WAGNER FERNANDES DE OLIVEIRA

**Análise da participação da porção rostralateral da
substância cinzenta periaquedutal (PAGrl) no
comportamento de busca por droga.**

Tese apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2015

Wagner Fernandes De Oliveira

**Análise da participação da porção rostrolateral
da substância cinzenta periaquedutal (PAGrl)
no comportamento de busca por droga.**

Tese apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências
Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Newton
Sabino Canteras

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Oliveira, Wagner Fernandes de.

Análise da participação da porção rostrolateral da substância cinzenta periaquedutal (PAGrl) no comportamento de busca por droga / Wagner Fernandes de Oliveira. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Newton Sabino Canteras.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Bases neurais dos comportamentos motivados.

Versão do título para o inglês: Analysis of the participation of rostrolateral portion of the periaqueductal gray (rIPAG) in drug seeking.

1. Busca por droga 2. Substância cinzenta periaquedutal 3. Área hipotalâmica lateral 4. Córtex pré-frontal medial 5. Recompensa 6. Comportamento I. Canteras, Prof. Dr. Newton Sabino II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB090/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Wagner Fernandes de Oliveira.

Título da Tese: Análise da participação da porção rostrolateral da substância cinzenta periaquedutal (PAGrl) no comportamento de busca por droga.

Orientador(a): Prof. Dr. Newton Sabino Canteras.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **085** nas fls. **130** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Newton Sabino Canteras**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Bases Neurais dos comportamentos motivados*" do qual participam o(s) aluno(s), **Isadora Clivatti Furigo**, **Miguel José Rangel Junior**, **Miguel Xavier de Lima**, **Wagner Fernandes de Oliveira** e as pesquisadoras **Claudia de Brito Faturi** e **Simone Cristina Motta**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **24.08.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 28 de agosto de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

*Dedico à minha mãe Helena e à minha irmã Elaine
por sempre acreditarem em mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser minha fortaleza.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Newton Sabino Canteras por ter me dado a oportunidade de ingressar na carreira científica, e por prontamente abrir as portas do Laboratório de Neuroanatomia Funcional para que eu tivesse a oportunidade de aprender em um dos melhores laboratórios. Agradeço também todo o apoio que recebi durante esta caminhada e todo ensinamento que recebi durante estes anos em que estivemos trabalhando juntos.

Agradeço à minha Co-orientadora, Dra. Sandra Regina Mota Ortiz por ter me guiado durante esta caminhada, e por sempre estar ao meu lado me apoiando e me ensinando. Sou grato também pela amizade construída durante todos estes anos e que foi fundamental para o meu crescimento como pessoa e como profissional.

Agradeço aos meus pais Helena e Almerindo, por toda a educação que me deram e por serem meu porto seguro. Sem a ajuda de vocês eu nada seria.

Agradeço à minha irmã Elaine, por ser a minha maior incentivadora e por sempre me apoiar em todas as decisões.

Agradeço aos meus sobrinhos Alan e Juan, por todos os momentos de alegria. Vocês são a razão de todo o meu esforço.

Agradeço ao meu namorado Cadu, por ser meu confidente, meu melhor amigo e por me fazer uma pessoa melhor. Sem o seu apoio eu jamais conseguiria.

Agradeço às minhas amigas Cibele e Isadora, pela amizade construída durante esses anos e por todos os bons momentos que passamos juntos.

Aos meus companheiros do Laboratório de Neuroanatomia Funcional Dra. Simone, Miguel Rangel, Miguel Xavier e Amanda, por toda ajuda e companheirismo durante estes anos.

Aos meus companheiros do Laboratório de Bases Neurais do Comportamento Brunella, Geielle, Mayara, Midiã, Raquel e Rodrigo, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e pela amizade construída.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas por todo suporte e por serem sempre prestativos.

E agradeço a mim por acreditar que venceria.

*“Resplandecente é a sabedoria, e sua beleza é inalterável:
os que a amam descobrem-na facilmente, os que a
“Resplandecente é a sabedoria, e sua beleza é inalterável:
os que a amam descobrem-na facilmente, os que a
procuram encontram-na.”
Sabedoria 6, 12-13.*

RESUMO

OLIVEIRA, W. F. **Análise da participação da porção rostralateral da substância cinzenta periaquedutal (PAGrl) no comportamento de busca por droga.** 2015. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O córtex pré-frontal medial (mPFC) é uma estrutura sabidamente envolvida no planejamento de respostas comportamentais associadas a elementos que oferecem recompensa como o comportamento de busca por droga. Esta região cortical se projeta para a coluna rostralateral da substância cinzenta periaquedutal (PAGrl) e, de acordo com estudos recentes esta região mesencefálica, por meio de projeções para o sistema orexinérgico da área hipotalâmica lateral (LHA), participa do controle de comportamentos que oferecem recompensa como a busca alimentar. A LHA além de estar envolvida no comportamento de busca alimentar, também tem participação fundamental no controle do comportamento de busca por droga através de projeções para estruturas do sistema dopaminérgico mesolímbico. Sendo assim, o objetivo do trabalho é investigar a participação PAGrl e a sua relação com o mPFC e com o sistema orexinérgico da LHA na expressão do comportamento de busca por droga. Para isso submetemos ratos Wistar ao condicionamento de preferência por lugar (CPP) associado a sulfato de morfina e notamos que o mPFC (parte dorsal do córtex do cíngulo anterior – ACAd; região pré-límbica – PL; região infralímbica – ILA), a PAGrl e a LHA se encontram ativados em animais que expressaram o comportamento de busca por droga durante este paradigma experimental. Em seguida realizamos lesões neuroquímicas bilaterais por NMDA restritas ao mPFC (ACAd, PL e ILA) e notamos a ausência da busca pela droga em animais submetidos ao CPP para sulfato de morfina, além da diminuição da ativação neuronal da PAGrl e do sistema orexinérgico da LHA. Após realizarmos lesões neuroquímicas bilaterais por NMDA centradas na PAGrl e observamos também a ausência do comportamento de busca por droga, bem como a diminuição de duplas marcações para Fos e orexina na LHA. Portanto, os resultados nos permitem inferir que a PAGrl exerceria um papel crítico para a promoção do comportamento de busca por droga durante o CPP para sulfato de morfina, integrando aferências provenientes do mPFC (ACAd, PL e ILA) para então modular os neurônios orexinérgicos da LHA que se projetam para o sistema dopaminérgico mesolímbico.

Palavras-chave: Busca por droga. Substância cinzenta periaquedutal. Área hipotalâmica lateral. Córtex pré-frontal.

ABSTRACT

OLIVEIRA, W. F. **Analisis of the participation of rostralateral portion of the periaqueductal gray (PAGrl) in drug seeking behavior.** 2015. 84 p. Ph. D. Thesis (Morfofuncional Sciences). – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2015.

The medial prefrontal cortex (mPFC) is involved with planning of the behavioral responses associated to drug seeking. This cortical region projects itself to the rostralateral periaqueductal gray (PAGrl) and, according to recent studies this area, through projections for the orexin neurons in the lateral hypothalamic area (LHA), participates in the control of behavior that offer rewards such as food seeking. The LHA is known to influence both food and drug reward by means of projections for the mesolimbic dopaminergic system. Thereby, this study aims to investigate the relationship between the mPFC, PAGrl and orexin neurons in the LHA in drug seeking behavior. To conduct this research we performed a morphine conditioned place preference (CPP) procedure in intact, bilateral PAGrl-lesioned and bilateral mPFC-lesioned Wistar rats and investigated the pattern of Fos expression in the mPFC, rIPAG and the LHA orexinergic cell region in these three groups. The intact animals treated with morphine displayed a clear preference for the compartment where they had received the morphine injections. Additionally, they presented a significant increase in Fos activation in the mPFC (dorsal part of the anterior cingulate area – ACAd; prelimbic area – PL; infralimbic area – ILA), rIPAG and LHA orexinergic neurons. Conversely, PAGrl-lesioned and mPFC-lesioned (ACAd, PL and ILA) animals treated with morphine did not display preference for any compartment and reduced the activation of orexin neurons in the lateral part of the LHA. Moreover, PFC-lesioned animals also presented a clear reduction of the Fos activation in the rIPAG. Overall, the present results suggest a putative pathway involving the mPFC, PAGrl and LHA orexinergic cell group underlying the CCP to morphine, where the rIPAG would exert a critical role integrating inputs from the mPFC to control the LHA orexinergic cell group.

Keywords: Drug seeking. Periaqueductal gray. Hypothalamic area. Prefrontal cortex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aparato experimental.	23
Figura 2 - Fotomicrografia de cortes frontais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ilustrando o padrão de ativação das áreas ACAd, PL e ILA do mPFC de um animal do grupo controle (A) e de um animal do grupo experimental (B). Abreviações: ACAd: parte dorsal do córtex do cíngulo anterior; PL: região pré límbica; ILA: região infra límbica; mPFC: córtex pré-frontal medial.	37
Figura 3 - Fotomicrografia de cortes frontais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ao nível do núcleo oculomotor, ilustrando o padrão de ativação da PAG de um animal do grupo controle (A e B) e de um animal do grupo experimental (B e C); B e D estão em maior aumento. Abreviações: AQ: aqueduto mesencefálico; III: núcleo oculomotor; PAGdl: coluna dorsolateral da PAG; PAGdm: coluna dorsomedial da PAG; PAGl: coluna lateral da PAG; SOM: área supraoculomotora.	40
Figura 4 - Fotomicrografia de cortes frontais da LHA de ratos intactos tratados com salina (A e B) ou com sulfato de morfina (C e D). Animais com lesão ACAd (E e F), lesão PL/ILA (G e H), lesão PAGrl (I e J) e lesão PAGvl (K e L) tratados com sulfato de morfina ilustrando os neurônios duplamente marcados para Fos e orexina. As setas indicam os neurônios duplamente marcados.	43
Figura 5 - Fotomicrografia de corte frontal do PFC corado pelo método de Nissl ilustrando a extensão da lesão bilateral por NMDA, restrita ao córtex do cíngulo anterior. Abreviaturas: PL: área pré-límbica; ACAd: parte dorsal do córtex do cíngulo anterior; Mos área somatomotora secundária.	44
Figura 6 - Fotomicrografias de cortes frontais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ao nível do núcleo oculomotor, ilustrando o padrão de ativação da PAG de um animal com lesão bilateral por NMDA no ACAd (A e B) e de um animal intacto (B e C); B e D estão em maior aumento. Abreviações: AQ: aqueduto mesencefálico; III: núcleo oculomotor; PAGdl: coluna dorsolateral da PAG; PAGdm: coluna dorsomedial da PAG; PAGl: coluna lateral da PAG; SOM: área supraoculomotora.	48
Figura 7 - Fotomicrografia de corte frontal do PFC corado pelo método de Nissl ilustrando a extensão da lesão bilateral por NMDA restrita as regiões pré límbica e infra límbica. Abreviaturas ACAd: parte dorsal do córtex do cíngulo anterior; PL: área pré límbica; ILA: área infra límbica.	51
Figura 8 - Fotomicrografias de cortes frontais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ao nível do núcleo oculomotor, ilustrando o padrão de ativação da PAG de um animal com lesão bilateral por NMDA nas regiões PL e ILA do mPFC (A e B) e de um animal intacto (B e C); B e D estão em maior aumento. Abreviações: AQ: aqueduto mesencefálico; III: núcleo oculomotor; PAGdl: coluna dorsolateral da PAG; PAGdm: coluna dorsomedial da PAG; PAGl: coluna lateral da PAG; SOM: área supraoculomotora.	55
Figura 9 - Fotomicrografia de corte frontal da PAG, no nível do núcleo oculo motor (III) reagido imunoistoquimicamente para NEU-N ilustrando a lesão neuroquímica bilateral por NMDA na PAGrl.	60
Figura 10 - Fotomicrografia de corte frontal da PAG, no nível do núcleo dorsal da rafe reagido imunoistoquimicamente para NEU-N ilustrando a lesão neuroquímica bilateral por NMDA na PAGvl. Abreviaturas: AQ: aqueduto mesocefálico; Paldal: coluna dorsolateral da PAG; Pagam: coluna dorso medial da PAG; Pago: coluna lateral da PAG; Durar: núcleo dorsal da rafe.	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Tempo (s) de permanência em cada compartimento do aparato durante o pré-teste e o teste (observação de 10 min) para os animais do grupo controle. Os dados foram expressos por média± SEM. * $p<0.05$	34
Gráfico 2 - Tempo (s) de permanência em cada compartimento do aparato durante o pré-teste e o teste (observação de 10 min) para os animais do grupo experimental (n=9). Os dados foram expressos por média± SEM. * $p<0.002$	35
Gráfico 3 - Os dados foram expressos por média ± SEM do número total de neurônios imunorreativos a proteína Fos nas regiões ACA _d , PL e ILA do mPFC. * $p<0.05$	36
Gráfico 4 - Os dados foram expressos por média ± SEM do número total de neurônios orexinérgicos no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p<0.05$	42
Gráfico 5 - Os dados foram expressos por média ± SEM número total de neurônios duplamente marcados Fos+orexina no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p<0,0072$	42
Gráfico 6 - Tempo (s) de permanência em cada compartimento do aparato durante o pré-teste e o teste (observação de 10 min) para os animais portadores de lesão bilateral neuroquímica por NMDA na ACA _d . * $p<0.05$	45
Gráfico 7 - Os dados foram expressos por média ± SEM do número total de neurônios orexinérgicos no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p<0.05$	50
Gráfico 8 - Os dados foram expressos por média ± SEM número total de neurônios duplamente marcados Fos+orexina no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p=0,001$	50
Gráfico 9 - Tempo (s) de permanência em cada compartimento do aparato durante o pré-teste e o teste (observação de 10 min) para os animais portadores de lesão bilateral neuroquímica por NMDA nas regiões PL e IL. * $p<0.05$	52
Gráfico 10 - Os dados foram expressos por média ± SEM do número total de neurônios orexinérgicos no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p<0.05$	58
Gráfico 11 - Os dados foram expressos por média ± SEM número total de neurônios duplamente marcados Fos+orexina no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p=0,001$	58
Gráfico 12 - Tempo (s) de permanência em cada compartimento do aparato durante o pré-teste e o teste (observação de 10 min) para os animais portadores de lesão bilateral neuroquímica por NMDA na PAG _{rl} . * $p<0.05$	60
Gráfico 13 - Os dados foram expressos por média ± SEM do número total de neurônios orexinérgicos no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p<0.05$	62
Gráfico 14 - Os dados foram expressos por média ± SEM número total de neurônios duplamente marcados Fos+orexina no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p=0,001$	62
Gráfico 15 - Tempo (s) de permanência em cada compartimento do aparato durante o pré-teste e o teste (observação de 10 min) para os animais portadores de lesão bilateral neuroquímica por NMDA na PAG _{vl} . * $p=0.0079$	64
Gráfico 16 - Os dados foram expressos por média ± SEM do número total de neurônios orexinérgicos no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p<0.05$	66

