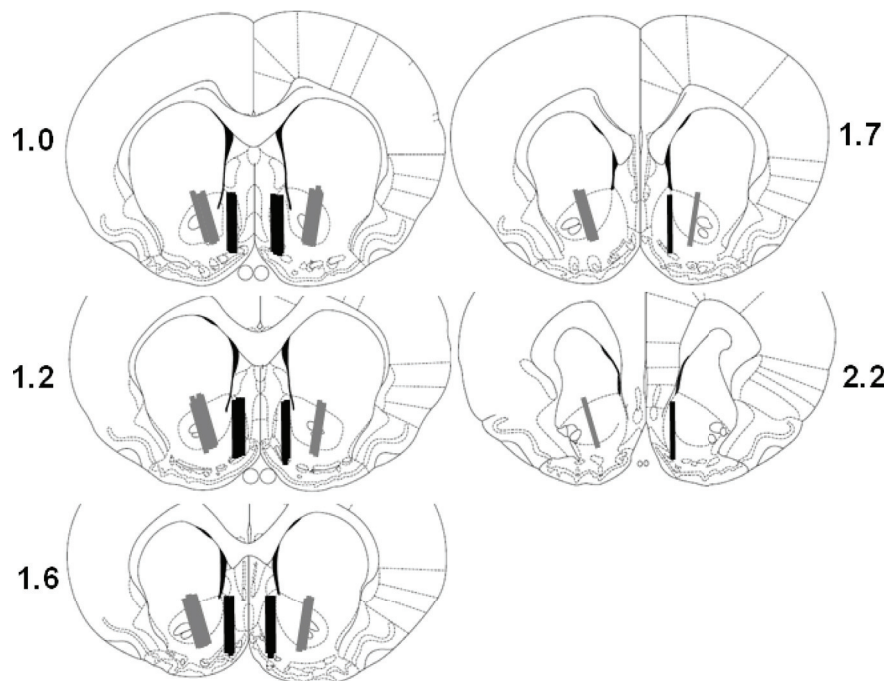


Fig. 2. Schematic representation of the placement of the dialysis probes in the core and shell of the NAc. The gray bars represent the localization of the dialysis membranes in the NAc core, and the black in the NAc shell. Numbers indicate distance from bregma (in mm) (Paxinos & Watson, 1986).

The ANOVAs yielded significant effects of time in the NAc core ($F(13,234) = 4.038$, $p = 0.0001$) and in the NAc shell ($F(13,234) = 1.786$, $p = 0.046$). (There was no effect of group in either area (Core: $F(1,18) = 0.862$, $p = 0.365$; Shell: $F(1,18) = 0.240$, $p = 0.630$) nor a time group interaction (Core: $F(13,234) = 1.072$, $p = 0.384$; Shell: $F(13,234) = 0.735$, $p = 0.727$).

One-way repeated measures ANOVAs were performed to compare the individual time samples against the baseline samples in each group:

In the NAc core (Fig. 3A), there was a significant overall increase of DA ($F(13,78) = 2.206$, $p = 0.017$) in the Ext group. Post hoc tests confirmed significantly increased DA at 10 min (during the reward period) and at 30, 40, 60 and 70 min (the extinction period) (all $p < 0.05$).

In the nExt group there was also a significant increase of DA ($F(13,156) = 2.685$, $p = 0.002$). Post-hoc tests confirmed significant increases in DA at 10 and 20 min (during the reward period) and at 30 and 50 min (during the post-reward period).

In the NAc shell (Fig. 3B), ANOVA did not indicate any significant changes of DA in groups Ext ($F(13,78) = 1.418$, $p = 0.170$) and nExt ($F(13,156) = 0.932$, $p = 0.521$).

In summary, (a) During the reward period, DA increased significantly in the NAc core, but not shell subregion; (b) During the post-reward period, DA remained significantly increased in both, the group that underwent extinction and in the group that did not undergo extinction to the signal CS. (c) During extinction, the DA levels did not differ significantly between the groups that underwent extinction (with the CS light presented during non-reward) and the groups that did not (CS not presented), providing no evidence for a decrease in DA during immediate extinction in either NAc core or shell regions.

3.3. B. Effects of delayed (1 h delay) extinction on DA levels in NAc core and shell regions

For this purpose we split the groups that did not undergo initial extinction during the 30–80 min period into one that now underwent delayed extinction for 30 min by presenting the CS cue without reward (delExt) and a non-extinction group that continued to be tested without the CS presented (nExt). NAc core: nExt, $n = 7$; delExt, $n = 7$. NAc shell: nExt, $n = 7$; delExt, $n = 6$ (Fig. 3A and B, 80–110 min).

Two-way repeated measures ANOVA performed on the groups delExt and nExt for samples taken from 80 to 110 min revealed only a significant time group interaction in the NAc core ($F(3,36) = 3.042$, $p = 0.040$): (There were no significant effects of time (Core: $F(3,36) = 0.348$, $p = 0.791$; Shell: $F(3,30) = 0.899$, $p = 0.453$), of group (Core: $F(1,12) = 2.609$, $p = 0.132$; Shell: $F(1,10) = 0.843$, $p = 0.380$) nor time group interaction in the NAc shell ($F(3,30) = 1.140$, $p = 0.349$).

One-way repeated measures ANOVAs, were performed to compare the 90–110 min samples with the last sample before the treatment (80 min) in each group: In the NAc core (Fig. 3A) there was a significant effect of group ($F(3,18) = 3.336$, $p = 0.043$) in the delExt group, confirmed by a significant decrease in DA at 100 min (post-hoc test, $p < 0.05$). There was no effect of group in the nExt group ($F(3,18) = 0.919$, $p = 0.452$).

In the NAc shell (Fig. 3B) there were no significant effects for group in either the delExt ($F(3,12) = 2.690$, $p = 0.093$) or nExt groups ($F(3,18) = 0.199$, $p = 0.896$).

Thus, dopamine significantly decreased during extinction in the NAc core when there was a 1 h delay between the periods of signaled reward and presentation of the signal in absence of reward (extinction).

3.4. DOPAC

3.4.1. Reward and immediate extinction

Two-way ANOVAs for repeated measures were performed on the DOPAC levels from 50 to 80 min (including baseline, reward and extinction periods) for the NAc core and NAc shell groups: The ANOVAs yielded significant effects of time in the NAc core ($F(13,247) = 2.154$, $p = 0.012$) and in the NAc shell ($F(13,234) = 4.705$, $p = 0.0001$). (There was no effect of group in either area (Core: $F(1,19) = 2.984$, $p = 0.100$; Shell: $F(1,18) = 0.102$, $p = 0.753$). There was a significant time group interaction in the NAc core ($F(13,247) = 2.099$, $p = 0.015$), but not the NAc shell ($F(13,234) = 0.730$, $p = 0.733$).

One-way repeated measures ANOVAs were performed to compare the individual time samples against the baseline samples in each group:

In the NAc core (Fig. 3C), there was a significant overall increase of DOPAC ($F(13,169) = 4.308$, $p = 0.0001$) in the nExt group. Post hoc tests confirmed significantly increased DOPAC at 10 and 20 min (during the reward period) and at 30, 40, 50, 60, 70 and 80 min (the post-reward period) (all $p < 0.05$). In the Ext group there was no significant increase of DOPAC ($F(13,78) = 1.236$, $p = 0.271$).

In the NAc shell (Fig. 3D), there was a significant overall increase of DOPAC ($F(13,78) = 2.482$, $p = 0.007$) in the Ext group. Post hoc tests confirmed significantly increased DOPAC at 10 and 20 min (during the reward period) and at 30, 40 and 50 min (the extinction period) (all $p < 0.05$).

In the nExt group there was also a significant increase of DOPAC ($F(13,156) = 3.958$, $p = 0.001$). Post-hoc tests confirmed significant increases in DOPAC at 20 min (during the reward period) and at 30, 40, 50, 60 and 80 min (during the non-extinction period).

3.4.2. Delayed extinction

Two-way repeated measures ANOVA for the groups delExt and nExt for samples taken from 80 to 110 min revealed no significant effects of time (Core: $F(3,36) = 0.587$, $p = 0.627$; Shell: $F(3,30) = 0.686$, $p = 0.568$), of group (Core: $F(1,12) = 0.011$, $p = 0.919$; Shell: $F(1,10) = 2.799$, $p = 0.125$) nor a time group interaction (Core: $F(3,36) = 0.170$, $p = 0.916$; Shell: $F(3,30) = 0.421$, $p = 0.739$).

One-way repeated measures ANOVAs, were performed to compare the 90–110 min samples with the last sample before the treatment (80 min) in each group: In the NAc core (Fig. 3C) there was no significant change in the delExt group ($F(3,18) = 0.144$, $p = 0.932$), nor in the nExt group ($F(3,18) = 0.702$, $p = 0.563$). Also in the NAc shell (Fig. 3D) there were no significant effects in either the delExt ($F(3,12) = 0.138$, $p = 0.935$) or nExt groups ($F(3,18) = 0.948$, $p = 0.438$).

3.5. HVA

3.5.1. Reward and immediate extinction

Two-way ANOVAs for repeated measures were performed on the HVA levels from 50 to 80 min (including baseline, reward and extinction periods) for the NAc core and NAc shell groups. The ANOVAs yielded significant effects of time in the NAc core ($F(13,247) = 7.734$, $p = 0.0001$) and in the NAc shell ($F(13,221) = 4.210$, $p = 0.0001$). (There was no effect of group in either area (Core: $F(1,19) = 4.155$, $p = 0.056$ (borderline); Shell: $F(1,17) = 0.467$, $p = 0.503$). There was a significant time group interaction in the NAc core ($F(13,247) = 2.142$, $p = 0.013$), but not the NAc shell ($F(13,221) = 0.693$, $p = 0.769$).