Gráfico 17 - Os dados foram expressos por média $\pm$ SEM número total de neurônios duplamente marcados Fos+orexina no grupamento perifornical e no grupamento lateral * $p < 0.05$66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tempo de permanência nos compartimentos do aparato do grupo controle.	34
Tabela 2 - Tempo de permanência nos compartimentos do aparato do grupo experimental.	35
Tabela 3 - Densidade de células Fos+ no mPFC por mm ²	36
Tabela 4 - Densidade de células Fos+ na PAG por mm ² dos grupos controle e experimental.	39
Tabela 5 - Número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA dos grupos controle e experimental.	41
Tabela 6 - Tempo de permanência nos compartimentos do aparato do grupo lesão ACAd.	45
Tabela 7 - Densidade de células Fos+ na PAG por mm ² dos grupos Intacto e Lesão ACAd.	47
Tabela 8 - Número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA dos grupos Intacto e Lesão ACAd.	49
Tabela 9 - Tempo de permanência nos compartimentos do aparato do grupo lesão PL/ ILA.	52
Tabela 10 - Densidade de células Fos+ na PAG de animais dos grupos intacto e lesão PL/ILA por mm ²	54
Tabela 11 - Número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA dos grupos Intacto e Lesão PL/ ILA.	57
Tabela 12 - Tempo de permanência nos compartimentos do aparato do grupo lesão PAGrl.	59
Tabela 13 - Número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA dos grupos Intacto e Lesão PAGrl.	61
Tabela 14 - Tempo de permanência nos compartimentos do aparato do grupo lesão PAGvl.	63
Tabela 15 - Número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA dos grupos Intacto e Lesão PAGvl.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

III – núcleo oculomotor

ACAAd – córtex do cíngulo anterior, parte dorsal

AQ – aqueduto mesencefálico

CPP – condicionamento de preferência por lugar

DR – núcleo dorsal da rafe

Fx – fórnice

ILA – área infralímbica

LC – locus cerúleos

LDT – núcleo tegmental latero dorsal

LHA – área hipotalâmica lateral

MOs – área motora suplementar

mPFC – córtex pré-frontal medial

NMDA: N-Methyl-D-Aspartic Acid

PAG – substância cinzenta periaquedutal

PAGdl – porção dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal

PAGdm – porção dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal

PAGrl – porção rostrolateral da substância cinzenta periaquedutal

Pagvl – porção ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal

PL – área pré límbica

PPT – núcleo pedúnculo pontinho

SOM – área supra oculomotora

TM – núcleo túbero mamilar

VTA – área tegmental ventral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS RELATADOS NO PRESENTE TRABALHO:	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 ESTUDO 1	22
3.1.1 <i>Aparato experimental</i>	22
3.1.2 <i>Teste comportamental</i>	23
3.1.3 <i>Perfusão e Histologia</i>	24
3.1.4 <i>Detecção imunoistoquímica da proteína Fos</i>	25
3.1.5 <i>Quantificação das células imunorreativas a proteína Fos no mPFC</i>	25
3.1.6 <i>Quantificação das células imunorreativas a proteína Fos na PAG</i>	26
3.1.7 <i>Detecção imunoistoquímica de dupla marcação para a proteína Fos e orexina</i>	26
3.2 ESTUDO 2	28
3.3 ESTUDO 3	29
3.4 ESTUDO 4	30
3.4.1 <i>Detecção Imunoistoquímica para NeuN:</i>	31
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4 RESULTADOS.....	33
4.1 ESTUDO 1	33
4.2 ESTUDO 2	44
4.3 ESTUDO 3	51
4.4 ESTUDO 4	59
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o DSM-IV (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais), a dependência é um padrão desadaptado de uso de drogas psicoativas, que causa perturbações clinicamente importantes associadas à dificuldade de controlar o comportamento de autoadministração da substância, sintomas de retirada e existência de tolerância (quando se torna necessário uma dose maior para produzir o mesmo efeito) aos efeitos da droga.

As drogas que provocam dependência são aquelas que estimulam mecanismos cerebrais responsáveis pelo reforço positivo, ou seja, quando um comportamento é seguido regularmente por um estímulo apetitivo, neste caso, o comportamento de ingestão de uma droga de abuso é reforçado pela própria droga. Todas as drogas responsáveis por este processo estimulam a liberação de dopamina no núcleo acumbens, a partir da ativação do sistema dopaminérgico mesolímbico, que compreende a área tegmental ventral (VTA) e o núcleo acumbens (PHILLIPS et al., 2008; WHEELER; CARELLI, 2009). Sendo assim, a busca pela droga depende da ativação deste sistema dopaminérgico que também se apresenta mobilizado na busca por outras fontes de recompensa conhecidas como naturais, a comida pode ser um exemplo (DEADWYLER, 2010).

Diversos trabalhos mostram que estruturas do córtex pré-frontal medial (mPFC) como o córtex do cíngulo anterior (ACAd) e as regiões pré límbica (PL) e infra límbica (ILA), participam de forma importante no comportamento de busca por droga atuando principalmente no planejamento de respostas comportamentais associadas a elementos que oferecem recompensa (SHOENBAUM e ROESCH, 2005).

Além de participar das respostas comportamentais associadas à recompensa o mPFC regula uma gama de processos cognitivos e emocionais importantes para o controle comportamental como a atenção, a resposta inibitória, o planejamento e a tomada de decisão (BELLEINE; DICKINSON, 1998; DALLEY et al., 2004; EUSTON et al., 2012; MILLER; COHEN, 2001;), e o descontrole destas funções resulta na dependência que está intimamente relacionada ao equilíbrio entre a inibição e a execução do comportamento (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2011).

De acordo com a literatura durante a autoadministração da droga a VTA liberaria dopamina no núcleo acumbens e no mPFC ao mesmo tempo, estimulando a busca e o consumo da droga (KALIVAS; VOLKOW, 2005). Nesta situação, a liberação de dopamina da VTA no núcleo acumbens seria importante para a associação da droga com o contexto no qual ela foi utilizada, enquanto que a liberação de dopamina no mPFC estimularia a liberação de glutamato a partir desta estrutura no núcleo acumbens resultando nas respostas motoras de busca pela droga (Mc FARLAND et al., 2003, 2004), uma vez que o uso repetido recruta o mPFC e suas eferências para o núcleo accumbens (KALIVAS; VOLKOW, 2005). Sendo assim, o mPFC exerceria um controle executivo sobre a seleção e iniciação dos comportamentos relacionados a busca pela droga via projeções para o núcleo acumbens, que por sua vez envolve estruturas motoras como o estriado dorsal e o pálido ventral (VERTES, 2004; LASSETER et al., 2010; KALIVAS, 2009).

Estudos mostram que pacientes usuários de cocaína, metanfetamina e heroína apresentam um aumento de atividade neuronal do mPFC, particularmente no ACAd, quando colocados diante de pistas previamente associadas à droga (BOLLA et al., 2003; CHILDRESS et al., 1999; GALLINAT, 2011; KILTS et al., 2004; MARHE et al., 2013; VOLKOW; FOWLER, 2000; WEXLER et al., 2001), e a inativação desta região pré-frontal seria capaz de impedir a recaída durante a autoadministração (Mc FARLAND et al., 2004; Mc LAUGHLIN e SEE, 2003; Mc FARLAND e KALIVAS, 2001).

Diversos trabalhos também apontam para o envolvimento da região PL do mPFC no comportamento de busca por droga. De acordo com estes estudos a inativação farmacológica ou lesões deste sítio encefálico foram capazes de diminuir o condicionamento ou a busca pela cocaína (CAPRILES et al., 2003; FUCHS et al., 2005; GIPSON et al., 2013; Mc FARLAND et al., 2004; Mc FARLAND; KALIVAS, 2001).

Estes dados demonstram que o mPFC é uma estrutura chave para o controle do comportamento de busca por droga, sendo responsável por diversos aspectos envolvidos no abuso de drogas e na consequente dependência, controlando assim a expressão da motivação e execução do plano comportamental relacionado a busca pela droga.

De acordo com Mota-Ortiz e colaboradores (2009), estas regiões do mPFC aferentam a coluna rostralateral da substância cinzenta periaquedutal (PAGrl), e

esta por sua vez seria peça fundamental nos mecanismos neurais do controle motivacional para a busca alimentar (MOTA-ORTIZ et al., 2012).

Mota-Ortiz e colaboradores, 2012 mostraram em seu trabalho após a injeção do traçador anterógrado da leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) na PAGrl, um contingente particularmente grande de fibras anterogradamente marcadas no setor da área hipotalâmica lateral (LHA) que contém neurônios orexinérgicos, indicando a possível existência de um grande número de aposições sinápticas entre essas fibras marcadas anterogradamente com PHA-L e os corpos celulares imunorreativos à orexina. Associado a estes dados, o mesmo trabalho mostrou que a motivação para perseguir as presas durante a caça predatória depende da integridade da PAGrl, e que animais que desempenham este comportamento apresentam um aumento dos neurônios duplamente marcados para Fos e orexina na LHA. Desta forma, animais portadores de lesões citotóxicas nesta região perdem o interesse em buscar a presa durante a caça predatória, sem apresentar um déficit alimentar patente quando colocados com oferta alimentar *ad libitum*, além de apresentarem uma diminuição dos neurônios duplamente marcados para Fos e orexina na região lateral da LHA, quando comparados aos animais intactos. Desta forma, estes achados permitiram inferir a possível existência de uma via entre a PAGrl e os neurônios orexinérgicos da LHA, que pode estar criticamente envolvida nos processos motivacionais de busca alimentar durante a caça predatória e que poderia intermediar as ações da PAGrl no controle da busca por recompensa durante este comportamento.

Recentemente, uma série de trabalhos do grupo coordenado pelo pesquisador Gary Aston-Jones têm mostrado que o sistema orexinérgico localizado no hipotálamo lateral, mais precisamente no grupamento de neurônios localizados na região lateral, desempenha um papel chave nos mecanismos de recompensa envolvidos na busca por droga e por comida durante a preferência condicionada por lugar (CPP). A orexina é um neuropeptídeo sintetizado na LHA e que está fortemente associado ao comportamento alimentar e manutenção do alerta (CHEMELLI et al., 1999; LIN et al., 1999; SAKURAI et al., 1998; THORPE e KOTZ, 2005; WINSKY-SOMMERER et al., 2005), além de processos relacionados a mecanismos de recompensa e comportamentos aditivos (ASTON-JONES et al., 2009, 2010; BORGLAND et al., 2006; BOUTREL et al., 2005; GEORGESCU et al., 2003; HARRIS et al., 2005; KELLEY et al., 2005; LAWRENCE et al., 2006; NARITA

et al., 2006; HARRIS et al., 2007^{a;b}). Especificamente, neurônios orexinérgicos localizados na porção lateral da LHA estariam envolvidos nos mecanismos de recompensa associados ao comportamento de busca por droga e comida, através de uma importante ligação com o sistema mesolímbico, via projeções para a VTA e núcleo acumbens (ASTON-JONES et al., 2010; HARRIS; ASTON-JONES, 2006) enquanto os neurônios orexinérgicos localizados na região perifornical estariam relacionados à manutenção dos níveis de alerta por intermédio de projeções para o lócus cerúleos (LC) e para os núcleos tuberomamilar (TM), pedúnculo pontinho (PPT) e tegmental latero dorsal (LDT) (HARRIS; ASTON-JONES, 2006; SAKURAI, 2007).

Dessa forma, baseados nos dados descritos acima, poderíamos inferir que a PAGrl atuaria como um relé para a modulação do mPFC na atividade dos neurônios orexinérgicos, participando também dos aspectos motivacionais relacionados à busca por outras fontes de recompensa, como uma droga de abuso, exercendo assim um importante papel na integração de aferências provenientes do mPFC para controlar os neurônios orexinérgicos da LHA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a participação PAGrl e sua relação com o mPFC e com o sistema orexinérgico da LHA na expressão do comportamento de busca por droga.

2.2 Objetivos específicos relatados no presente trabalho:

- a) Avaliar a expressão do comportamento de busca por droga a partir do paradigma de CPP para sulfato de morfina e investigar o padrão de ativação do mPFC (nas áreas ACAd, PL e ILA), da PAG e dos neurônios orexinérgicos da LHA (nas regiões perifornical e lateral) a partir da expressão da proteína Fos nos grupos experimental e controle;
- b) Avaliar o papel funcional da ACAd do mPFC e o padrão de ativação da PAG e dos neurônios orexinérgicos da LHA (nas regiões perifornical e lateral) no comportamento de busca por droga, a partir de lesões neuroquímicas por NMDA restritas a ACAd do mPFC;
- c) Investigar o papel funcional das regiões PL e ILA do mPFC e o padrão de ativação da PAG e dos neurônios orexinérgicos da LHA (nas regiões perifornical e lateral) do mPFC no comportamento de busca por droga, a partir de lesões neuroquímicas por NMDA casadas das regiões PL e ILA do mPFC;
- d) Avaliar o papel funcional das colunas rostrolateral e ventrolateral da PAG, e o padrão de ativação dos neurônios orexinérgicos na LHA (nas regiões perifornical e lateral) no comportamento de busca por droga, a partir de lesões neuroquímicas por NMDA restritas à PAGrl e de lesões restritas a coluna ventrolateral da PAG (PAGvl).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), machos, adultos, com aproximadamente 90 dias de idade (n= 40). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (30 x 40 x 18 cm), em salas com sistema de ventilação (23 ± 2 °C) e ciclo de luz de 12h (06 h 00-18 h 00). Água e comida foram oferecidas *ad libitum* durante todos os procedimentos experimentais. Os animais foram obtidos de cruzamentos sucessivos no biotério do setor de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Todos os protocolos foram aprovados pela “Comissão de Ética em Experimentação Animal” do ICB-USP.

3.1 Estudo 1

Avaliação da expressão do comportamento de busca por droga a partir do paradigma de CPP para sulfato de morfina e investigação do padrão de ativação do mPFC (nas áreas ACA_d, PL e ILA), da PAG e dos neurônios orexinérgicos da LHA (nas regiões perifornical e lateral) a partir da expressão da proteína Fos nos grupos experimental e controle.

Neste estudo fizemos a validação do paradigma de busca por droga (CPP) que foi adaptado a partir do paradigma experimental proposto por HARRIS et al., 2005. Em seguida avaliamos a expressão do comportamento em animais tratados apenas com salina (0,9%) (grupo controle n= 9) e em animais experimentais tratados tanto com salina, quanto com sulfato de morfina (Cristália, SP; 10,0 mg/ kg/ dia, i.p.) (grupo experimental n= 9) e após, verificamos o padrão de expressão da proteína Fos do mPFC (ACA_d, PL e ILA), da PAG e do sistema orexinérgico da LHA (regiões perifornical e lateral).

3.1.1 Aparato experimental

O aparato experimental (construído em acrílico) é constituído de uma caixa central (30 x 18 x 23 cm) com uma porta no lado direito e outra no lado esquerdo, sendo que as duas portas são ligadas por um corredor de acesso (30 x 15 x 15) a outras duas caixas (30 x 27 x 27), com pistas contextuais diferentes (Figura 1). Uma caixa possui paredes e assoalho pretos além de uma tela de metal vazada presa ao

assoalho e a outra caixa possui as paredes brancas, além de plásticos presos ao assoalho.

Figura 1 - Aparato experimental.
FONTE: Oliveira (2015)

3.1.2 Teste comportamental

No primeiro dia do procedimento experimental o animal foi colocado na caixa central do aparato e as portas foram abertas para que o mesmo pudesse transitar livremente entre os ambientes por um período de dez minutos. Este procedimento foi filmado para posterior análise de permanência nos compartimentos e recebeu o nome de pré-teste. No segundo dia começamos a ministrar as injeções de salina e de sulfato de morfina. Para isso, retiramos o animal da caixa moradia para que o mesmo recebesse uma injeção (i.p.) de sulfato de morfina, em seguida o mesmo foi colocado de maneira aleatória em uma das duas caixas caracterizadas com pistas sensoriais diferentes durante trinta minutos. Após este período o animal foi retirado do compartimento e devolvido a caixa moradia. Três horas após a primeira injeção o animal foi novamente retirado da caixa moradia para receber uma injeção (i.p.) de salina e foi colocado na caixa com pistas sensoriais contrária a que foi pareada com a droga e também permaneceu neste compartimento por trinta minutos. Para melhor identificação dos resultados o compartimento em que o animal recebeu as injeções de sulfato de morfina foi denominado compartimento 1, enquanto que o compartimento em que os animais receberam as injeções de salina foi denominado compartimento 2. As injeções continuaram sendo ministradas por mais três dias totalizando quatro dias de injeção, porém elas foram dadas de maneira alternada em cada um dos dias, ou seja, se em um dia o animal recebeu primeiro a injeção de sulfato de morfina no outro ele recebeu primeiro a injeção de salina e assim por diante. No sexto dia do procedimento experimental realizamos o teste. Neste dia o

animal foi colocado na caixa central do aparato e as portas foram abertas para que o mesmo pudesse transitar livremente entre os ambientes por um período de dez minutos. Este procedimento foi filmado para posterior análise de permanência nos compartimentos. É importante mencionar que todos os procedimentos foram realizados durante o período claro, porém as luzes da sala de testes comportamentais eram mantidas desligadas. Metade dos animais do grupo experimental foi condicionada na caixa com paredes escuras e a outra metade na caixa com paredes brancas, obtendo um desenho experimental equilibrado.

Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo delineamento experimental, porém foram administradas apenas injeções de salina em ambas as caixas.

As análises de tempo foram obtidas utilizando o programa “The Observer” (versão 5.1 – Noldus), e os parâmetros analisados foram:

- a) tempo de permanência na caixa lateral 1;
- b) tempo de permanência na caixa lateral 2;
- c) tempo de permanência na caixa central.

Após um período de 90 minutos, tanto os animais do grupo experimental quanto os animais do grupo controle foram profundamente anestesiados e perfundidos por via trans-aórtica.

3.1.3 Perfusão e Histologia

Após o teste comportamental, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cloridrato de Ketamina 5% (Konig) e cloridrato de xilazina 2% (Konig) (Merck) a 0,2% na proporção 0,4 ml/100 g de peso corporal. Em seguida, através de uma bomba peristáltica (Cole Parmer) os animais foram perfundidos por via trans-aórtica inicialmente com 150 ml de uma solução salina 0,9% seguida de 800 ml de uma solução fixadora de paraformaldeído a 4% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4). Os encéfalos permaneceram na caixa craniana por 3 horas antes de serem removidos e transferidos para uma solução contendo sacarose 20% em tampão fosfato de potássio 0,02 M, onde permaneceram por aproximadamente 12 horas.

Cortes frontais seriados, com 40 μ m de espessura foram obtidos utilizando-se um micrótomo de congelção. Os cortes foram colhidos sequencialmente em quatro compartimentos, de forma que a distância entre os cortes adjacentes em um mesmo

compartimento foi sempre de 160 μm . Um dos compartimentos foi utilizado para detecção imunoistoquímica da proteína Fos, um segundo foi corado pelo método de Nissl, com tionina 0,25% como corante para servir como referência para citoarquitetura e um terceiro compartimento foi utilizado para reação imunoistoquímica de dupla marcação Fos + Orexina.

3.1.4 Detecção imunoistoquímica da proteína Fos

Na reação imunoistoquímica para detecção da proteína Fos, os cortes foram incubados inicialmente em uma solução de tampão fosfato de potássio 0,02 M contendo triton X-100 a 0,3%, soro normal de cabra a 2% (Vector Laboratories) e anticorpo primário anti-Fos obtido em coelho (Calbiochem) numa diluição de 1:20.000, sob agitação constante, a 4 °C, durante 72 horas. Para localização do complexo antígeno-anticorpo os cortes foram incubados por 90 minutos no anticorpo secundário biotilado feito em cabra (Biotinylated anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories) na diluição 1:200. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado usando-se a técnica de imunoperoxidase com o complexo biotina-avidina (ABC Elite Kit, Vector Laboratories) para ligar a peroxidase ao complexo antígeno-anticorpo, seguindo o protocolo de Itoh e colaboradores (1979), ou seja, após lavagens sucessivas, os cortes foram incubados em uma solução contendo 50mg de tetrahidrocloreto de 3-3'diaminobenzidina (DAB), 0,6mg de glicose oxidase, 40mg de cloreto de amônio e 2 ml de solução aquosa de sulfato de níquel a 10% em 100 ml de tampão fosfato de sódio 0,1M, por 5 minutos. Em seguida, foi adicionada a β -D-glicose (Sigma), e a reação enzimática interrompida após um período de tempo variável, em geral em torno de 15 minutos.

Por fim, os cortes foram montados em lâminas recobertas com gelatina, desidratados e recobertos com DPX (Aldrich Chemical Co.). Cortes adjacentes foram corados pelo método de Nissl, com tionina 0,25% como corante.

O material usado para a contagem das células imunorreativas à proteína Fos foi analisado em microscopia de campo claro (microscópio óptico Nikon 80i), utilizando como referência citoarquitetônica os cortes corados pelo método de Nissl.

3.1.5 Quantificação das células imunorreativas a proteína Fos no mPFC

A quantificação das células imunorreativas a proteína Fos, nos animais controles e experimentais foi realizada a partir de desenhos semi-esquemáticos com

o auxílio de câmera lúcida acoplada a um microscópio Nikon 50i (Nikon Corporation, Chiyoda-Ku, Tokyo-To, Japan), do setor do mPFC que aferenta a PAGrl (MOTA-ORTIZ et al., 2009) compreendendo as regiões ACAd, PL e ILA.

3.1.6 Quantificação das células imunorreativas a proteína Fos na PAG

Inicialmente, foi feita a seleção de imagens correspondentes à região da substância cinzenta periaquedutal, utilizando-se a objetiva 10 X de aumento, de um microscópio Nikon 80i (Nikon Corporation, Chiyoda-Ku, Tokyo-To, Japan) equipado com uma câmera digital Nikon DXM1200F (Nikon Corporation). Para a quantificação das células Fos positivas, fizemos o delineamento das bordas da região de interesse, definidas com o auxílio da série corada pelo método de Nissl. As células Fos positivas foram contadas dentro das bordas da região de interesse, sendo consideradas apenas aquelas com núcleos ovais corados em preto. A densidade de células Fos positivas foi determinada pelo número de células Fos positivas, dividido pela área da região de interesse. A contagem do número total de células e a determinação da área foram feitas com o auxílio do programa computacional Image-Pro Plus (Image-Pro Plus, versão 4.5.1, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Para o parcelamento da PAG, utilizamos o parcelamento originalmente proposto por Bandler e colaboradores (1991) e revisado por Carrive e colaboradores (1997). O parcelamento divide a substância cinzenta periaquedutal em colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral. Semelhante a metodologia usada em trabalhos anteriores do grupo (COMOLI et al., 2003; SUKIKARA et al., 2010), a densidade de células Fos positivas na substância cinzenta periaquedutal foi examinada em 6 diferentes níveis, no sentido rostrocaudal: nível do núcleo de Darkschewitsch (nível 1), níveis rostral e caudal do núcleo oculomotor (níveis 2 e 3, respectivamente), e os níveis rostral, intermédio e caudal do núcleo dorsal da rafe (níveis 4, 5 e 6, respectivamente).

3.1.7 Detecção imunoistoquímica de dupla marcação para a proteína Fos e orexina

Para a reação imunoistoquímica de dupla marcação de fos e orexina, os cortes foram incubados inicialmente em uma solução de tampão fosfato de potássio 0,02M contendo triton X-100 a 0,3%, soro normal de cabra a 2% (Vector Laboratories) e anticorpo primário anti-Fos obtido em coelho (Ab-5/Oncogene

Research Products) numa diluição de 1:20.000, sob agitação constante, a 4 °C, durante 72 horas. Para localização do complexo antígeno-anticorpo os cortes foram incubados por 1 hora e 30 minutos no anticorpo secundário biotinilado feito em cabra (Biotinylated anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories) na diluição 1:200. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado usando-se a técnica de imunoperoxidase com o complexo biotina-avidina (ABC Elite Kit, Vector Laboratories) para ligar a peroxidase ao complexo antígeno-anticorpo, seguindo o protocolo de Itoh e colaboradores (1979), descrito anteriormente no Estudo 1.

Após a reação histoquímica para a detecção da proteína *Fos*, os cortes foram lavados em uma solução de tampão fosfato de potássio 0,02 M por 40 minutos. Em seguida, foram incubados em uma solução de tampão fosfato de potássio 0,02 M contendo triton X-100 a 0,3%, soro normal de cabra a 2% (Vector Laboratories) e anticorpo primário anti-orexina (Phoenix Laboratories) numa diluição 1:10.000 e feita uma incubação de 48 horas.