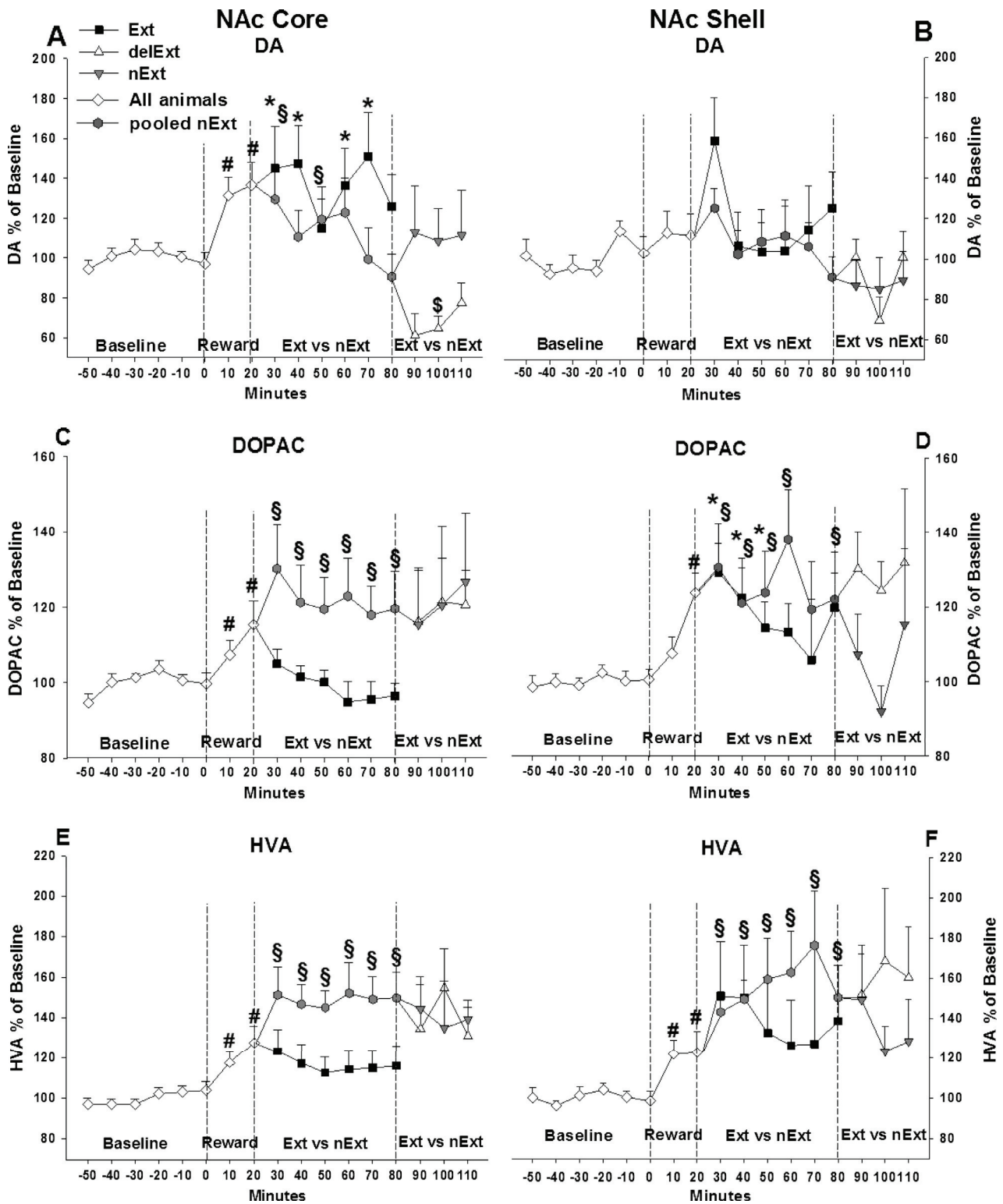


Fig. 3. Levels of DA, DOPAC and HVA in the NAc core and shell expressed as mean (+SEM) per cent of baseline, with the mean of six baseline taken as 100%. Sample size: NAc core: Ext, n = 7; delExt, n = 7; nExt, n = 7; NAc shell: Ext, n = 7; delExt, n = 6; nExt, n = 7; $p < 0.05$, comparing with the Ext baseline; $§ p < 0.05$, comparing with the pooled nExt baseline; $# p < 0.05$, comparing with the pooled group “all animals” baseline; $$ p < 0.05$, comparing with the delExt eighth sample. Groups were pooled in the figure whenever submitted to the same procedure.

One-way repeated measures ANOVAs were performed to compare the individual time samples against the baseline samples in each group:

In the NAc core (Fig. 3E), there was a significant overall increase of HVA ($F(13,169) = 10.617, p = 0.0001$) in the nExt group. Post hoc

tests confirmed significantly increased HVA at 10 and 20 min (during the reward period) and at 30, 40, 50, 60, 70 and 80 min (the non-extinction period) (all $p < 0.05$). In the Ext group there was no significant increase of HVA ($F(13,78) = 1.742, p = 0.068$) (borderline). In the NAc shell (Fig. 3F), there was a significant

overall increase of HVA ($F(13,156) = 5.100$, $p = 0.001$) in the nExt group. Post hoc tests confirmed significantly increased HVA at 20 min (during the reward period) and at 30, 40, 50, 60, 70 and 80 min (the post-reward period) (all $p < 0.05$).

In the Ext group there was no significant increase of HVA ($F(13,65) = 1.216$, $p = 0.289$).

3.5.2. Delayed extinction

Two-way repeated measures ANOVA for the groups delExt and nExt for samples taken from 80 to 110 min revealed no significant effects of time (Core: $F(3,36) = 0.654$, $p = 0.586$; Shell: $F(3,30) = 0.987$, $p = 0.412$), of group (Core: $F(1,12) = 0.001$, $p = 0.988$; Shell: $F(1,10) = 0.081$, $p = 0.752$) nor time group interaction (Core: $F(3,36) = 0.762$, $p = 0.523$; Shell: $F(3,30) = 0.329$, $p = 0.804$).

One-way repeated measures ANOVAs, were performed to compare the 90–110 min samples with the last sample before the treatment (80 min) in each group: In the NAc core (Fig. 3E) there was no significant change in the delExt group ($F(3,18) = 1.589$, $p = 0.227$), nor in the nExt group ($F(3,18) = 0.303$, $p = 0.823$). Also in the NAc shell (Fig. 3F) there were no significant effects in either the delExt ($F(3,12) = 0.1044$, $p = 0.409$) or nExt groups ($F(3,18) = 0.835$, $p = 0.492$).

3.5.3. Metabolites summary

In the NAc core, both DOPAC and HVA levels increased during the reward period and remained elevated during the post-reward period only in the group that did not undergo extinction to the CS. In the NAc shell DOPAC increased during the reward period and remained elevated during the post-reward period in both, the group that underwent extinction to the CS and the group that did not undergo extinction. HVA also increased during the reward period and remained elevated during the post-reward period, but only in the group that did not undergo extinction to the CS.

3.6. Behaviors during microdialysis

The behavioral measures were analyzed during the reward condition (samples 10–20 min), the immediately subsequent extinction condition (samples 30–80 min) and the delayed extinction condition (samples 90–110 min) (Fig. 4):

Rearing: Analyses of the groups Ext and nExt (-50 to 80 min) using two-way repeated measures ANOVA showed that over time, the duration ($F(13,338) = 12.885$, $p = 0.0001$) and frequency ($F(13,351) = 16.005$, $p = 0.0001$) of rearing changed significantly, but there was no time group interaction (duration: $F(13,338) = 0.915$, $p = 0.537$; frequency: $F(13,351) = 0.584$, $p = 0.867$) nor effect of group (duration: $F(1,26) = 1.979$, $p = 0.171$; frequency: $F(1,27) = 0.752$, $p = 0.393$).

One-way repeated measures ANOVA, performed to compare 10-min blocks of behavior against the baseline showed that in group Ext there was an increase of duration of rearing ($F(13,143) = 6.993$, $p = 0.0001$) at 10 and 20 min (reward period) and 30 and 40 min (extinction post-reward period) and frequency of rearing ($F(13,143) = 7.837$, $p = 0.0001$) at 10 and 20 min (reward period) and 30, 40 and 60 min (extinction post-reward period) (all $p < 0.05$). In the group nExt there was an increase of duration ($F(13,195) = 5.571$, $p = 0.0001$) at 10 and 20 min (reward period) and 30 and 40 min (post-reward period) ($p = 0.05$) and of frequency of rearing ($F(13,208) = 7.953$, $p = 0.0001$) at 10 and 20 (reward period) and 30 min (post-reward period) (all $p < 0.05$).

Two-way repeated measures ANOVA of the groups delExt and nExt from the time 80 to 110 min showed no effect of time (duration: $F(3,48) = 2.098$, $p = 0.113$; frequency: $F(3,48) = 2.132$, $p = 0.109$), of group (duration: $F(1,16) = 0.275$, $p = 0.607$; frequency: $F(1,16) = 0.361$, $p = 0.556$) nor time group interaction (duration: $F(3,48) = 1.164$, $p = 0.333$; frequency: $F(3,48) = 0.809$,

$p = 0.495$). One-way repeated measures ANOVAs performed to compare the 90–110 min with the last time before the treatment (80 min) showed no significant change in the delExt (duration: $F(3,21) = 0.489$, $p = 0.693$; frequency: $F(3,21) = 1.345$, $p = 0.287$) and in the nExt (duration: $F(3,27) = 2.162$, $p = 0.116$; frequency: $F(3,27) = 1.549$, $p = 0.225$).