Após esse período, o procedimento realizado foi o mesmo descrito anteriormente para a detecção imunoistoquímica da proteína *Fos*, com uma exceção, não foi adicionado sulfato de níquel na reação de imunoperoxidase.

Por fim, os cortes foram montados em lâminas recobertas com gelatina, desidratados e recobertos com DPX (Aldrich Chemical Co.).

A quantificação das células duplamente marcadas com *Fos* + *Orexina*, nos animais controles e experimentais foi realizada a partir de desenhos semi-esquemáticos com o auxílio de câmera lúcida acoplada a um microscópio Nikon 50i (Nikon Corporation, Chiyoda-Ku, Tokyo-To, Japan), dos setores da área hipotalâmica lateral que contêm os neurônios orexinérgicos correspondentes aos níveis 26 – 31 do atlas Brain Maps (SWANSON, 2004). As células orexinérgicas foram divididas em dois grupos nomeados como grupamento perifornicial e grupamento lateral, para traçarmos as bordas entre estes dois grupos seguimos o parcelamento descrito por Swanson (2004). De acordo com este parcelamento, o grupamento perifornicial inclui a porção anterior do núcleo dorsomedial e as regiões justadorsomedial e supraforfornicial da área hipotalâmica lateral, já o grupamento lateral compreende as regiões dorsal e ventral da área hipotalâmica lateral.

3.2 Estudo 2

Avaliação do papel funcional da ACAAd do mPFC e do padrão de ativação da PAG e dos neurônios orexinérgicos da LHA (nas regiões perifornical e lateral) no comportamento de busca por droga, a partir de lesões neuroquímicas por NMDA restritas a ACAAd do mPFC;

Neste estudo avaliamos os efeitos comportamentais da lesão neuroquímica por NMDA, seletiva da ACAAd do mPFC (n=8) e em seguida investigamos o padrão de ativação da proteína Fos da PAG e dos neurônios orexinérgicos da LHA tanto na região perifornical quanto na região lateral dos animais submetidos à lesão neuroquímica por NMDA. Como animais controles, utilizamos animais intactos (sem lesão) (n=8).

3.2.1 Lesão citotóxica por NMDA

As cirurgias de lesão citotóxica por NMDA foram realizadas sete dias antes do início do procedimento experimental descrito no Experimento 1. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de cloridrato de pentobarbital sódico (Cristália, Itapira, SP, Brasil; 40 mg/ kg i.p.) de peso corporal e em seguida posicionados em aparelho estereotático, onde receberam um depósito iontoforético bilateral de uma solução de NMDA (N-Methyl-D-Aspartic Acid, Sigma) a 0,15 M centrado na ACAAd do mPFC, ventral a área motora suplementar e dorsal a região PL. Os depósitos foram feitos através de micropipetas de vidro com diâmetro interno de ponta da ordem de 20 μ m, mediante aplicação de -5 μ A de corrente pulsátil (7seg “on”, 7 seg “off”) durante 15 minutos, provida de uma fonte de corrente constante (Midgard Eletronics, Modelo CS3). As coordenadas estipuladas para a realização das cirurgias estereotáticas de lesão na ACAAd foram: ântero-posterior (-2,8 mm em relação ao bregma); médio lateral (0,7 mm em relação ao seio sagital superior para os lados esquerdo e direito); dorso-ventral (1,3 mm em relação superfície cerebral).

Os procedimentos para a realização dos testes comportamentais e processamento histológico foram os mesmos descritos anteriormente. Os cortes foram colhidos sequencialmente em 4 compartimentos, de forma que a distância entre os cortes adjacentes em um mesmo compartimento foi de 160 μ m. Um dos compartimentos foi corado pelo método de Nissl, com tionina 0,25% como corante

para a identificação da lesão, e outros dois compartimentos foram utilizados para detecção imunistoquímica da proteína Fos e de dupla marcação Fos + Orexina, detalhadas no Estudo 1.

As respostas comportamentais observadas foram filmadas e analisadas utilizando os programas específicos para análise comportamental “The Observer” (versão 5.1 – Noldus). Os parâmetros comportamentais analisados foram os mesmos descritos para o Estudo 1.

3.3 Estudo 3

Investigação do papel funcional das regiões PL e ILA do mPFC e o padrão de ativação da PAG e dos neurônios orexinérgicos da LHA (nas regiões perifornical e lateral) do mPFC no comportamento de busca por droga, a partir de lesões neuroquímicas por NMDA casadas das regiões PL e ILA do mPFC.

No Estudo 3 avaliamos os efeitos comportamentais da lesão neuroquímica por NMDA, seletiva as regiões PL e ILA no mPFC (n= 6) e em seguida investigamos o padrão de ativação da proteína Fos da PAG e dos neurônios orexinérgicos da LHA tanto na região perifornical quanto na região lateral dos animais submetidos à lesão neuroquímica por NMDA. Como animais controles, utilizamos animais intactos (sem lesão) (n= 6).

A cirurgia estereotáxica para realização da lesão citotóxica bilateral por NMDA restrita as regiões PL e IL, ventrais a ACAd , foi realizada como descrito anteriormente no Estudo 2.

As coordenadas estipuladas para a realização das cirurgias estereotáxicas de lesão nas regiões PL e ILA do mPFC foram: ântero-posterior (-2,8 mm em relação ao bregma); médio lateral (0,6mm em relação ao seio sagital superior para os lados esquerdo e direito); dorso-ventral (3,8 mm em relação superfície cerebral).

Os procedimentos para a realização dos testes comportamentais e processamento histológico foram os mesmos descritos anteriormente. Os cortes foram colhidos sequencialmente em 4 compartimentos, de forma que a distância entre os cortes adjacentes em um mesmo compartimento foi de 160µm. Um dos compartimentos foi corado pelo método de Nissl, com tionina 0,25% como corante para a identificação da lesão, e outros dois compartimentos foram utilizados para

detecção imunoistoquímica da proteína Fos e de dupla marcação Fos + Orexina, detalhadas no Estudo 1.

As respostas comportamentais observadas foram filmadas e analisadas utilizando os programas específicos para análise comportamental “The Observer” (versão 5.1 – Noldus). Os parâmetros comportamentais analisados foram os mesmos descritos para o Estudo 1.

3.4 Estudo 4

Avaliação do papel funcional das colunas rostralateral e ventrolateral da PAG, e do padrão de ativação dos neurônios orexinérgicos na LHA (nas regiões perifornical e lateral) no comportamento de busca por droga, a partir de lesões neuroquímicas por NMDA restritas à PAGrl e de lesões restritas à PAGvl.

Neste estudo, avaliamos os efeitos comportamentais da lesão neuroquímica por NMDA, seletiva, da PAGrl (n = 9) e da PAGvl (n = 6) e em seguida investigamos o padrão de ativação da proteína Fos nos neurônios orexinérgicos da LHA tanto da região perifornical quanto da região lateral dos animais submetidos à lesão neuroquímica por NMDA. Como animais controles, utilizamos animais intactos (sem lesão) (n= 9 para comparação com os animais portadores de lesão restrita a PAGrl e n = 6 para comparação com os animais portadores de lesão restrita a PAGvl).

Tanto a cirurgia estereotáxica para realização da lesão citotóxica bilateral por NMDA restrita a rIPAG, situada imediatamente ventral a PAG dorsolateral, no sentido rostrocaudal do pólo caudal do núcleo de Darkschewitsch (ND) até a metade rostral do núcleo oculomotor (III), ou na porção ventrolateral caudal situada no sentido rostrocaudal no pólo caudal do núcleo dorsal da rafe, quanto lesão citotóxica bilateral por NMDA restrita à PAGvl ao nível do núcleo troclear foram realizadas como descrito anteriormente no Estudo 2.

As coordenadas estipuladas para a realização das cirurgias estereotáxicas de lesão da PAGrl foram: ântero-posterior (6,0 mm em relação ao bregma); médio lateral (0,65 mm em relação ao seio sagital superior para os lados esquerdo e direito); dorso-ventral (4,5 mm em relação superfície cerebral).

As coordenadas estipuladas para a realização das cirurgias estereotáxicas de lesão da PAGvl foram: ântero-posterior (7,5 mm em relação ao bregma); médio

lateral (0,6mm em relação ao seio sagital superior para os lados esquerdo e direito); dorso-ventral (5,35 mm em relação superfície cerebral).

Os procedimentos para a realização dos testes comportamentais e processamento histológico foram os mesmos descritos anteriormente. Os cortes foram colhidos sequencialmente em 4 compartimentos, de forma que a distância entre os cortes adjacentes em um mesmo compartimento foi de 160 μ m. Um dos compartimentos foi corado pelo método de Nissl, com tionina 0,25% como corante, um segundo foi utilizado para detecção imunoistoquímica do NeuN e outro compartimento foi utilizado para detecção imunoistoquímica de dupla marcação Fos + Orexina, detalhadas no Estudo 1.

As respostas comportamentais observadas foram filmadas e analisadas utilizando o programa específico para análise comportamental “The Observer” (versão 5.1 – Noldus). Os parâmetros comportamentais analisados foram os mesmos descritos para o Estudo 1.

3.4.1 Detecção Imunoistoquímica para NeuN:

No processamento imunoistoquímico para o *NeuN*, os cortes serão incubados inicialmente em uma solução de tampão fosfato de potássio 0,02 M contendo triton X-100 a 0,3%, soro normal de cavalo 2% e anticorpo *NeuN* feito em camundongo (A60, MAB377, Chemicon, Millipore, USA) numa diluição de 1:10.000, sob agitação constante, a 4 °C, durante 24 horas. Para localização do complexo antígeno-anticorpo os cortes serão incubados por 1 hora e 30 minutos no anticorpo secundário biotinilado feito em camundongo (Biotinylated anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories®) na diluição 1:200. Após esse período, o procedimento realizado foi o mesmo descrito anteriormente para a detecção imunoistoquímica da proteína *Fos*. Após a reação imunoistoquímica, os cortes serão montados em lâminas recobertas com gelatina, desidratados e recobertos com DPX (Aldrich Chemical Co®).

3.5 Análise Estatística

Em todos os experimentos utilizamos o teste *t student* para as análises dos parâmetros comportamentais, densidade de células imunorreativas à proteína Fos,

número total de neurônios orexinérgicos e número total de duplas marcações Fos+orexina. Para as variáveis que não passaram no teste de normalidade utilizamos a análise de variância (ANOVA) não paramétrica (U de Mann-Whitney). Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro-padrão, considerando-se significativo sempre que $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo 1

Avaliação da expressão do comportamento de busca por droga a partir do paradigma de CPP para sulfato de morfina e investigação do padrão de ativação do mPFC (nas áreas ACAd, PL e ILA), da PAG e dos neurônios orexinérgicos da LHA (nas regiões perifornical e lateral) a partir da expressão da proteína Fos nos grupos experimental e controle.

Nesta etapa do trabalho realizamos a validação do paradigma. Dessa forma, foi possível analisar a expressão do comportamento de busca por droga e avaliar o padrão de ativação da proteína Fos tanto dos animais do grupo experimental (animais que receberam injeções (i.p.) de salina e sulfato de morfina) quanto dos animais do grupo controle (animais que receberam exclusivamente injeções de salina).

Para avaliar a expressão do comportamento de busca por droga dos dois grupos de animais realizamos a análise do pré-teste que foi feito antes do condicionamento, e do teste que ocorreu após o período de condicionamento. Para as análises do pré-teste e do teste utilizamos os 10 minutos de filmagem, e foi realizada uma comparação entre o tempo de permanência em cada um dos compartimentos do aparato experimental durante o pré-teste, com o tempo de permanência nos mesmos locais durante o teste, para que fosse possível mostrar a associação feita pelo rato entre a droga e o lugar em que ele a recebeu, indicando que ele realizou a consequente preferência pelo compartimento do aparato experimental que foi pareado com a droga durante os dias de condicionamento.

Como é possível observar no Gráfico 1, os animais do grupo controle não apresentaram preferência por nenhum dos compartimentos do aparato, já que não houve diferença no tempo de permanência em cada um destes locais quando comparamos o pré-teste com o teste (tabela 1).

Já os animais do grupo experimental, como ilustrado no Gráfico 2, realizaram a preferência pelo compartimento pareado com a droga, uma vez que o tempo de permanência neste local durante o teste foi maior quando comparado ao tempo de permanência durante o pré-teste, assim como o tempo de permanência no compartimento central. Em contrapartida, quando analisamos o tempo de permanência no compartimento pareado com salina foi possível observar que não

houve diferença no tempo de permanência neste local durante o pré-teste e o teste (tabela 2).

Tabela 1 - Tempo de permanência nos compartimentos do aparato do grupo controle.

Grupo Controle (n=9)

	Pré-teste	Teste	<i>P</i>
Compartimento 1	136,8 ± 10,64	142,1 ± 16,01	0,785
Central	148,8 ± 7,284	158,4 ± 8,334	0,3954
Compartimento 2	123 ± 18,36	111,8 ± 9,178	0,9648

Valores expressos em média ± erro padrão do tempo de permanência nos compartimentos do aparato durante o pré-teste e o teste. * $p < 0.05$.

Gráfico 1 - Tempo (s) de permanência em cada compartimento do aparato durante o pré-teste e o teste (observação de 10 min) para os animais do grupo controle. Os dados foram expressos por média ± SEM. * $p < 0.05$.

Tabela 2 - Tempo de permanência nos compartimentos do aparato do grupo experimental.

Grupo Experimental (n=9)

	Pré-teste	Teste	<i>P</i>
Compartimento 1	158,9 ± 10,67	313,4 ± 15,21	< 0,0001*
Central	147,6 ± 10,26	88,78 ± 9,11	0,002*
Compartimento 2	104,2 ± 14	85,67 ± 8,699	0,2768

Valores expressos em média ± erro padrão do tempo de permanência nos compartimentos do aparato durante o pré-teste e o teste. * $p < 0,002$.

Gráfico 2 - Tempo (s) de permanência em cada compartimento do aparato durante o pré-teste e o teste (observação de 10 min) para os animais do grupo experimental (n=9). Os dados foram expressos por média ± SEM. * $p < 0,002$.

Analisando o padrão de ativação da proteína Fos nas regiões ACAd, PL e ILA do mPFC (Figura 2), pudemos observar que não houve diferença quando comparamos os animais do grupo controle com os animais do grupo experimental. (Tabela 3 e Gráfico 3).

Tabela 3 - Densidade de células Fos+ no mPFC por mm².

<i>Mpfc</i>			<i>P</i>
	Controle (n=9)	Experimental (n=9)	
ACAd	169,8 ± 16,75	179,3 ± 14,3	0,6755
PL	132,6 ± 14,09	150,3 ± 12,68	0,3095
ILA	129,7 ± 10,21	152,8 ± 8,324	0,1104

Valores expressos em média ± erro padrão do número total de células imunorreativas a proteína Fos nas áreas ACAd, PL e ILA do mPFC. **p*<0.05.

Gráfico 3 - Os dados foram expressos por média ± SEM do número total de neurônios imunorreativos a proteína Fos nas regiões ACAd, PL e ILA do mPFC. **p*<0.05.

Figura 2 - Fotomicrografia de cortes frontais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ilustrando o padrão de ativação das áreas ACAd, PL e ILA do mPFC de um animal do grupo controle (A) e de um animal do grupo experimental (B). Abreviações: ACAd: parte dorsal do córtex do cíngulo anterior; PL: região pré límbica; ILA: região infra límbica; mPFC: córtex pré-frontal medial.

Já a análise do padrão de ativação da proteína Fos na PAG mostrou que comparados com os ratos do grupo controle, os animais que realizaram a preferência pelo compartimento previamente pareado com sulfato de morfina apresentaram um significativo aumento na densidade de células imunorreativas à proteína Fos na PAGrl, mais precisamente na porção mais lateral desta estrutura se estendendo desde o nível do núcleo de Darkschewitsch (ND) até a porção caudal do nível do núcleo oculomotor(III) (Figura 3) .

Corroborando com os dados descritos acima é possível observar na Tabela 4, que ilustra a densidade de células Fos+ na PAG, que o padrão de ativação dos neurônios da PAGrl dos animais do grupo experimental é relativamente maior quando comparado com o padrão de ativação dos neurônios dos animais do grupo controle, e se estende, no sentido rostrocaudal, desde o nível 1 até o nível 6 da PAG. Além disso, observamos uma maior densidade de células Fos+ nas colunas dorsomedial (níveis 1, 2, 3, 4) e dorsolateral (níveis 2 e 3), dos animais tratados com sulfato de morfina. Em contrapartida, a expressão da proteína Fos nos demais níveis da PAG (dorsomedial nos níveis 5 e 6; dorsolateral nos níveis 4, 5 e 6; ventrolateral nos níveis 4, 5 e 6) não foi significativa em nenhum dos grupos estudados.

Tabela 4 - Densidade de células Fos+ na PAG por mm² dos grupos controle e experimental.

PAG		Controle (n=9)	Experimental (n=9)	<i>P</i>
Nível 1				
	Dm	64,21± 17,94	194,2 ± 48,54	0,007*
	L	82± 25,22	344,4 ± 93,40	0,0041*
Nível 2				
	Dm	74,68± 20,35	161,8 ± 27,96	0,027*
	DI	87,74± 27,99	197,4 ± 27,08	0,0156*
	L	93,84± 13,45	326,9 ± 45,84	0,0012*
Nível 3				
	Dm	70,27± 22,26	159,8 ± 19,83	0,011*
	DI	64,22± 12,97	165,4 ± 16,67	0,0004*
	L	83,95± 16,22	301,3 ± 33,34	<0,0001*
Nível 4				
	Dm	45,3± 11,02	126,6 ± 23,55	0,0087*
	DI	77,98± 20,48	154,4 ± 17,68	0,1012
	L	57,86± 18,67	216,6 ± 28,07	0,0012*
	VI	79,98± 23,04	97,56 ± 25,5	0,6183
Nível 5				
	Dm	115,3± 39,75	156,1 ± 39,4	0,4799
	DI	73,73± 11,29	102,3 ± 23,06	0,2883
	L	68,39± 15,7	194,1 ± 27,78	0,002*
	VI	99,46± 20,77	116,7 ± 33,03	0,6666
Nível 6				
	Dm	117,5± 26,27	149,7 ± 17,38	0,3271
	DI	137,6± 32,41	255,4 ± 57,22	0,0728
	L	88,37± 20,67	182,5 ± 34,56	0,0379*
	VI	103± 34,81	151,3 ± 17,30	0,2383

Valores de média ± erro padrão das células Fos+ por mm² para cada coluna da PAG de animais dos grupos controle e experimental por mm². *p<0,0379.

Figura 3 - Fotomicrografia de cortes frontais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ao nível do núcleo óculomotor, ilustrando o padrão de ativação da PAG de um animal do grupo controle (A e B) e de um animal do grupo experimental (B e C); B e D estão em maior aumento. Abreviações: AQ: aqueduto mesencefálico; III: núcleo óculomotor; PAGdl: coluna dorsolateral da PAG; PAGdm: coluna dorsomedial da PAG; PAGl: coluna lateral da PAG; SOM: área supraoculomotora.

Ainda neste estudo, avaliamos também o padrão de ativação dos neurônios orexinérgicos na LHA, nos animais controles e experimentais, a partir de reação imunoistoquímica de dupla marcação Fos+orexina. As contagens foram realizadas como descrito anteriormente na metodologia do Estudo 1.

Comparando os dois grupos analisados neste trabalho, é possível perceber que os animais do grupo experimental apresentam um número de neurônios duplamente marcados para Fos e orexina na LHA (Figura 4 C e D) relativamente maior do que os animais controles (Figura 4 A e B), e este aumento é observado tanto na região perifornical quanto na região lateral da LHA, como observado nos dados apresentados no Gráfico 5 (Tabela 5). No Gráfico 4 (Tabela 5) é possível observar que o número total de neurônios orexinérgicos se mantém o mesmo, tanto nos animais controles quanto nos animais experimentais.

Tabela 5 - Número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA dos grupos controle e experimental.

LHA			
<i>Número total de neurônios orexinérgicos</i>			
	Controle (n=7)	Experimental (n=7)	<i>P</i>
Perifornical	236,9 ± 25,5	234,8 ± 23,83	0,7962
Lateral	258,4 ± 10,55	252,7 ± 12,74	0,7357
<i>Número de neurônios duplamente marcados Fos+orexina</i>			
	Controle (n=7)	Experimental (n=7)	<i>P</i>
Perifornical	35,43 ± 10,09	122 ± 22,98	0,0072*
Lateral	17,29 ± 3,944	79,29 ± 9,398	<0,0001*

Valores expressos em média ± erro padrão do número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA comparando os grupos controle e experimental. *p<0,0072.

Gráfico 4 - Os dados foram expressos por média $\pm$ SEM do número total de neurônios orexinérgicos no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p < 0.05$.

Gráfico 5 - Os dados foram expressos por média $\pm$ SEM número total de neurônios duplamente marcados Fos+orexina no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p < 0,0072$.

Figura 4 - Fotomicrografia de cortes frontais da LHA de ratos intactos tratados com salina (A e B) ou com sulfato de morfina (C e D). Animais com lesão ACAd (E e F), lesão PL/ILA (G e H), lesão PAGrl (I e J) e lesão PAGvl (K e L) tratados com sulfato de morfina ilustrando os neurônios duplamente marcados para Fos e orexina. As setas indicam os neurônios duplamente marcados.

4.2 Estudo 2

Avaliação do papel funcional da ACAd do mPFC e o padrão de ativação da PAG e dos neurônios orexinérgicos da LHA (nas regiões perifornical e lateral) no comportamento de busca por droga, a partir de lesões neuroquímicas por NMDA restritas a ACAd do mPFC.

Nesta etapa do trabalho, animais portadores de lesões neuroquímicas por NMDA restritas ao ACAd do mPFC foram submetidos ao CPP. As lesões caracterizadas por perda neuronal e gliose intensa foram centradas bilateralmente na região do ACAd, compreendendo toda a extensão desta estrutura, acometendo as camadas 1, 3 e 5 (Figura 5) .

Figura 5 - Fotomicrografia de corte frontal do PFC corado pelo método de Nissl ilustrando a extensão da lesão bilateral por NMDA, restrita ao córtex do cíngulo anterior. Abreviaturas: PL: área pré-límbica; ACAd: parte dorsal do córtex do cíngulo anterior; Mos área somatomotora secundária.

Ao analisarmos o Gráfico 6 é possível perceber que os animais portadores de lesões bilaterais neuroquímicas por NMDA do córtex do cíngulo anterior não apresentaram preferência por nenhum dos compartimentos do aparato, já que não houve diferença estatisticamente significativa no tempo de permanência em cada um destes locais quando comparamos o pré-teste com o teste.

Tabela 6 - Tempo de permanência nos compartimentos do aparato do grupo lesão ACAAd.

Grupo Lesão ACAAd (n=8)

	Pré-teste	Teste	P
Compartimento 1	132,2 ± 34,02	207,2 ± 35,39	0,1651
Central	103,2 ± 7,207	71,40 ± 12,18	0,0549
Compartimento 2	201,4 ± 45,45	194 ± 32,25	0,8413

Valores expressos em média ± erro padrão do tempo de permanência nos compartimentos do aparato durante o pré-teste e o teste. * $p < 0.05$.

Gráfico 6 - Tempo (s) de permanência em cada compartimento do aparato durante o pré-teste e o teste (observação de 10 min) para os animais portadores de lesão bilateral neuroquímica por NMDA na ACAAd. * $p < 0.05$.

Ao analisarmos o padrão de expressão da proteína Fos da PAG dos animais portadores de lesões neuroquímicas por NMDA bilaterais da ACAd tratados com sulfato de morfina e submetidos ao CPP, podemos perceber uma clara diminuição da densidade de células Fos+ quando comparados com os animais intactos, tratados com sulfato de morfina e submetidos ao mesmo paradigma experimental (Figura 6).

Como podemos perceber na Tabela 7, essa diminuição segue no sentido rostrocaudal da PAG sendo estatisticamente significativa nas colunas dorsomedial (níveis 2 e 3), dorsolateral (níveis 2 e 3), lateral (níveis 1, 2, 3, 4 e 5), e ventrolateral (nível 6). Nos demais níveis da PAG (dorsomedial nos níveis 1, 4, 5 e 6; dorsolateral nos níveis 4, 5 e 6; lateral no nível 6; vl nos níveis 4 e 5) não houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos os animais intactos com os lesados

Tabela 7 - Densidade de células Fos+ na PAG por mm² dos grupos Intacto e Lesão ACAd.

PAG	Intacto (n=8)	Lesão ACAd (n=8)	P
Nível 1			
Dm	194,2± 48,54	100,3 ± 12,22	0,0973
L	344,4± 93,40	79,76 ± 9,664	0,0012*
Nível 2			
Dm	161,8± 27,96	66,81 ± 20,05	0,0173*
DI	197,4± 27,08	76,42 ± 12,93	0,0017*
L	326,9± 45,84	87,13 ± 12,46	0,0012*
Nível 3			
Dm	159,8± 19,83	79,44 ± 18,13	0,0112*
DI	165,4± 16,67	78,22± 19,93	0,0057*
L	301,3 ± 33,34	83,5 ± 15,56	<0,0001*
Nível 4			
Dm	126,6 ± 23,55	68,96 ± 12,3	0,0508
DI	154,4 ± 37,85	100,9 ± 26,82	0,2716
L	216,6 ± 28,07	85,59 ± 10,55	0,0006*
VI	97,56 ± 25,5	74,72 ± 11,43	0,4297
Nível 5			
Dm	156,1 ± 39,4	74,31 ± 17,21	0,0814
DI	102,3 ± 23,06	106 ± 18,42	0,9016
L	194,1 ± 27,78	101,5 ± 20,08	0,0193*
VI	116,7 ± 33,03	77,76 ± 15,6	0,3076
Nível 6			
Dm	149,7 ± 17,38	138,1 ± 21,01	0,6792
DI	255,4 ± 57,22	141,8 ± 20,24	0,0728
L	182,5 ± 34,56	115,6 ± 7,689	0,1282
VI	151,3 ± 17,30	66,68 ± 9,923	0,0011*

Valores de média ± erro padrão das células Fos+ por mm² comparando os grupos intacto e lesão ACAd para cada coluna da PAG. * $p < 0.0193$.