Thus, the rearing measures increased during the reward period and continued to be higher during the post-reward period in both groups, but persisted longer in the extinguished group. Hence, frequency and duration of rearing are indices of extinction-induced behaviors.

Grooming: Analyses of the groups Ext and nExt (-50 to 80 min) using two-way repeated measures ANOVA showed that over the time, the duration ($F(13,351) = 4.808$, $p = 0.0001$) and frequency ($F(13,351) = 4.086$, $p = 0.0001$) of grooming changed, but there was no time group interaction (duration: $F(13,351) = 1.494$, $p = 0.117$; frequency: $F(13,351) = 0.917$, $p = 0.535$) nor effect of group (duration: $F(1,27) = 1.433$, $p = 0.242$; frequency: $F(1,27) = 0.590$, $p = 0.449$).

One-way repeated measures ANOVA, performed to compare 10-min blocks of behavior against the baseline showed that in the group Ext there was an increase in the duration of grooming over baseline ($F(13,143) = 3.504$, $p = 0.0001$) at 10, 20 min (reward period) and 30, 40, 50, 60 and 70 min (extinction post-reward period) and of the frequency of grooming ($F(13,143) = 2.717$, $p = 0.002$) at 30, 40 and 50 min (extinction post-reward period) (all $p < 0.05$). In the group nExt there was an increase in duration ($F(13,208) = 2.303$, $p = 0.007$) at 20 (reward period) and 30 and 40 min (post-reward period), but no change in the frequency of grooming ($F(13,208) = 1.314$, $p = 0.207$).

Two-way repeated measures ANOVA of the groups delExt and nExt from the time 80 to 110 min showed no effects of time (duration: $F(3,48) = 2.374$, $p = 0.082$; frequency: $F(3,48) = 0.558$, $p = 0.646$), of group (duration: $F(1,16) = 1.465$, $p = 0.244$; frequency: $F(1,16) = 1.892$, $p = 0.188$) nor time group interaction (duration: $F(3,48) = 1.035$, $p = 0.385$; frequency: $F(3,48) = 1.199$, $p = 0.320$). One-way repeated measures ANOVAs performed to compare the 90–110 min with the last time before the treatment (80 min) showed no significant change in the delExt (duration: $F(3,21) = 2.337$, $p = 0.103$; frequency: $F(3,21) = 1.124$, $p = 0.362$) and in the nExt (duration: $F(3,27) = 1.748$, $p = 0.181$; frequency: $F(3,27) = 0.849$, $p = 0.479$).

In summary, an increase in frequency of grooming during the immediate post-reward period only appeared in the group submitted to extinction. Hence, the frequency of grooming is an extinction-induced behavior.

Duration and frequency at the food cup: Analyses of the groups Ext and nExt (-50 to 80 min) using two-way repeated measures ANOVA showed that over time, the duration ($F(13,351) = 33.875$, $p = 0.0001$) and frequency ($F(13,351) = 52.537$, $p = 0.0001$) at the food cup changed, but there were no time group interaction (duration: $F(13,351) = 0.671$, $p = 0.791$; frequency: $F(13,351) = 0.310$, $p = 0.990$) nor effect of group (duration: $F(1,27) = 0.110$, $p = 0.742$; frequency: $F(1,27) = 0.377$, $p = 0.544$).

One-way repeated measures ANOVAs showed that in the Ext group the duration at the food cup increased over baseline ($F(13,143) = 17.019$, $p = 0.0001$) at 10, 20 min (reward period) and 30 and 40 min (post-reward period) and the frequency at the food cup increased ($F(13,143) = 22.835$, $p = 0.0001$) at 10 and 20 (reward period) and 30, 40, 50 and 60 min (post-reward period) (all $p < 0.05$). In the group nExt there was an increase in duration ($F(13,208) = 19.775$, $p = 0.0001$) and frequency at the food cup ($F(13,208) = 31.182$, $p = 0.0001$) at 10 and 20 min (reward period) and 30 and 40 min (post-reward period) (all $p < 0.05$).

Two-way repeated measures ANOVA of the groups delExt and nExt from the time 80 to 110 min showed no effect of time

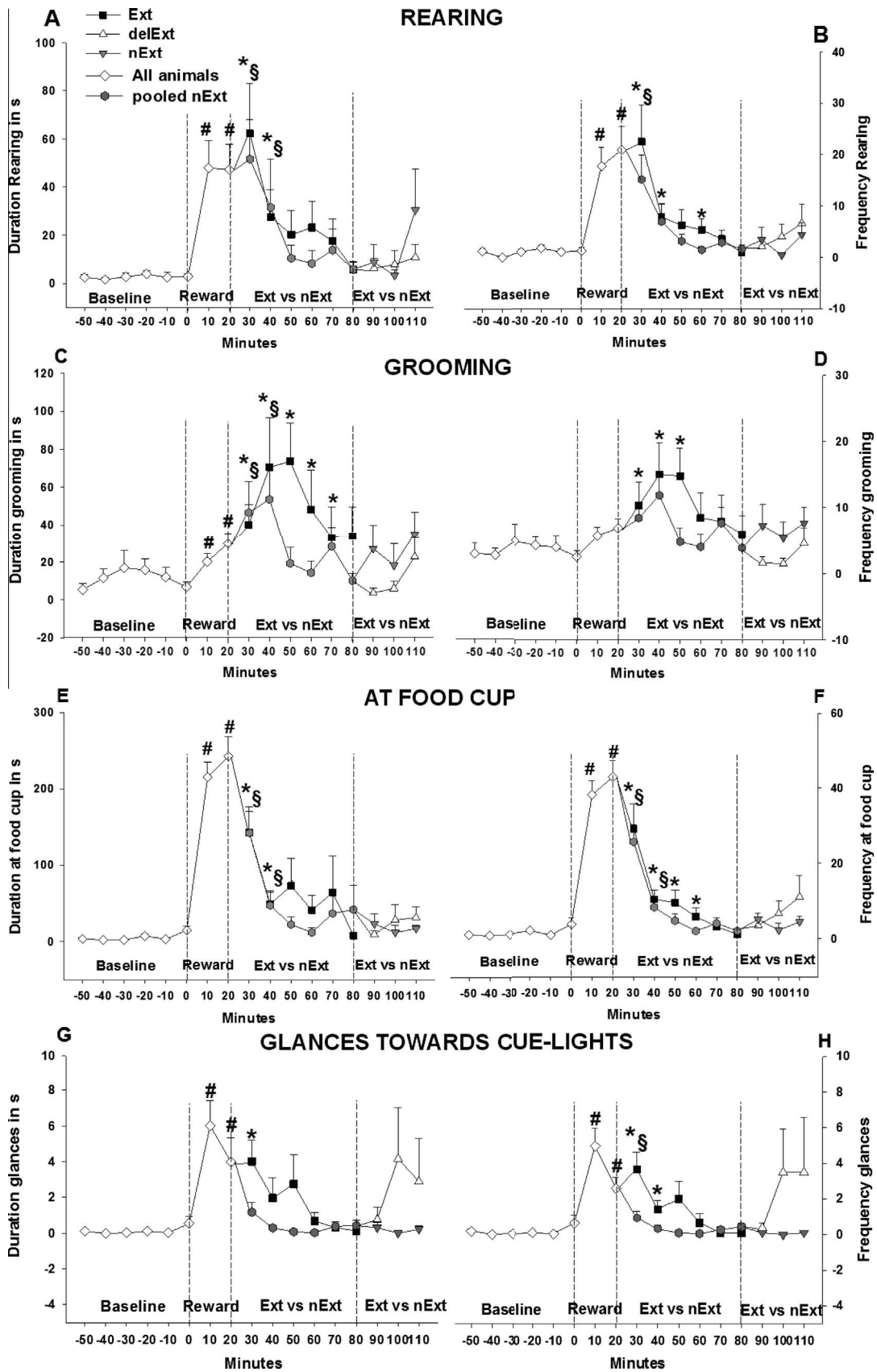


Fig. 4. Duration and frequency of rearing (A and B), grooming (C and D), permanence at the food cup (E and F) and glances toward the cue-lights (G and H). Data are mean (+SEM). Sample size: Ext, n = 11–12; delExt, n = 8; nExt, n = 9–10. #p < 0.05, comparing with the Ext baseline; \$p < 0.05, comparing with the pooled nExt baseline; *p < 0.05, comparing with the pooled group “all animals” baseline. Groups were pooled whenever submitted to the same procedure.

(duration: $F(3,48) = 0.545$, $p = 0.646$; frequency: $F(3,48) = 2.661$, $p = 0.059$), of group (duration: $F(1,16) = 1.058$, $p = 0.319$; frequency: $F(1,16) = 0.971$, $p = 0.339$) nor a time group interaction (duration: $F(3,48) = 0.730$, $p = 0.539$; frequency: $F(3,48) = 1.754$, $p = 0.169$). One-way repeated measures ANOVAs performed to compare the 90–110 min with the last time before the treatment (80 min) showed no significant changes in the delExt group (duration: $F(3,21) = 0.530$, $p = 0.667$; frequency: $F(3,21) = 2.096$, $p = 0.131$) and nExt group (duration: $F(3,27) = 0.288$, $p = 0.834$; frequency: $F(3,27) = 1.324$, $p = 0.287$).

Thus, the duration and frequency at the food cup decreased over time during the immediate post-reward period in the extinction and non-extinction groups, but persisted much longer in the extinction group, showing the course of behavioral extinction.

Duration and frequency of glances toward the cue-lights (sign tracking): Analyses of the groups Ext and nExt (50 to 80 min) using two-way repeated measures ANOVA showed an effect over time for the duration ($F(13,351) = 10.123$, $p = 0.0001$) and frequency ($F(13,351) = 15.239$, $p = 0.0001$) of glances toward the cue-lights, and also a time group interaction for frequency ($F(13,351) = 1.796$, $p = 0.042$), but there was no time group interaction for duration ($F(13,351) = 1.282$, $p = 0.222$), nor an effect of group (duration: $F(1,27) = 2.163$, $p = 0.153$; frequency: $F(1,27) = 2.682$, $p = 0.113$).

One-way repeated measures ANOVA showed that in the group Ext the duration of glances toward the cue lights increased ($F(13,143) = 4.578$, $p = 0.0001$) at 10 min (reward period) and 30 min (extinction post-reward period) and frequency of glances increased ($F(13,143) = 5.926$, $p = 0.0001$) at 10 min (reward period) and 30 and 40 min (extinction post-reward period) (all $p < 0.05$). And in the group nExt there was an increase of duration ($F(13,208) = 6.380$, $p = 0.0001$) at 10 and 20 min (reward period) ($p < 0.05$) and of frequency of glances ($F(13,208) = 12.167$, $p = 0.0001$) at 10 and 20 (reward period) and 30 min (post-reward period) (all $p < 0.05$).

Two-way repeated measures ANOVA of the groups delExt and nExt from the time 80 to 110 min showed no effect of time (duration: $F(3,48) = 1.392$, $p = 0.257$; frequency: $F(3,48) = 1.544$, $p = 0.215$), of group (duration: $F(1,16) = 1.906$, $p = 0.186$; frequency: $F(1,16) = 1.896$, $p = 0.188$) nor time group interaction (duration: $F(3,48) = 2.271$, $p = 0.092$; frequency: $F(3,48) = 1.986$, $p = 0.129$). One-way repeated measures ANOVAs performed to compare the 90–110 min with the last time before the treatment (80 min) showed no significant change in the delExt (duration: $F(3,21) = 1.524$, $p = 0.238$; frequency: $F(3,21) = 1.396$, $p = 0.272$) and in the nExt (duration: $F(3,27) = 0.572$, $p = 0.638$; frequency: $F(3,27) = 1.588$, $p = 0.215$).

Thus, duration of glances at the cue lights extended into the post-reward session only in the extinction group, indicating this measure to be an index of resistance to extinction. Its time-dependent decline serves as a measure of behavioral extinction.

The behavioral effects can be summarized as follows: 1. During the Period of signaled reward there was an increase in rearing, grooming, time at food cup and glances at cue lights (sign tracking). 2. During the Immediate post-reward period (a) glances at cue lights (sign tracking) decreased over time in both, the extinction and non-extinction groups, but were maintained at a higher level in the extinction group in which the cue lights were presented, (b) grooming increased over time in the group submitted to extinction and, thus, is an extinction-induced behavior and (c) rearing decreased over time comparably in both, the extinction and non-extinction groups. 3. During the period of 90–110 min, grooming decreased (but not significantly) in the group submitted to delayed extinction. This group also glanced more often at the cue

lights, which were introduced during this period to establish extinction to the CS.

3.7. Experiment 2: Dopamine in the NAc core vs shell during reward presentation and delayed extinction

The purpose of this experiment was (a) to confirm the finding of experiment 1 that DA levels decrease in the NAc core, but not NAc shell if there is a delay between the period of reward presentation and the onset of non-reinforcement (extinction) and (b) to confirm whether DA increases in the NAc during presentation of reward.

Pre-dialysis acquisition and reacquisition: Repeated-measure ANOVAs were performed on mean distance to the food cup over the course of the 5 acquisition and 2 reacquisition days. As subjects were not yet assigned to any treatment groups, only the general development over the trials was of interest. The mean distance to the food cup decreased significantly over days ($F(6,72) = 2.528$, $p = 0.028$), showing that the subjects had learned the contingency of the cue-light and the consecutive food reward. There were no significant differences between the groups that were later split into a reward and extinction groups.

3.7.1. DA and metabolites – NAc Core vs NAc shell

The number of animals per group considered for statistical analyses were: NAc core: extinction, $n = 8$; reward, $n = 8$; NAc shell: extinction, $n = 9$; reward, $n = 6$.

The location of the dialysis membranes in the NAc core and shell is shown in Fig. 2.

3.7.2. DOPAMINE

The mean basal levels of DA were 5.73 ± 0.60 pg in the NAc core and 6.79 ± 0.85 pg in the NAc shell. Basal values of DA were comparable between groups ($p > 0.05$). Two-way ANOVA for the NAc core showed a significant time group interaction ($F(5,70) = 3.347$, $p = 0.009$) and an effect of group ($F(1,14) = 14.960$, $p = 0.002$), but no effect of time ($F(5,70) = 1.036$, $p = 0.403$). Thus, the DA levels were significantly elevated in the reward group as compared to the extinction group (Fig. 5A). For the NAc shell it did not show any main effects (time: $F(5,65) = 1.002$, $p = 0.424$, time group interaction: $F(5,65) = 2.092$, $p = 0.078$ or group: $F(1,13) = 3.133$, $p = 0.100$) (Fig. 5B).

For the NAc core, extinction group, one-way repeated measures ANOVA, performed to compare the treatment samples against the baseline samples, showed a significant decrease of DA ($F(5,35) = 2.199$, $p = 0.038$, one tailed). Pre-planned post-hoc comparisons (Fisher's LSD-test vs baseline samples) confirmed significant decreases in DA at 10 and 20 min (all $p < 0.05$).

One-way repeated measures ANOVA on the reward group showed a significant increase of DA ($F(5,35) = 2.189$, $p = 0.039$). Post-hoc test confirmed a significant increase at 30 min ($p < 0.05$).

In summary, the absence of reward during presentation of the cue lights (extinction) led to a significant decrease of DA in the NAc core, but not in the NAc shell. During the period of cued reward delivery, DA levels increased significantly in the NAc core, but not in the NAc shell.

3.7.3. DOPAC

The mean basal levels of DOPAC were 1145.70 ± 46.08 pg in the NAc core and 952.60 ± 70.67 pg in the NAc shell. Basal values of DOPAC were comparable between groups ($p > 0.05$). Two-way ANOVA in NAc core yielded a main effect of group ($F(1,14) = 5.420$, $p = 0.035$), but no effects of time ($F(5,70) = 0.408$, $p = 0.841$) and time group interaction ($F(5,70) = 1.383$, $p = 0.241$) (Fig. 5C). In the NAc shell there were effects of group ($F(1,13) = 6.024$, $p = 0.029$), time ($F(5,65) = 5.291$, $p = 0.0001$) and time group interaction ($F(5,65) = 4.423$, $p = 0.002$) (Fig. 5D).

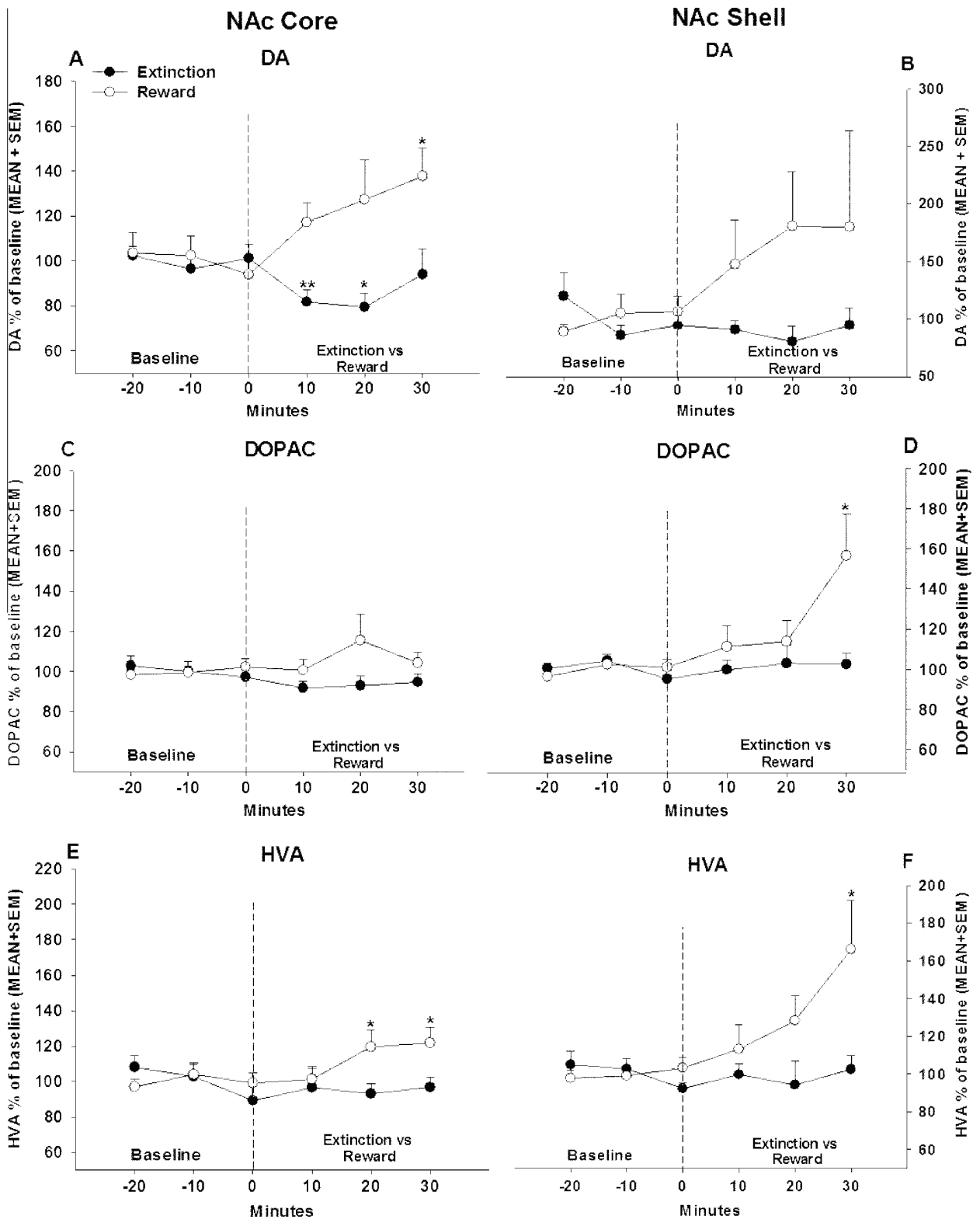


Fig. 5. Levels of DA, DOPAC and HVA in the NAc core and shell expressed as mean (+SEM) per cent of baseline, with the mean of three baseline taken as 100%. Sample size: NAc core: extinction, n = 8; reward, n = 8; NAc shell: extinction, n = 9; reward, n = 6; *p < 0.05, **p < 0.001 comparing to baseline samples.