Figura 6 - Fotomicrografias de cortes frontais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ao nível do núcleo óculomotor, ilustrando o padrão de ativação da PAG de um animal com lesão bilateral por NMDA no ACAd (A e B) e de um animal intacto (B e C); B e D estão em maior aumento. Abreviações: AQ: aqueduto mesencefálico; III: núcleo óculomotor; PAGdl: coluna dorsolateral da PAG; PAGdm: coluna dorsomedial da PAG; PAGl: coluna lateral da PAG; SOM: área supraoculomotora.

Após investigarmos o padrão de ativação da proteína Fos na PAG, avaliamos o padrão de ativação dos neurônios orexinérgicos na LHA, a partir de reação imunoistoquímica de dupla marcação Fos+orexina. As contagens foram realizadas como descrito anteriormente na metodologia do Estudo 1.

Comparando o grupo de animais portadores de lesão na ACAd com o grupo de animais intactos, é possível perceber que os animais com lesão apresentam um número de neurônios duplamente marcados para Fos e orexina na LHA (Figura 4 E e F) relativamente menor do que os animais intactos (Figura 4 C e D), e esta diminuição é observada apenas na região lateral não havendo diferença na região perifornical da LHA, como verificado nos dados apresentados no Gráfico 8 (Tabela 8). No Gráfico 7 é possível observar que não há diferença estatisticamente significativa no número total de neurônios orexinérgicos tanto da região perifornical quanto da região lateral da LHA.

É importante salientar que todos os animais do grupo lesão estavam em alerta durante o pré-teste, condicionamento e teste e exercendo perfeitamente os comportamentos alimentar e de ingestão hídrica, assim como de atividade locomotora.

Tabela 8 - Número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA dos grupos Intacto e Lesão ACAd.

LHA			
<i>Número total de neurônios orexinérgicos</i>			
	Intacto (n=7)	Lesão ACAd (n=7)	<i>P</i>
Perifornical	261,1 ± 16,5	252,1 ± 11,71	0,6644
Lateral	252,7 ± 12,74	250,7 ± 11,78	0,9101
<i>Número de neurônios duplamente marcados Fos+orexina</i>			
	Intacto (n=7)	Lesão ACAd (n=7)	<i>P</i>
Perifornical	122 ± 22,98	67,71 ± 19,11	0,053
Lateral	79,43 ± 9,398	25,43 ± 8,127	0,001*

Valores expressos em média ± erro padrão do número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA.
* $p=0,001$.

Gráfico 7 - Os dados foram expressos por média $\pm$ SEM do número total de neurônios orexinérgicos no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p < 0.05$.

Gráfico 8 - Os dados foram expressos por média $\pm$ SEM número total de neurônios duplamente marcados Fos+orexina no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p = 0,001$.

4.3 Estudo 3

Investigação do papel funcional das regiões PL e ILA do mPFC e o padrão de ativação da PAG e dos neurônios orexinérgicos da LHA (nas regiões perifornical e lateral) do mPFC no comportamento de busca por droga, a partir de lesões neuroquímicas por NMDA casadas das regiões PL e ILA do mPFC.

Nesta etapa do trabalho animais portadores de lesões neuroquímicas por NMDA das regiões PL e ILA do mPFC (n=6) foram submetidos ao CPP. As lesões caracterizadas por perda neuronal e gliose intensa foram centradas bilateralmente nas regiões PL e ILA, acometendo as camadas 1, 3 e 5 (Figura 7).

Ao analisarmos o Gráfico 9 é possível perceber que os animais portadores de lesões bilaterais neuroquímicas por NMDA das regiões PL e ILA do mPFC não apresentaram preferência por nenhum dos compartimentos do aparato, já que não houve diferença estatisticamente significativa no tempo de permanência em cada um destes locais quando comparamos o pré-teste com o teste (Tabela 9).

Figura 7 - Fotomicrografia de corte frontal do PFC corado pelo método de Nissl ilustrando a extensão da lesão bilateral por NMDA restrita às regiões pré límbica e infra límbica. Abreviaturas ACAd: parte dorsal do córtex do cíngulo anterior; PL: área pré límbica; ILA: área infra límbica.

Tabela 9 - Tempo de permanência nos compartimentos do aparato do grupo lesão PL/ ILA.

Grupo Lesão PL/ ILA (n=6)

	Pré-teste	Teste	<i>P</i>
Compartimento 1	177,6 ± 42,47	212,4 ± 21,77	0,4867
Central	102 ± 11,15	116,2 ± 5,054	0,2796
Compartimento 2	166,4 ± 54,28	126,2 ± 18,69	0,5036

Valores expressos em média ± erro padrão do tempo de permanência nos compartimentos do aparato durante o pré-teste e o teste. * $p < 0.05$.

Gráfico 9 - Tempo (s) de permanência em cada compartimento do aparato durante o pré-teste e o teste (observação de 10 min) para os animais portadores de lesão bilateral neuroquímica por NMDA nas regiões PL e IL. * $p < 0.05$.

Ao analisarmos o padrão de expressão da proteína Fos da PAG dos animais portadores de lesões neuroquímicas por NMDA bilaterais das regiões PL e ILA do mPFC tratados com sulfato de morfina e submetidos ao CPP, podemos perceber uma clara diminuição da densidade de células Fos+ quando comparados com os animais intactos, tratados com sulfato de morfina e submetidos ao mesmo paradigma experimental (Figura 8).

Como é possível observar na Tabela 10, essa diminuição segue no sentido rostrocaudal da PAG sendo estatisticamente significativa nas colunas dorsomedial (nível 3), dorsolateral (nível 2) e lateral (níveis 1, 2, 3 e 4) sendo que nesta última coluna da PAG a diminuição do padrão de ativação se estendeu por mais níveis do que as demais colunas. Nos demais níveis da PAG (dorsomedial nos níveis 1, 2, 4, 5 e 6; dorsolateral nos níveis 3, 4, 5 e 6; lateral nos níveis 5 e 6; ventrolateral nos níveis 4, 5 e 6) não houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos os animais intactos com os lesados.

Tabela 10 - Densidade de células Fos+ na PAG de animais dos grupos intacto e lesão PL/ILA por mm².

PAG		Intacto (n=6)	Lesão PL/ILA (n=6)	<i>P</i>
Nível 1				
	Dm	152,3± 28,9	127,5 ± 18,71	0,4886
	L	263,8± 55,88	110,4 ± 17,11	0,0087*
Nível 2				
	Dm	140,2± 21,04	99,80 ± 14,59	0,1368
	DI	180,4± 24,87	104,8 ± 17,03	0,031*
	L	301,5± 45,12	100,9 ± 11,7	0,0043*
Nível 3				
	Dm	150,3± 20,58	66,62 ± 14,61	0,0078*
	DI	157,9± 17,66	87,75± 6,102	0,0649
	L	281,5 ± 31,72	91,34 ± 10,59	0,0022*
Nível 4				
	Dm	116,8 ± 25,35	80,67 ± 8,341	0,3939
	DI	131,3 ± 35,52	96,89 ± 21,53	0,4265
	L	190,6 ± 12,47	99,63 ± 10,28	0,0002*
	VI	74,49 ± 12,86	107,2 ± 19,24	0,1881
Nível 5				
	Dm	126,5 ± 30,75	57,71 ± 6,257	0,0649
	DI	84,28 ± 17,08	72,44 ± 6,088	0,8182
	L	174,9 ± 23,81	122,9 ± 7,724	0,132
	VI	88,31 ± 20	132,8 ± 10,84	0,132
Nível 6				
	Dm	135,8 ± 12,43	107,2 ± 26,69	0,3544
	DI	201,4 ± 22,41	167,8 ± 47,73	0,5382
	L	151,5 ± 18	152,8 ± 30,63	0,971
	VI	144,4± 18,8	109,4 ± 15,52	0,1816

Valores de média ± erro padrão das células Fos+ por mm² comparando os grupos intacto e lesão PL/ILA para cada coluna da PAG. **p*<0.031.

Figura 8 - Fotomicrografias de cortes frontais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ao nível do núcleo oculomotor, ilustrando o padrão de ativação da PAG de um animal com lesão bilateral por NMDA nas regiões PL e ILA do mPFC (A e B) e de um animal intacto (B e C); B e D estão em maior aumento. Abreviações: AQ: aqueduto mesencefálico; III: núcleo oculomotor; PAGdl: coluna dorsolateral da PAG; PAGdm: coluna dorsomedial da PAG; PAGl: coluna lateral da PAG; SOM: área supraoculomotora.

Após a investigação do padrão de ativação da proteína Fos na PAG dos animais portadores de lesões neuroquímicas bilaterais por NMDA nas regiões PL e ILA do mPFC, avaliamos o padrão de ativação dos neurônios orexinérgicos na LHA destes mesmos animais a partir de reação imunoistoquímica de dupla marcação Fos+Orexina. As contagens foram realizadas como descrito anteriormente na metodologia do Estudo 1.

Comparando o grupo de animais portadores de lesão nas regiões PL e ILA (Figura 4 G e H) com o grupo de animais intactos (Figura 4 C e D), é possível verificar que os animais com lesão apresentam um número de neurônios duplamente marcados para Fos e orexina na LHA relativamente menor do que os animais intactos, e esta diminuição é observada tanto na região lateral quanto na região perifornical da LHA, como observado nos dados apresentados nos Gráficos 11 e 10 respectivamente (Tabela 11). Neste mesmo Gráfico é possível observar que não há diferença estatisticamente significativa no número total de neurônios orexinérgicos tanto da região perifornical quanto da região lateral da LHA.

É importante salientar que todos os animais do grupo lesão estavam em alerta durante o pré-teste, condicionamento e teste e exercendo perfeitamente os comportamentos alimentar e de ingestão hídrica, assim como de atividade locomotora.

Tabela 11 - Número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA dos grupos Intacto e Lesão PL/ ILA.

LHA			
<i>Número total de neurônios orexinérgicos</i>			
	Intacto (n=7)	Lesão PL/ ILA (n=5)	<i>P</i>
Perifornical	261,1 ± 16,5	257,8 ± 18,78	0,897
Lateral	252,7 ± 12,74	251,6 ± 17,43	0,9588
<i>Número de neurônios duplamente marcados Fos+orexina</i>			
	Intacto (n=7)	Lesão PL/ ILA (n=5)	<i>P</i>
Perifornical	122 ± 22,98	46,2 ± 11,12	0,0262*
Lateral	79,43 ± 9,398	23 ± 4,785	0,0008*

Valores expressos em média ± erro padrão do número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA.
* $p < 0,0262$.

Gráfico 10 - Os dados foram expressos por média $\pm$ SEM do número total de neurônios orexinérgicos no grupamento perifornical e no grupamento lateral. $*p < 0.05$.

Gráfico 11 - Os dados foram expressos por média $\pm$ SEM número total de neurônios duplamente marcados Fos+orexina no grupamento perifornical e no grupamento lateral. $*p = 0,001$.

4.4 Estudo 4

Avaliação do papel funcional das colunas rostralateral e ventrolateral da PAG, e do padrão de ativação dos neurônios orexinérgicos na LHA (nas regiões perifornical e lateral) no comportamento de busca por droga, a partir de lesões neuroquímicas por NMDA restritas à PAGrl e de lesões restritas à PAGvl.

Nesta etapa do trabalho animais portadores de lesões neuroquímicas por NMDA na PAGrl foram submetidos ao CPP. As lesões foram centradas bilateralmente na PAGrl, compreendendo a metade exterior da coluna lateral ao nível do núcleo oculomotor, e estendendo-se, em menor grau, para partes adjacentes do núcleo reticular mesencefálico (Figura 9). Notavelmente, estas lesões foram centradas na região da PAG que apresentou maior densidade de células imunorreativas a proteína Fos durante o comportamento de busca por droga.

Ao analisarmos o Gráfico 12 é possível perceber que os animais portadores de lesões bilaterais neuroquímicas por NMDA na PAGrl não apresentaram preferência por nenhum dos compartimentos do aparato, já que não houve diferença estatisticamente significativa no tempo de permanência em cada um destes locais quando comparamos o pré-teste com o teste (Tabela 12).

Tabela 12 - Tempo de permanência nos compartimentos do aparato do grupo lesão PAGrl.

Grupo Lesão PAGrl (n=9)			
	Pré-teste	Teste	<i>P</i>
Compartimento 1	178,8 ± 24,19	187,8 ± 17,14	0,7659
Central	129,3 ± 9,486	127,3 ± 19,26	0,9271
Compartimento 2	139,8 ± 19,93	138,8 ± 23,36	0,9745

Valores expressos em média ± erro padrão do tempo de permanência nos compartimentos do aparato durante o pré-teste e o teste. **p*<0.05.

Gráfico 12 - Tempo (s) de permanência em cada compartimento do aparato durante o pré-teste e o teste (observação de 10 min) para os animais portadores de lesão bilateral neuroquímica por NMDA na PAGrl. * $p < 0.05$.

Figura 9 - Fotomicrografia de corte frontal da PAG, no nível do núcleo óculo motor (III) reagido imunoistoquimicamente para NEU-N ilustrando a lesão neuroquímica bilateral por NMDA na PAGrl.

Após a análise comportamental, avaliamos o padrão de ativação dos neurônios orexinérgicos na LHA, de animais portadores de lesões neuroquímicas bilaterais por NMDA na PAGrl a partir de reação imunoistoquímica de dupla marcação Fos + Orexina. As contagens foram realizadas como descrito anteriormente na metodologia do Estudo 1.