Thus, in both subregions DOPAC was significantly higher in the reward compared to the extinction group.

One-way repeated measures ANOVA comparing treatment with baseline showed no significant changes of DOPAC in the NAc core in the extinction group ($F(5,35) = 0.887, p = 0.5$) nor in the reward group ($F(5,35) = 0.90, p = 0.492$). It showed a significant increase

($F(5,25) = 4.337, p = 0.006$) of DOPAC in the NAc shell in the reward group, confirmed with post-hoc test at 30 min ($p < 0.05$), but no significant changes in the extinction group ($F(5,40) = 0.517, p = 0.762$).

In summary, DOPAC levels significantly increased only in the NAc shell, in the reward group relative to baseline.

3.7.4. HVA

The mean basal levels of HVA were 447.60 ± 35.02 pg in the NAc core and 206.09 ± 20.76 pg in the NAc shell. These did not differ between groups ($p > 0.05$). Two-way ANOVA yielded in the NAc shell an effect of time ($F(5,65) = 3.808$, $p = 0.004$), of group ($F(1,13) = 7.443$, $p = 0.017$) and a time group interaction ($F(5,65) = 3.714$, $p = 0.005$) (Fig. 5F). In the NAc core there was a significant effect of group ($F(1,14) = 4.451$, $p = 0.0053$), but no effect of time ($F(5,70) = 0.935$, $p = 0.464$), nor a time group interaction ($F(5,70) = 1.702$, $p = 0.146$) (Fig. 5E).

One-way repeated measures ANOVA comparing treatment with baseline showed that in the NAc core of the reward group HVA increased significantly ($F(5,35) = 2.496$, $p = 0.049$), as confirmed by post-hoc test at 20 and 30 min (all $p < 0.05$), but did not change in the extinction group ($F(5,35) = 0.600$, $p = 0.700$). In the NAc shell of the reward group HVA also increased significantly ($F(5,25) = 3.845$, $p = 0.010$) (confirmed by post-hoc test at 30 min ($p < 0.05$)), but not in the extinction group ($F(5,40) = 0.528$, $p = 0.754$).

In summary, the levels of HVA in both, NAc core and NAc shell, increased during cued reward delivery.

4. Discussion

In experiment 1 we found that during a 20-min period of free cued food delivery, DA increased significantly in the NAc core, but not shell subregion. This increase persisted into the subsequent 60-min post-reward period in both subgroups – a group that was subjected to extinction (no reward with CS cue lights presented) and also in a group that did not undergo extinction (CS not presented during non-reward). Thus, these data provide no evidence for a decrease in DA during extinction in either NAc core or shell regions. Instead, they indicate that the increase in DA outlasted the period of reward presentation. However, when there was a 1 h interval between the reward and the extinction periods, DA in the NAc core, but not shell, decreased during the 30-min extinction period, providing first evidence that DA in the NAc core decreases during extinction, but only when there is a (1 h) delay between reward and extinction.

Experiment 2 confirmed the finding of experiment 1, showing that during a 30-min period of cued free reward delivery, DA levels increased significantly in the NAc core but not in the NAc shell. More important, it also confirmed that when there was an interval between the reward and extinction (in this case 24 h), DA significantly decreased in the NAc core, but not in the NAc shell as in experiment 1.

These findings of an increase in DA release during signaled reward only in the NAc core, is in agreement with other microdialysis studies in the rat. Although it was shown that appetitive taste stimuli release DA in both the NAc shell and core subregions (Bassareo & Di Chiara, 1997; Hajnal et al., 2004), the responsiveness of DA in the NAc shell was shown to differ from that in the core, as it is dependent upon the hedonic valence (appetitive or aversive) (Bassareo et al., 2002) and relative novelty of the taste stimuli (Bassareo & Di Chiara, 1997, 1999a; Bassareo et al., 2002). Bassareo et al. (2002) showed that NAc shell DA release is stimulated by unfamiliar appetitive tastes and that NAc shell DA responsiveness habituates after a single exposure to palatable food in a taste-specific manner (Bassareo & Di Chiara, 1997, 1999b; Bassareo et al., 2002). On the other hand, in the NAc core taste stimuli were found to release DA independent of their positive or negative hedonic valence, and not to show single-trial habituation (Bassareo & Di Chiara, 1997; Bassareo et al., 2002). Bassareo et al. (2015) investigated the role of response-contingency and sucrose-related cues on DA transmission in NAc shell and core,

showing that repeated feeding of sucrose induced habituation of NAc shell DA responsiveness, since sucrose feeding increased dialysate shell DA only on the first day of feeding but not on the following days. The habituation of DA responsiveness to feeding of palatable foods was also shown for salty and sweet food (Bassareo & Di Chiara, 1997, 1999b). Our finding of increased DA levels in the NAc core, but not in shell during cued reward delivery, is in accordance with these studies, since in our protocol the animals had undergone considerable acquisition training with the food pellets prior to the microdialysis sessions and, thus, can be considered to have habituated to their taste and novelty. Ambroggi, Ghazizadeh, Nicola, and Fields (2011) presented findings of high relevance for our results, namely a dissociation of core and shell contributions to discriminative stimulus task performance. Inactivation of the NAc core, but not shell, decreased responding to a reward-predictive cue and inactivation of the shell, but not core, significantly increased responding to the reward-signaling cue. In addition, a reward-predictive cue elicited more frequent and larger magnitude responses in the NAc core than in the shell and more NAc shell neurons selectively responded to a non-rewarded stimulus.

Differential functional roles of the core and shell subregions of the ventral striatum have been described in terms of value coding and prediction (expectation) monitoring. As mentioned above, the shell region may mediate the direct hedonic value of a stimulus. Uncued application of food-related stimuli evoked an increase in shell DA levels (Bassareo & Di Chiara, 1997, 1999a; Roitman, Wheeler, Wightman, & Carelli, 2008), while bitter tasting quinine solution transiently decreased DA in the shell (Roitman et al., 2008; Wheeler et al., 2011). Importantly, an increase in DA was not observed in the core region. The same pattern also applies to effects induced by uncued drug administration. Cocaine application significantly increased DA in the shell (Aragona et al., 2008). Different functional aspects have been attributed to the core portion. Transients in DA have been shown to reflect cue-associated expectations of outcome, i.e. prediction errors (Rescorla & Wagner, 1972; Schultz, 2010; Sutton & Barto, 1981). Differences in DA levels in the core are greatest if the difference between the expected and actual outcome is greatest (Bassareo & Di Chiara, 1997, 1999a,b; Bayer & Glimcher, 2005; Day, Roitman, Wightman, & Carelli, 2007; Fiorillo, Tobler, & Schultz, 2003; Morris, Arkadir, Nevet, Vaadia, & Bergman, 2004; Nakahara, Itoh, Kawagoe, Takikawa, & Hikosaka, 2004; Satoh, Nakai, Sato, & Kimura, 2003; Tobler, Fiorillo, & Schultz, 2005). In the current study, no differences were seen with respect to the shell region, as in both conditions (delExt vs nExt) rewards were not provided, i.e. no hedonic value coding could have occurred. However, differences in core DA were observed, reflecting differences in cue-associated predictions. The experienced and, in turn, anticipated loss of reward predicted by external stimuli has been described as a key component in EID (Huston et al., 2013) and the current data provide evidence that modulation of core, and not shell, DA levels mediates this mechanism. In line with this, findings from human neuroimaging demonstrated that the receipt of reward enhances, whereas reward omission reduces activity in the NAc, amygdala, and prefrontal cortex, (Breiter, Aharon, Kahneman, Dale, & Shizgal, 2001; Delgado, Nystrom, Fissell, Noll, & Fiez, 2000; Knutson, Fong, Adams, Varner, & Hommer, 2001; O'Doherty et al., 2001). The NAc exhibits greater activation to rewarded, relative to non-rewarded trials and appears to be sensitive to violations in expected reward outcomes (Spicer et al., 2007). These results are in concert with our finding of reduced DA release during the withholding of food reward in the NAc core. Concerning the differential roles of D1- and D2-like DA receptors in this context, it has been shown that pharmacologic antagonism of D1-like DA receptors blocks cue-induced reinstatement of operant

behavior for food rewards that underwent extinction (Ball, Combs, & Beyer, 2011).

DA decreases only during delayed extinction. There are various possible explanations for the finding that the delayed, but not immediate withholding of reward resulted in the decrease in NAc core DA: It is possible that immediately after reward presentation the prevailing conditioned “incentive” stimuli (in the case of the non-extinction group, the conditioned “context” stimuli of the chamber; in the case of the extinction group, the conditioned light CS plus the conditioned context CSs) maintained increased dopaminergic stimulation in the NAc, whereas after a delay between reward and extinction, this persisting dopaminergic activity has dissipated and can no longer override or mask the decrease in DA that marks extinction of responses to a signaling CS or “discriminative stimulus”. Such an explanation would presume that the increase in DA release that accompanies reward availability, outlasts the period of reward either in a time dependent manner related to post-consummatory action of the reward or in dependency of the ability of conditioned “incentive” cues to still initiate appetitive behavior (i.e. as long as extinction to the CS is not complete). In either case, it would be important to distinguish between immediate and delayed extinction in a theoretical and empirical account of the processes involved in the withdrawal of expected reward. We know of no relevant literature that directly deals with such a distinction. However, Francois et al. (2014) found that in the NAc (subregion not specified) brain tissue oxygen levels increased during presentation of a rewarded cue, both during acquisition and the first days of extinction, indicating that the NAc remains activated for as long as a “rewarded” conditioned CS triggered appetitive behavior during early extinction trials in accordance with our current results.

Behavioral analyses of experiment 1 showed that the frequency and duration of rearing increased during the reward period and continued to be higher during the post-reward period in both groups, but persisted longer in the group subjected to extinction. In addition, an increase in frequency of grooming during the immediate post-reward period only appeared in the group submitted to extinction. Both, extinction-induced grooming and rearing behaviors have been shown to be influenced by treatment with antidepressant drugs (Huston et al., 2013; Topic, Kröger, Vildirasova, & Huston, 2012). Others studies also found grooming to be influenced by antidepressant treatment (D’Aquila et al., 2000a; Yalcin, Belzung, & Surget, 2008). Rearing behavior has associated with motivational state, attention and arousal level and emotionality (Carnevale, Vitullo, & Sadile, 1990; Sadile, 1995). Grooming has been interpreted as a displacement activity that functioning to reduce stress (Spruijt, van Hooff, & Gispen, 1992) and, thus, is a behavioral marker of stress in rodents (e.g. File, Mabbutt, & Walker, 1988; Kalueff & Tuohimaa, 2005; Kyzar et al., 2011; Nakazato, 2013). Generally, grooming behavior has been consistently associated with changes in DA tone, e.g. as a results of DA agonism (Schwartz & Huston, 1996). The mesolimbic dopamine system has been shown to be involved in grooming (Prinssen, Balestra, Bemelmans, & Cools, 1994) and whereas dopamine D1/D5 receptor agonists elicit an grooming (Watchel, Brooderson, & White, 1992), dopamine D2 receptor agonists reduce this behavior (Ferrari, Pelloni, & Giuliani, 1992). However, in potentially stressful environments (novelty, handling, injections of saline, restraints, situations paired explicitly with aversive events), it is thought to reflect an unspecific stress response and, moreover, can provide an index of fear-related behavior (Gispen, 1982; Tinbergen, 1952). Violations of outcome predictions activate the HPA axis and, thus, can evoke stress-related behaviors. Our data support such an assumption, as this stress response was only seen in the group that immediately underwent extinction.

We also found that the duration and frequency at the food cup decreased over time during the immediate post-reward period in the extinction and non-extinction groups, but persisted much longer in the extinction group, marking the course of behavioral extinction. Moreover, the duration of glances at the cue lights (sign tracking) extended into the post-reward session only in the extinction group, indicating this measure to be an index of resistance to extinction to the cue CS (and not to the context compound CS). Its time-dependent decline serves as a measure of behavioral extinction. Thus, behavioral analysis indicated that while grooming and rearing are indices of extinction-induced behavior, glances toward the cue-lights are an index of resistance to extinction.

Extinction, dopamine and depression: Various studies have indicated the involvement of the NAc in cognition and response to aversive and rewarding stimulus in animal models of depression and the NAc is thought to contribute importantly to the pathophysiology, symptomatology and etiology of depression (Nestler & Carlezon, 2006). Imaging studies indicate that depressed patients compared to healthy control subjects exhibit less activation of the NAc in reward-related performance (Pizzagalli et al., 2009). Similarly, depressed patients showed lower activity in the ventral striatum when reappraising rewards in a reversal-learning task, but not when reappraising punishments (Robinson, Cools, Carlisi, Sahakian, & Drevets, 2011). Depressed patients were also found to have difficulty in maintaining positive mood after a reward, in association with an inability to sustain activity in the accumbens over time (Heller et al., 2009), suggesting that decreased activity within the dorsal PFC may reduce reward sensitivity of the NAc (Disner, Beevers, Haigh, & Beck, 2011). Various substances which increase dopaminergic transmission have also been shown to have antidepressant properties in animal studies, as well as to increase availability of DA in the NAc (Willner, 1997). In addition to the availability of DA as a neurotransmitter, also changes in the sensitivity and number of dopamine receptors in the NAc have been shown to have a role in the genesis of depression (D’Aquila et al., 2000b). Previous studies on rats, using either operant extinction paradigms as applied in the present work or extinction of escape behavior from a water maze, have demonstrated that the withholding of expected food reward or expected escape reward leads to behavioral and physiological changes that can be interpreted as being expressions of depression/despair (for reviews see Huston et al. (2009, 2013). Operant Extinction-induced depression-related behaviors have been described in three different paradigms, one employing food-reinforced lever pressing (Huston et al., 2012), the other using a cued fixed-time food-delivery schedule as used in the present study (Komorowski et al., 2012), and one using extinction of run-way behavior (Topic et al., 2012). The extinction-induced behaviors reported include an increase in distance from the former source of reinforcement, rearing, grooming and biting behavior, all of which were attenuated by treatment with antidepressant drugs. In addition to evoking so-called extinction-induced depression-related behaviors, the withholding of reward or decreasing its magnitude have been shown to be accompanied by behavioral indices of anxiety, which is often co-morbid with major depression in humans (for review see Papini et al., 2015). The present experiments were carried out to assess the hypothesis that operant extinction is accompanied by a decrease in release of DA in the NAc; i.e., that during the withholding reward, DA would behave in a direction opposite to its response to presentation of reward. The results provide evidence for such an action of DA, which decreased selectively in the NAc core, but only when sufficient time had elapsed between availability of rewarding stimulation and its absence. Such a delay in the decrease in DA efflux as a marker of despair/depression makes sense in terms of our hypothesis insofar as it would be expected that a state of despair would only set in when

conditioned incentive stimuli have lost their ability to generate goal-driven operant behavior or when hedonic consequences of reward have totally dissipated. It remains to be seen whether antidepressants that block the reuptake of neuronal DA can reverse the decrease in extinction-induced DA efflux along with the behavioral markers of EID. We have shown that intranasally administered dopamine has antidepressant-like properties in both, the forced swimming task (Buddenberg, Topic, de Souza Silva, Huston, & Mattern, 2008) as well as in the operant extinction-induced depression paradigm (unpublished results), suggesting that the subtype of depression that is a consequence of reward withdrawal can be attenuated by dopamine substitution.

5. Conclusions

This work confirms the importance of dopamine release in the nucleus accumbens for reward-related states. It provides first evidence that during the withholding of expected reward, DA release decreases in the NAc core, but not shell region, and shows that this decrease in DA appears only after a delay between delivery of reward and extinction. This decrease in DA release may reflect response of the DA neurons to outcome prediction error (Schultz, 2010). We hypothesize that the decrease of DA in the NAc core may also be a marker for the despair/depression that is known to accompany the loss of expected rewards/reinforcers (Huston et al., 2013). The directionality of cause and effect in such a relationship remains obscure. Therefore, it would be important to know whether experimentally induced decreases in NAc core DA release result in “emotional” behaviors that are known to accompany reward withdrawal (extinction) or whether the change in DA release is a consequence of the emotional responses to extinction.

Acknowledgments

C.B. was supported by Scholarship from the DAAD and CAPES Foundation Process n BEX: 8816/11-5. M.A. de Souza Silva was supported by Heisenberg Fellowship SO 1032/5-1 and EU-FP7 (M C-ITN-“In-SENS”-ESR7 607616). J.P.H. and B.T. received support from the Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant: DFG HU 306/27-3.