Comparando o grupo de animais portadores de lesão na PAGrl (Figura 4 I e J) com o grupo de animais intactos (Figura 4 C e D), é possível perceber que os animais com lesão apresentam um número de neurônios duplamente marcados para Fos e orexina na LHA relativamente menor do que os animais intactos, e esta diminuição é observada tanto na região perifornical quanto na região lateral da LHA, como observado nos dados apresentados no Gráfico 14 (Tabela 13). No Gráfico 13 é possível observar que não há diferença estatisticamente significativa no número total de neurônios orexinérgicos tanto da região perifornical quanto da região lateral da LHA.

É importante salientar que todos os animais do grupo lesão estavam em alerta durante o pré-teste, condicionamento e teste e exercendo perfeitamente os comportamentos alimentar e de ingestão hídrica, assim como de atividade locomotora.

Tabela 13 - Número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA dos grupos Intacto e Lesão PAGrl.

LHA			
<i>Número total de neurônios orexinérgicos</i>			
	Intacto (n=7)	Lesão PAGrl (n=7)	P
Perifornical	261,1 ± 16,5	260,1 ± 13,11	0,9629
Lateral	252,7 ± 12,74	248,3 ± 11,56	0,8012
<i>Número de neurônios duplamente marcados Fos+orexina</i>			
	Intacto (n=7)	Lesão PAGrl (n=7)	P
Perifornical	122 ± 22,98	36,43 ± 11,68	0,01*
Lateral	79,43 ± 9,398	15,14 ± 3,46	0,0006*

Valores expressos em média ± erro padrão do número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA.
*p<0,01.

Gráfico 13 - Os dados foram expressos por média $\pm$ SEM do número total de neurônios orexinérgicos no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p < 0.05$.

Gráfico 14 - Os dados foram expressos por média $\pm$ SEM número total de neurônios duplamente marcados Fos+orexina no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p = 0,001$.

Ainda neste estudo realizamos lesões neuroquímicas bilaterais por NMDA na PAGvl para controle de sítio especificidade. Após o período de recuperação os animais também foram submetidos ao CPP.

As lesões (Figura 10) foram centradas bilateralmente na parte ventrolateral da PAG, compreendendo o nível do núcleo troclear e estendendo-se até o terço posterior do núcleo dorsal da rafe.

Como é possível observar no Gráfico 15, os animais portadores de lesão bilateral na PAGvl permaneceram mais tempo no compartimento morfina durante o teste quando comparados com o tempo de permanência no mesmo compartimento durante o pré-teste. Ao analisarmos o tempo de permanência no compartimento salina é possível perceber que não há diferença estatisticamente significativa entre período de permanência no pré-teste e no teste, o mesmo ocorreu em relação ao tempo de permanência no compartimento central, não havendo diferença entre o tempo de permanência do pré-teste e do teste (Tabela 14).

Tabela 14 - Tempo de permanência nos compartimentos do aparato do grupo lesão PAGvl.

Grupo Lesão PAGvl (n=5)			
	Pré-teste	Teste	<i>P</i>
Compartimento 1	181,6 ± 7,865	307,6 ± 26,49	0,0079*
Central	141,4 ± 16,01	97 ± 14,39	0,0731
Compartimento 2	101,2 ± 23,01	93,6 ± 11,13	0,7738

Valores expressos em média ± erro padrão do tempo de permanência nos compartimentos do aparato durante o pré-teste e o teste. **p*=0.0079.

Gráfico 15 - Tempo (s) de permanência em cada compartimento do aparato durante o pré-teste e o teste (observação de 10 min) para os animais portadores de lesão bilateral neuroquímica por NMDA na PAGvl. * $p=0.0079$.

Figura 10 - Fotomicrografia de corte frontal da PAG, no nível do núcleo dorsal da rafe reagido imunoistoquimicamente para NEU-N ilustrando a lesão neuroquímica bilateral por NMDA na PAGvl. Abreviaturas: AQ: aqueduto mesocefálico; Pardal: coluna dorsolateral da PAG; Pagam: coluna dorso medial da PAG; Pago: coluna lateral da PAG; Durar: núcleo dorsal da rafe.

Em seguida, avaliamos o padrão de ativação dos neurônios orexinérgicos na LHA, dos animais portadores de lesões neuroquímicas bilaterais por NMDA na PAGvl, a partir de reação imunoistoquímica de dupla marcação Fos + Orexina. As contagens foram realizadas como descrito anteriormente na metodologia do Estudo 1.

Comparando o grupo de animais portadores de lesão na PAGvl (Figura 4 K e L) com o grupo de animais intactos (Figura 4 C e D), é possível perceber que não há diferença estatisticamente significativa (Tabela 15) quando comparamos os números de neurônios orexinérgicos (Gráfico 16) e de duplas marcações para Fos e orexina (Gráfico 17) tanto na região perifornical quanto na região lateral da LHA.

É importante salientar que todos os animais do grupo lesão estavam em alerta durante o pré-teste, condicionamento e teste e exercendo perfeitamente os comportamentos alimentar e de ingestão hídrica, assim como de atividade locomotora.

Tabela 15 - Número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA dos grupos Intacto e Lesão PAGvl.

LHA			
<i>Número total de neurônios orexinérgicos</i>			
	Intacto (n=7)	Lesão PAGvl (n=5)	<i>P</i>
Perifornical	261,1 ± 16,5	254,8 ± 17,56	0,8015
Lateral	252,7 ± 12,74	232,8 ± 12,79	0,3094
<i>Número de neurônios duplamente marcados Fos+orexina</i>			
	Intacto (n=7)	Lesão PAGvl (n=5)	<i>P</i>
Perifornical	122 ± 22,98	102 ± 19,89	0,5475
Lateral	79,43 ± 9,398	61,4 ± 8,88	0,2102

Valores expressos em média ± erro padrão do número total de células orexinérgicas e células duplamente marcadas Fos+orexina do grupamento perifornical e do grupamento lateral da LHA.
**p*<0,05.

Gráfico 16 - Os dados foram expressos por média $\pm$ SEM do número total de neurônios orexinérgicos no grupamento perifornical e no grupamento lateral. * $p < 0.05$.

Gráfico 17 - Os dados foram expressos por média $\pm$ SEM número total de neurônios duplamente marcados Fos+orexina no grupamento perifornical e no grupamento lateral * $p < 0.05$.

5 DISCUSSÃO

Os resultados comportamentais e funcionais obtidos neste trabalho ilustram a possível participação da PAGrl no comportamento de busca por droga. De acordo com os dados apresentados podemos inferir que a PAGrl exerceria um papel chave no controle deste comportamento, integrando as projeções do mPFC para então modular o sistema orexinérgico da LHA.

Para que esta hipótese fosse testada utilizamos como paradigma experimental o CPP, que é um teste bastante utilizado para estudar os efeitos reforçadores das drogas de abuso bem como a busca por estas substâncias (HAO et al., 2008; HARRYIS et al., 2005; SAKOORI et al., 2005). Entretanto, para melhor respondermos a pergunta deste trabalho, nós adaptamos o aparato experimental com a presença dos corredores laterais para podermos observar o padrão de busca por droga dos animais submetidos ao CPP para sulfato de morfina. É importante salientar que apesar das adaptações feitas no aparato experimental, todas as características do CPP foram mantidas.

Em todos os experimentos metade dos animais foi condicionada na caixa lateral com paredes claras e a outra metade foi condicionada na caixa lateral com paredes escuras. Esta medida fora tomada para que o condicionamento fosse resultante da interação da administração da droga com as características do lugar onde ela foi administrada e não apenas das pistas contextuais do ambiente.

Como os dados do Experimento 1 mostraram os ratos tratados com sulfato de morfina (grupo experimental), submetidos ao paradigma de CPP, desempenharam uma clara preferência pelo compartimento previamente pareado com a droga, permanecendo mais tempo neste compartimento (compartimento 1) durante o teste quando comparados com o tempo de permanência no mesmo local durante o pré-teste. Além disso, pudemos perceber que os animais tratados com sulfato de morfina permaneceram mais tempo no compartimento central durante o pré-teste do que durante o teste. Em relação ao período de tempo gasto no compartimento 2 (compartimento pareado com salina) não houve diferença quando comparamos o tempo gasto neste compartimento durante o pré-teste e o teste.

Estes dados nos mostraram que durante o pré-teste os animais do grupo experimental não fizeram preferência por nenhum compartimento, havendo um equilíbrio no tempo de permanência nos locais analisados. Entretanto, durante o

teste este equilíbrio não ocorreu, uma vez que os ratos permaneceram a maior parte do tempo no compartimento previamente pareado com a droga, e consequentemente menos tempo no compartimento central ocasionando a diferença no tempo de permanência neste local durante o teste e o pré-teste. Os animais tratados apenas com salina não apresentaram preferência por nenhum dos compartimentos do aparato.

Estes resultados vão de encontro com dados da literatura, indicando que o CPP para sulfato de morfina é um paradigma bastante eficaz para o estudo do comportamento de busca por droga (HAO et al., 2008; HARRYIS et al., 2005; KARGARI et al., 2012; SAKOORI et al., 2005), já que os animais tratados com sulfato de morfina e submetidos ao CPP apresentaram clara preferência pelo compartimento previamente pareado com a droga.

Após a análise dos dados comportamentais, investigamos o padrão de ativação dos neurônios do mPFC da PAGrl e do sistema orexinérgico da LHA através da análise da expressão da proteína Fos nos animais dos grupos controle e experimental.

Ao observarmos a densidade de células Fos+ nas áreas ACAd, PL e ILA do mPFC pudemos perceber que não houve diferença no padrão de ativação quando comparamos os animais tratados com sulfato de morfina com os animais do grupo controle, indicando que o mPFC estaria mobilizado nas duas situações.

De acordo com a literatura o mPFC, além de ser uma estrutura fundamental no comportamento de busca droga (FUSTER, 2000; KOLB, 1984), exerce grande influência sobre o planejamento comportamental organizando diversos processos cognitivos e emocionais essenciais para o controle comportamental como a atenção, o planejamento e a tomada de decisão (BELLEINE; DICKINSON, 1998; DALLEY et al., 2004; EUSTON et al., 2012; MILLER; COHEN, 2001). Visto isso, a ativação observada no mPFC dos animais de ambos os grupos seria decorrente do plano comportamental a ser executado pelos animais uma vez que no dia do teste foram colocados em um ambiente a ser explorado pelos mesmos.

Além do aumento da ativação neuronal destas regiões corticais foi possível observar um claro aumento da densidade de células Fos+ na PAGrl dos animais tratados com sulfato de morfina e que apresentaram preferência pelo compartimento previamente pareado com a droga quando comparados aos animais do grupo controle. O padrão de expressão da proteína Fos na PAGrl dos animais que fizeram

a busca pela droga é bastante similar ao observado nos animais que desempenharam o comportamento de caça predatória (COMOLI et al., 2003).

De acordo com Mota-Ortiz e colaboradores 2009, a PAGrl é uma estrutura sabidamente envolvida em aspectos motivacionais e de recompensa como a busca por presas durante o comportamento de caça predatória e lesões neuroquímicas bilaterais neste sítio mesencefálico inibem completamente a caça durante o comportamento predatório (MOTA-ORTIZ et al., 2012; SUKIKARA et al., 2006). Sendo assim, estes dados indicam que, além de estar envolvido nos aspectos motivacionais relacionados à busca por alimento, este setor da PAG poderia estar associado também aos aspectos motivacionais relacionados à busca pela droga.

Adicionalmente a estes dados é importante destacarmos que dentre as principais estruturas que aferentam a PAGrl estão às áreas ACAd, PL e ILA do mPFC (MOTA-ORTIZ et al., 2009) que são regiões envolvidas no planejamento comportamental frente a respostas motivacionais associadas à recompensa (SCHOENBAUM; ROESCH, 2005). Dessa forma, poderíamos sugerir que a preferência observada nos animais tratados com sulfato de morfina em relação ao compartimento previamente pareado com a droga seria modulada por projeções oriundas das regiões ACAd, PL e ILA do mPFC para a PAGrl que, por sua vez, se projetaria para sítios diencefálicos que se comunicam com estruturas do sistema dopaminérgico mesolímbico para promover a busca pela droga.

Os animais do grupo experimental também apresentaram certo aumento da densidade de células Fos+ na região dorsal da PAG. Esta ativação poderia estar relacionada com o período de abstinência a que esses animais foram submetidos, pois no dia do teste estes animais não receberam injeções de sulfato de morfina, o que poderia caracterizar um quadro de abstinência. Este dado requer novos experimentos, porém, dados preliminares de nosso laboratório mostram que animais tratados com sulfato de morfina por dez dias consecutivos seguidos por cinco dias de abstinência, apresentam um aumento das células imunorreativas a proteína Fos na região dorsal da PAG, explicando assim a ativação deste setor da PAG nos ratos tratados com sulfato de morfina e submetidos ao CPP (Oliveira e colaboradores; dados sendo discutidos pelo grupo).

Ainda durante a análise do padrão de expressão da proteína Fos nos animais dos grupos controle e experimental pudemos perceber uma clara diferença na ativação do sistema orexinérgico entre os dois grupos citados.