References

- Ambroggi, F., Ghazizadeh, A., Nicola, S. M., & Fields, H. L. (2011). Roles of nucleus accumbens core and shell in incentive-cue responding and behavioral inhibition. *The Journal of Neuroscience*, 31(18), 6820–6830.
- Anselme, P. (2009). The effect of exposure to drugs on the processing of natural rewards. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33, 314–335.
- Aragona, B. J., Cleaveland, N. A., Stuber, G. D., Day, J. J., Carelli, R. M., & Wightman, R. M. (2008). Preferential enhancement of dopamine transmission within the nucleus accumbens shell by cocaine is attributable to a direct increase in phasic dopamine release events. *Journal of Neuroscience*, 28(35), 8821–8831.
- Ball, K. T., Combs, T. A., & Beyer, D. N. (2011). Opposing roles for dopamine D1- and D2-like receptors in discrete cue-induced reinstatement of food seeking. *Behavioural Brain Research*, 222(2), 390–393.
- Bassareo, V., Cucca, F., Musio, P., Lecca, D., Frau, R., & Di Chiara, G. (2015). Nucleus accumbens shell and core dopamine responsiveness to sucrose in rats: Role of response contingency and discriminative/conditioned cues. *European Journal of Neuroscience*, 41, 802–809.
- Bassareo, V., De Luca, M. A., & Di Chiara, G. (2002). Differential expression of motivational stimulus properties by dopamine in nucleus accumbens shell versus core and prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, 22(11), 4709–4719.
- Bassareo, V., & Di Chiara, G. (1997). Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *Journal of Neuroscience*, 17, 851–861.
- Bassareo, V., & Di Chiara, G. (1999a). Differential responsiveness of DA transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. *Neuroscience*, 89, 637–641.
- Bassareo, V., & Di Chiara, G. (1999b). Modulation of feeling-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *European Journal of Neuroscience*, 11, 4389–4397.
- Bayer, H. M., & Glimcher, P. W. (2005). Midbrain dopamine neurons encode a quantitative reward prediction error signal. *Neuron*, 47, 129–141.
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews*, 28, 309–369.
- Blackburn, J. R., Pfaus, J. G., & Phillips, A. G. (1992). Dopamine functions in appetitive and defensive behaviours. *Progress in Neurobiology*, 39, 247–279.
- Boix, F., Sandor, P., Nogueira, P. J., Huston, J. P., & Schwarting, R. K. (1995). Relationship between dopamine release in nucleus accumbens and place preference induced by substance P injected into the nucleus basalis magnocellularis region. *Neuroscience*, 64, 1045–1055.
- Brauer, K., Haeuber, M., & Arendt, T. (2000). The core-shell dichotomy of nucleus accumbens in the rhesus monkeys as revealed by double-immunofluorescence and morphology of cholinergic interneurons. *Brain Research*, 858, 151–162.
- Breiter, H. C., Aharon, I., Kahneman, D., Dale, A., & Shizgal, P. (2001). Functional imaging of neural responses to expectancy and experience of monetary gains and losses. *Neuron*, 30, 619–639.
- Brog, J. S., Salyapongse, A., Deutsch, A. Y., & Zahm, D. S. (1993). The patterns of afferent innervation of the core and shell in the “accumbens” part of the rat ventral striatum: Immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *The Journal of Comparative Neurology*, 338, 255–278.
- Buddenberg, T., Topic, B., de Souza Silva, M. A., Huston, J. P., & Mattern, C. (2008). Behavioral actions of intranasal application of dopamine: Effects on forced swimming, elevated plus maze and open field parameters. *Neuropsychobiology*, 57(1–2), 70–79.
- Carnevale, U. A., Gironi, Vitullo, E., & Sadile, A. G. (1990). Prost-trial NMDA receptor allosteric blockade differentially influences habituation of behavioural responses to novelty in the rat. *Behavioural Brain Research*, 39, 187–195.
- Carvalho, J. P., & Hopko, D. R. (2011). Behavioral theory of depression: Reinforcement as a mediating variable between avoidance and depression. *Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry*, 42, 154–162.
- D’Aquila, P. S., Collu, M., Gessa, G. L., & Serra, G. (2000b). The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *European Journal of Pharmacology*, 405, 365–373.
- D’Aquila, P. S., Peana, A. T., Carboni, V., & Serra, G. (2000a). Exploratory behaviour and grooming after repeated restraint and chronic mild stress: Effect of desipramine. *European Journal of Pharmacology*, 399, 43–47.
- Day, J. J., Roitman, M. F., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2007). Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, 10(8), 1020–1028.
- Delgado, M. R., Nystrom, L. E., Fissell, C., Noll, D. C., & Fiez, J. A. (2000). Tracking the hemodynamic responses to reward and punishment in the striatum. *Journal of Neurophysiology*, 84, 3072–3077.
- Di Chiara, G. (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: Differential role in behavior and addiction. *Behavioural Brain Research*, 137(1–2), 75–114.
- Di Chiara, G., & Bassareo, V. (2007). Reward system and addiction: What dopamine does and doesn’t do. *Current Opinion in Pharmacology*, 7, 69–76.
- Di Chiara, G., Bassareo, V., Fenu, S., De Luca, M. A., Spina, L., Cadoni, C., et al. (2004). Dopamine and drug addiction: The nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, 47(1), 227–241.
- Disner, S. G., Beevers, C. G., Haigh, E. A., & Beck, A. T. (2011). Neural mechanisms of the cognitive model of depression. *Nature Reviews Neuroscience*, 12, 467–477.
- Dremencov, E., Newman, M. E., Kinor, N., Blatman-Jan, G., Schindler, C. J., Overstreet, D. H., et al. (2005). Hyperfunctionality of serotonin-2C receptor-mediated inhibition of accumbal dopamine release in an animal model of depression is reversed by antidepressant treatment. *Neuropharmacology*, 48, 34–42.
- Ferrari, F., Pelloni, F., & Giuliani, D. (1992). Suppressive effect of the dopamine D2 receptor agonist B-HT 920 on rat grooming. *European Journal of Pharmacology*, 216, 345–350.
- Ferster, C. B. (1973). A functional analysis of depression. *American Psychologist*, 28, 857–870.
- File, S. E., Mabbutt, P. S., & Walker, J. H. (1988). Comparison of adaptive responses in familiar and novel environments: Modulatory factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 525, 69–79.
- Fiorillo, C. D., Tobler, P. N., & Schultz, W. (2003). Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons. *Science*, 299, 1898–1902.
- Francois, J., Huxter, J., Conway, M. W., Lowry, J. P., Tricklebank, M. D., & Gilmour, G. (2014). Differential contributions of infralimbic prefrontal cortex and nucleus accumbens during reward-based learning and extinction. *The Journal of Neuroscience*, 34(2), 596–607.
- Gispén, W. H. (1982). Neuropeptides and behavior: ACTH. *Scandinavian Journal of Psychology*, 1, 16–25.
- Hajnal, A., & Norgren, R. (2002). Repeated access to sucrose augments dopamine turnover in the nucleus accumbens. *NeuroReport*, 13, 2213–2216.
- Hajnal, A., Smith, G. P., & Norgren, R. (2004). Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(1), 31–37.
- Hammen, C. (2005). Stress and depression. *Annual Reviews in Clinical Psychology*, 1, 293–319.
- Heller, A. S., Johnstone, T., Shackman, A. J., Light, S. N., Peterson, M. J., Kolden, G. G., et al. (2009). Reduced capacity to sustain positive emotion in major depression reflects diminished maintenance of fronto-striatal brain activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 22445–22450.

- Hernandez, L., & Hoebel, B. G. (1988). Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by microdialysis. *Life Sciences*, 42(18), 1705–1712.
- Huston, J. P., De Souza Silva, M. A., Komorowski, M., Schulz, D., & Topic, B. (2013). Animal models of extinction-induced depression: Loss of reward and its consequences. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37, 2059–2070.
- Huston, J. P., Schulz, D., & Topic, B. (2009). Toward an animal model of extinction-induced despair: Focus on aging and physiological indices. *Journal of Neural Transmission*, 116(8), 1029–1036.
- Huston, J. P., Van Den Brink, J., Komorowski, M., Huq, Y., & Topic, B. (2012). Antidepressants reduce extinction-induced withdrawal behaviours: A model for depressive-like behaviour. *Neuroscience*, 210, 249–257.
- Ikemoto, S. (2007). Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Research Reviews*, 56, 27–78.
- Ikemoto, S., & Panksepp, J. (1999). The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: A unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Research Reviews*, 31, 6–41.
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2005). Contrasting grooming phenotypes in three mouse strains markedly different in anxiety and activity (129S1, BALB/c and NMRI). *Behavioural Brain Research*, 160, 1–10.
- Knutson, B., Fong, G. W., Adams, C. M., Varner, J. L., & Hommer, D. (2001). Dissociation of reward anticipation and outcome with event-related fMRI. *NeuroReport*, 12, 3683–3687.
- Komorowski, M., Huston, J. P., Klingshegel, I., Paulat, J., Sackers, J., & Topic, B. (2012). Distance from source of reward as a marker for extinction-induced “despair”: Modulation by the antidepressants clomipramine and citalopram. *Neuroscience*, 223, 152–162.
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24, 97–129.
- Kram, M. L., Kramer, G. L., Ronan, P. J., Steciuk, M., & Petty, F. (2002). Dopamine receptors and learned helplessness in the rat: An autoradiographic study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 26, 639–645.
- Kyzar, E., Gaikwad, S., Roth, A., FGreen, J., Pham, M., Stewart, A., et al. (2011). Towards high-throughput phenotyping of complex patterned behaviours in rodents: Focus on mouse self-grooming and its sequencing. *Behavioural Brain Research*, 225, 426–431.
- Leventhal, A. M. (2008). Sadness, depression, and avoidance behavior. *Behavior Modification*, 32, 759–779.
- Lewinsohn, P. M. (1974). A behavioral approach to depression. In R. J. Friedmann & M. M. Katz (Eds.), *Psychology of depression. Contemporary theory and research*. Oxford, England: John Wiley, Sons.
- Manos, R. C., Kanter, J. W., & Busch, A. M. (2010). A critical review of assessment strategies to measure the behavioral activation model of depression. *Clinical Psychology Review*, 30, 547–561.
- Manzo, L., Donaire, R., Sabariego, M., Papini, M. R., & Torres, C. (2015). Anti-anxiety self-medication in rats: Oral consumption of chlordiazepoxide and ethanol after reward devaluation. *Behavioural Brain Research*, 278, 90–97.
- Martell, C. R., Addis, M. E., & Jacobson, N. S. (2001). *Depression in context: Strategies for guided action*. New York: Norton.
- Morris, G., Arkadir, D., Nevet, A., Vaadia, E., & Bergman, H. (2004). Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons. *Neuron*, 43, 133–143.
- Nakahara, H., Itoh, H., Kawagoe, R., Takikawa, Y., & Hikosaka, O. (2004). Dopamine neurons can represent context-dependent prediction error. *Neuron*, 41, 269–280.
- Nakazato, T. (2013). Dual modes of extracellular serotonin changes in the rat ventral striatum modulate adaptation to a social stress environment, studies with wireless voltammetry. *Experimental Brain Research*, 230, 583–596.
- Nestler, E. J., & Carlezon, W. A. (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological Psychiatry*, 59, 1151–1159.
- O’Doherty, J., Kringelbach, M. L., Rolls, E. T., Hornak, J., & Andrews, C. (2001). Abstract reward and punishment representations in the human orbitofrontal cortex. *Nature Neuroscience*, 4, 95–102.
- Papini, M. R., Fuchs, P. N., & Torres, C. (2015). Behavioral neuroscience of psychological pain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 48, 53–69.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pizzagalli, D. A., Holmes, A. J., Dillon, D. G., Goetz, E. L., Birk, J. L., Bogdan, R., et al. (2009). Reduced caudate and nucleus accumbens response to rewards in unmedicated individuals with major depressive disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 166, 702–710.
- Prinssen, E. P., Balestra, W., Bemelmans, F. F., & Cools, A. R. (1994). Evidence for a role of the shell of the nucleus accumbens in oral behaviour of freely moving rats. *Journal of Neuroscience*, 14, 1555–1562.
- Rescorla, R. A., & Wagner, A. R. (1972). A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. In A. H. Black & W. F. Prokasy (Eds.), *Classical conditioning II: Current research and theory* (pp. 64–99). New York: Appleton Century Crofts.
- Robinson, O. J., Cools, R., Carlisi, C. O., Sahakian, B. J., & Drevets, W. C. (2011). Ventral striatum response during reward and punishment reversal learning in unmedicated major depressive disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 169(2), 152–159.
- Roitman, M. F., Stuber, G. D., Phillips, P. E. M., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2004). Dopamine operates as a subsecond modulator of food seeking. *Journal of Neuroscience*, 24(6), 1265–1271.
- Roitman, M. F., Wheeler, R. A., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2008). Real-time chemical responses in the nucleus accumbens differentiate rewarding and aversive stimuli. *Nature Neuroscience*, 11(12), 1376–1377.
- Sadile, A. G. (1995). Long-term habituation of theta-related activity components of albino rats in the Låt maze. In P. R. Sandberg, K. P. Ossenkopp, & M. Kavaliers (Eds.), *Motor activity and movement disorders: Measurement and analysis* (pp. 1–54). New York: Humana.
- Salamone, J. D. (1994). Involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behavioural Brain Research*, 61, 117–133.
- Satoh, T., Nakai, S., Sato, T., & Kimura, M. (2003). Correlated coding of motivation and outcome of decision by dopamine neurons. *Journal of Neuroscience*, 23, 9913–9923.
- Schultz, W. (2010). Dopamine signals for reward value and risk: Basic and recent data. *Behavioral and Brain Functions*, 6(24), 1–9.
- Schulz, D., Buddenberg, T., & Huston, J. P. (2007a). Extinction-induced “despair” in the water maze, exploratory behavior and fear: Effects of chronic antidepressant treatment. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87, 624–634.
- Schulz, D., Huston, J. P., Buddenberg, T., & Topic, B. (2007b). “Despair” induced by extinction trials in the water maze: Relationship with measures of anxiety in aged and adult rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87, 309–323.
- Schulz, D., Topic, B., De Souza Silva, M. A., & Huston, J. P. (2004). Extinction induced immobility in the water maze and its neurochemical concomitants in aged and adult rats: A possible model for depression? *Neurobiology of Learning and Memory*, 82, 128–141.
- Schwartz, R. K. W., & Huston, J. P. (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Progress in Neurobiology*, 50, 275–331.
- Spicer, J., Galvan, A., Hare, T. A., Henning, V., Glover, G., & Casey, B. J. (2007). Sensitivity of the nucleus accumbens to violations in expectation of reward. *NeuroImage*, 34(1), 455–461.
- Spruijt, B. M., van Hooff, J. A. R. A. M., & Gispen, W. H. (1992). Ethology and neurobiology of grooming behaviour. *Physiological Reviews*, 72, 825–852.
- Sutton, R. S., & Barto, A. G. (1981). Toward a modern theory of adaptive networks: Expectation and prediction. *Psychological Review*, 8, 135–170.
- Timbergen, N. (1952). Derived activities. *Quarterly Review of Biology*, 27, 1–32.
- Tobler, P. N., Fiorillo, C. D., & Schultz, W. (2005). Adaptive coding of reward value by dopamine neurons. *Science*, 307, 1642–1645.
- Topic, B., Huston, J. P., Namestkova, K., Zhu, S. W., Mohammed, A. H., & Schulz, D. (2008a). Extinction-induced “despair” in aged and adult rats: Links to neurotrophins in frontal cortex and hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90, 519–526.
- Topic, B., Kröger, I., Vildirasova, P. G., & Huston, J. P. (2012). Indices of extinction-induced “depression” after operant learning using a runway vs. a cued free-reward delivery schedule. *Neurobiology of Learning and Memory*, 98, 329–340.
- Topic, B., Oitzl, M. S., Meijer, O. C., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2008b). Differential susceptibility to extinction-induced despair and age-dependent alterations in hypothalamic–pituitary–adrenal axis and neurochemical parameters. *Neuropsychobiology*, 58, 138–153.
- Voorn, P., Jorritsma-Byham, B., van Dijk, C., & Buijs, R. M. (1986). The dopaminergic innervation of the ventral striatum in the rat: A light- and electron-microscopical study with antibodies against dopamine. *Journal of Comparative Neurology*, 251, 84–99.
- Watchel, S. R., Broderson, R. J., & White, F. J. (1992). Parametric and pharmacological analyses of the enhanced grooming response elicited by the D1 dopamine receptor agonist SKF 38393 in the rat. *Psychopharmacology*, 109, 41–48.
- Wheeler, R. A., Aragona, B. J., Fuhrmann, K. A., Jones, J. L., Day, J. J., Cacciapaglia, F., et al. (2011). Cocaine cues drive opposing context-dependent shifts in reward processing and emotional state. *Biological Psychiatry*, 69(11), 1067–1074.
- Willner, P. (1997). The mesolimbic dopamine system as a substrate for (rapid?) antidepressant action. *International Clinical Psychopharmacology*, 12(3), S7–S14.
- Wise, R. A. (1998). Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Dependence*, 51, 13–22.
- Yalcin, I., Belzung, C., & Surget, A. (2008). Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: A four-antidepressant survey. *Behavioural Brain Research*, 193, 140–143.
- Zahm, D. S., & Brog, J. S. (1992). One the significance of subterritories in the accumbens part of the ventral striatum. *Neuroscience*, 50, 751–767.
- Zangen, A., Nakash, R., Overstreet, D. H., & Yadir, G. (2001). Association between depressive behavior and absence of serotonin–dopamine interaction in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology*, 155, 434–439.

The 30th Joint Conference of Biomedical Science

Acknowledgement of Contribution

Certification

This is to certify that the following paper is presented at the 30th joint Conference of Biomedical Science, held on March 21-22, 2015.

Title: Decrease of Extracellular Dopamine in Nucleus Accumbens Core but not Shell during Extinction of Appetitive Behavior: a Possible Concomitant of Depression/Despair Induced by Absence of Expected Reward

Authors: An-Li Wang¹, Carla Biesdorf^{1,2}, Joseph P. Huston¹, Maria Angelica de Souza Silva¹

Institution: ¹Center for Behavioral Neuroscience, Institute of Experimental Psychology, University of Duesseldorf, Duesseldorf, Germany, ²Department of Pharmacology and Therapeutic, Health Science Center, State University of Maringá, Maringá, Brazil



President: *Po-Shuan Hsieh*

CHINESE PHYSIOLOGICAL SOCIETY

Date: March 22, 2015

投稿學會： □□□□□□

收件編號：

分類編號：

第三十屆生物醫學聯合學術年會 投稿摘要表格（正本）

Decrease of Extracellular Dopamine in Nucleus Accumbens Core but not Shell during Extinction of Appetitive Behavior: a Possible Concomitant of Depression/Despair Induced by Absence of Expected Reward

An-Li Wang¹, Carla Biesdorf^{1,2}, Joseph P. Huston¹, Maria Angelica de Souza Silva¹

¹Center for Behavioral Neuroscience, Institute of Experimental Psychology, University of Duesseldorf, Duesseldorf, Germany,

²Department of Pharmacology and Therapeutic, Health Science Center, State University of Maringá, Maringá, Brazil

The neurochemical mechanisms that underlie reward have been thoroughly studied and have focused on the release of dopamine in the nucleus accumbens. However, little is known about the neurotransmitter events that underlie the absence of reward and the discontinuation of reward (extinction). The loss or absence of former rewarding events is a known cause of despair and other symptoms of major depression. We have developed an animal model of so-called extinction-induced depression using the withdrawal of food reward in operant procedures (1). Microdialysis studies in rat have shown that appetitive stimuli release dopamine (DA) in the nucleus accumbens (NAc) shell and core. Here we examined the release of dopamine in the nucleus accumbens during delivery of reward (food) and during extinction of food reward in the freely moving animal by use of in vivo microdialysis and HPLC. Fifty-two male Wistar rats were trained to receive the food reward after appearance of cue-lights in Skinner-box during microdialysis. Different protocols were used to assess the effects of extinction on DA and metabolites. Results: 1. During the period of cued reward delivery, DA levels clearly increased in the NAc core, and less with much variability in the NAc shell. 2. This DA increment in the NAc core and shell continued during the extinction period when extinction immediately followed the reward period. 3. DA in the NAc core, but not shell, decreased during the extinction period when there was an interval between the reward and the extinction periods. Conclusions: These results a) confirm the importance of dopamine release in the nucleus accumbens for reward-related states, b) provide first evidence that during the withholding of expected reward DA decreases in the NAc core, but not shell region, c) indicate that this decrease in DA appears only after a delay between delivery of reward and extinction. We hypothesize that the decrease in NAc core DA may be a marker for the despair/depression that is known to accompany the loss of expected rewards/reinforcers (DA agonists can serve as antidepressants in some cases of major depression).

(1) Huston et al. Animal models of extinction-induced depression: Loss of reward and its consequences. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2013, 37:2059-70.

第一作者中文姓名：王安莉

傳真：

電話：

手機： 0911685693

E-mail: neurotopguy@gmail.com

地址：