De acordo com dados da literatura o sistema orexinérgico da LHA é dividido em região medial/ perifornical e região hipotalâmica lateral (MOTA-ORTIZ et al., 2012; SWANSON et al., 2005). Os neurônios orexinérgicos localizados na porção lateral da LHA estariam envolvidos nos mecanismos de recompensa associados ao comportamento de busca por droga e comida, graças à ligação com o sistema mesolímbico, via projeções para a VTA e núcleo acumbens (ASTON-JONES et al., 2010; HARRIS; ASTON-JONES, 2006), já os neurônios orexinérgicos localizados na região perifornical estariam relacionados à manutenção dos níveis de alerta por intermédio de projeções para o LC e para os núcleos TM, PPT e LDT (HARRIS; ASTON-JONES, 2006; SAKURAI 2007).

Sendo assim, o aumento das duplas marcações no grupamento lateral poderia ser decorrente do comportamento de busca por droga apresentado por estes animais uma vez que, de acordo com a literatura (ASTON-JONES et al., 2010; HARRIS; ASTON-JONES, 2006; SAKURAI 2007), as células desta região estariam intimamente envolvidas com os mecanismos de recompensa relacionados à busca por droga através de projeções para o sistema dopaminérgico mesolímbico, enquanto que o aumento dos neurônios duplamente marcados no grupamento perifornical da LHA estaria relacionado com os níveis de atenção dedicados pelo rato durante a execução do comportamento, já que o animal estaria a procura do efeito recompensador associado a administração da droga ao qual ele foi submetido durante o condicionamento.

O aumento de duplas marcações nestes dois grupamentos da LHA também é observado em animais submetidos ao comportamento de caça predatória. Entretanto, lesões neuroquímicas bilaterais restritas a PAGrl são capazes de diminuir o número de neurônios duplamente marcados para Fos e orexina apenas no grupamento lateral não havendo diminuição de duplas marcações no grupamento perifornical. Portanto, este comportamento estaria sendo mediado via projeções ascendentes da PAGrl para a região lateral da LHA (MOTA-ORTIZ et al., 2012), que é um setor hipotalâmico crítico para os comportamentos recompensadores como a busca por comida ou droga via projeções para o sistema dopaminérgico mesolímbico (ASTON-JONES et al., 2009, 2010; HARRIS; ASTON-JONES, 2006).

Apesar da diferença observada quanto ao número de neurônios duplamente marcados para Fos e orexina no grupamento lateral e perifornical da LHA dos grupos controle e experimental, não observamos diferença no número total de

neurônios orexinérgicos destas regiões quando comparamos os dois grupos em questão.

Portanto, a ativação dos neurônios destas regiões encefálicas mencionadas até aqui poderia ser resultante do envolvimento das mesmas no comportamento de busca por droga, e a preferência executada pelos animais tratados com sulfato de morfina durante o CPP poderia ser resultado de uma integração das projeções do mPFC para a PAGrl que por sua vez modularia os neurônios orexinérgicos do grupamento lateral da LHA que, como dito anteriormente se comunicam com o sistema dopaminérgico mesolímbico para então promover o comportamento de busca por droga.

Como pudemos observar, os dados que ilustram o padrão de ativação da proteína Fos discutidos até agora apontariam a existência de uma via entre o mPFC, a PAGrl e o sistema orexinérgico da LHA que estaria envolvida no controle do comportamento de busca por droga. Entretanto, para comprovarmos esta hipótese, nos experimentos seguintes realizamos lesões neuroquímicas bilaterais por NMDA nas regiões ACAAd, PL e ILA do mPFC.

Tendo em vista a participação destas regiões do mPFC no comportamento de busca por droga (FUSTER, 2000; KOLB, 1984) e de suas projeções para a PAGrl (MOTA-ORTIZ et al., 2009), nos estudos 2 e 3, respectivamente, avaliamos o papel funcional da ACAAd e das regiões PL e ILA do mPFC no comportamento de busca por droga a partir de lesões neuroquímicas por NMDA.

De acordo com Schoenbaum e Roesch (2005), o mPFC desempenha um papel crítico no planejamento de respostas comportamentais motivadas associadas a elementos que oferecem recompensa. Além disso, estudos de neuroimagem mostraram que pacientes usuários de cocaína, metanfetamina e heroína, apresentaram um aumento de atividade neuronal do mPFC, quando colocados diante de pistas previamente associadas à droga (BOLLA et al., 2003; CHILDRESS et al., 1999; VOLKOW E FOWLER, 2000).

Como foi possível observar em nossos resultados, os animais portadores de lesão da ACAAd e lesão casada das áreas PL e ILA não fizeram preferência por nenhum dos compartimentos do aparato, quando comparamos o pré-teste com o teste, resultando em um equilíbrio no tempo gasto em cada um dos compartimentos nas duas situações mencionadas. Estes resultados corroboram com dados da literatura que apontam para o envolvimento do mPFC no CPP. De acordo com estes

dados lesões do mPFC foram capazes de inibir a busca por droga no CPP (HAO et al., 2008).

Entretanto, alguns trabalhos sugerem que as diferentes áreas do mPFC desempenhariam papéis distintos para o comportamento de busca por droga. De acordo com estes estudos as áreas ACAd e PL estariam sendo recrutadas para promover este comportamento durante o paradigma de autoadministração (CAPRILES et al., 2003; Mc FARLAND et al., 2004; Mc FARLAND; KALIVAS, 2001), enquanto que a região IL estaria envolvida na promoção da busca pela droga durante o CPP para sulfato de morfina (TZSCHENTKE; SHIMIDT, 1998; 1999).

Contudo, não podemos deixar de mencionar que apesar de estarem envolvidas na execução da autoadministração, as regiões ACAd e PL também participam do condicionamento de pistas previamente associadas a droga (BOLLA et al., 2003; CHILDRESS et al., 1999; VOLKOW E FOWLER, 2000), e a área PL ainda participaria da busca pela droga durante o CPP para cocaína (TZSCHENTKE; SHIMIDT, 1998).

Sendo assim poderíamos inferir que os animais portadores de lesão da ACAd e de lesão casada das regiões PL e ILA não realizaram preferência por nenhum dos compartimentos do aparato, pois a execução deste comportamento dependeria da integridade dos neurônios destas regiões (HAO et al., 2008) que estariam envolvidos tanto no condicionamento de pistas previamente associadas com a droga (BOLLA et al., 2003; CHILDRESS et al., 1999; VOLKOW E FOWLER, 2000) quanto com a busca pela mesma durante o CPP (TZSCHENTKE; SHIMIDT, 1998, 1999).

Após a análise funcional, avaliamos o padrão de expressão da proteína Fos nos animais portadores de lesão da região ACAd e de lesão casada das áreas PL e ILA submetidos ao CPP para morfina. Comparados com os animais intactos, os animais lesados apresentaram uma clara diminuição da ativação da PAG, e tanto os animais com lesão na ACAd quanto os animais com lesão das áreas PL e ILA apresentaram diminuição da ativação neuronal na PAGrl (animais com lesão ACAd nos níveis 1,2,3,4,5 e animais com lesão PL/ ILA nos níveis 1,2,3,4) e, como descrito nos resultados, é a região de maior ativação em animais intactos tratados com sulfato de morfina submetidos ao CPP.

Entretanto, não podemos esquecer que a PAGrl é aferentada por fibras provenientes da ACAd e das áreas PL e ILA do mPFC (MOTA-ORTIZ et al., 2009). Dessa forma, era de se esperar que os neurônios da PAGrl deixassem de ser

estimulados nestes animais com lesão da ACAd e com lesão casada das regiões PL e ILA, uma vez que os neurônios destas regiões corticais que aferentam a PAGrl foram destruídos, podendo explicar então a ausência de preferência tanto nos animais com lesão de ACAd quanto nos animais de lesão casada das áreas PL e ILA submetidos ao CPP para sulfato de morfina.

Desta forma, a diminuição da ativação dos neurônios da PAGrl, decorrente da lesão do mPFC, poderia estar relacionada a diminuição da preferência nestes animais. Sendo assim, a PAGrl que é uma estrutura chave para a manutenção dos comportamentos associados à recompensa como a busca alimentar (MOTA-ORTIZ et al., 2012) poderia também estar envolvida nos mecanismos que controlam a preferência condicionada por lugar associada a sulfato morfina, já que durante a execução deste comportamento os animais tratados com esta droga apresentaram clara ativação dos neurônios da PAGrl.

Continuando a análise do padrão de expressão do padrão de expressão da proteína Fos nos animais portadores de lesão da região ACAd e de lesão casada das áreas PL e ILA submetidos ao CPP para morfina, é possível perceber uma diminuição das duplas marcações para Fos e orexina na LHA destes animais.

Ao analisarmos a LHA dos animais com lesão da ACAd e lesão casada PL/ILA é possível perceber que a diminuição dos neurônios duplamente marcados para Fos e orexina se dá principalmente no grupamento lateral da LHA que, de acordo com a literatura, desempenha um papel chave para a expressão do comportamento de busca por droga através de projeções para estruturas do sistema dopaminérgico mesolímbico. (ASTON-JONES et al., 2009, 2010; HARRIS; ASTON-JONES, 2006), e é fortemente aferentada pela PAGrl (MOTA-ORTIZ et al., 2012) que também não está ativada nos animais com lesão. Sendo assim, era de se esperar que os animais com lesão do mPFC apresentassem uma diminuição da ativação desta região quando comparados com os animais intactos submetidos ao CPP.

Assim como os animais intactos tratado com salina os animais com lesão do mPFC também apresentaram diminuição no número de neurônios duplamente marcados para Fos e orexina no grupamento perifornical da LHA. Entretanto, essa diminuição só é estatisticamente significativa nos animais com lesão casada PL/ILA. Essa diminuição poderia estar ocorrendo devido o fato de as regiões PL e ILA do mPFC estarem envolvidas com o CPP (TZSCHENTKE; SHIMIDT, 1998, 1999)

enquanto que a ACAd, apesar de participar dos mecanismos envolvidos no condicionamento de pistas previamente pareadas com a droga (TZSCHENTKE SHIMIDT, 1998, 1999) estaria participando do controle da busca pela droga durante a autoadministração (CAPRILES et al., 2003; Mc FARLAND et al., 2004; Mc FARLAND; KALIVAS, 2001).

De acordo com a literatura o sistema orexinérgico da LHA estaria envolvido principalmente na busca pela droga durante o CPP. Estudos mostram que a administração do antagonista de orexina é capaz de reduzir este comportamento e promover a ativação dos neurônios orexinérgicos do grupamento lateral da LHA durante o CPP para sulfato de morfina mas não durante a autoadministração (ASTON-JONES et al., 2009; BOUTREL et al., 2005; HARRIS et al., 2005; NARITA et al., 2006).

É importante salientar, que o mPFC se projeta para o sistema orexinérgico da LHA (ONGÜR et al., 1998) entretanto, durante o CPP, esta região cortical poderia modular os neurônios orexinérgicos via PAGrl que é uma estrutura sabidamente envolvida no controle de comportamentos associados à recompensa como a busca alimentar (MOTA-ORTIZ et al., 2012). Portanto, todos os dados apresentados até este momento, nos direcionam para a existência de uma via entre o mPFC (ACAd, PL e ILA), a PAGrl, o sistema orexinérgico da LHA e o sistema dopaminérgico mesolímbico, onde a PAGrl exerceria um papel integrado das projeções corticais para então modular os neurônios orexinérgicos da LHA organizando assim a preferência condicionada por lugar associada ao sulfato de morfina, uma vez as lesões da ACAd, e das áreas PL e ILA do mPFC foram capazes inibir a preferência no CPP para esta droga, além de diminuir toda a ativação da via descrita neste trabalho.

Entretanto, para confirmarmos a ideia de que a PAGrl seria a estrutura que integraria as projeções provenientes do mPFC para então modular o sistema orexinérgico da LHA e assim, promover a busca pela droga durante o CPP para sulfato de morfina no estudo 4 avaliamos o papel funcional da PAGrl no comportamento de busca por droga, a partir de lesões neuroquímicas por NMDA.

Analisando então os resultados deste experimento foi possível perceber que os animais portadores de lesão deste sítio mesencefálico não fizeram preferência por nenhum dos compartimentos do aparato, quando comparamos o pré-teste com

teste, resultando em um equilíbrio no tempo gasto em cada um dos compartimentos nas duas situações mencionadas.

Como relatado anteriormente a PAGrl desempenha um importante papel nos mecanismos de recompensa uma vez que os neurônios desta estrutura mesencefálica se projetam para os neurônios orexinérgicos da área hipotalâmica lateral e a lesão desta região é capaz de inibir completamente a busca pela presa durante a caça predatória (MOTA-ORTIZ et al., 2012), além de ser fortemente aferentada pelas regiões ACAd, PL e ILA do mPFC (MOTA-ORTIZ et al., 2009). Sendo assim, era de se esperar que os animais lesados não executassem preferência por nenhum dos compartimentos do aparato, já que a execução de comportamentos associados à recompensa como a busca alimentar (MOTA-ORTIZ et al., 2012) e a busca por droga depende da integridade dos neurônios da PAGrl.

Posteriormente a análise dos dados de lesão da PAGrl, observamos o padrão de ativação dos neurônios duplamente marcados para Fos e orexina na LHA dos animais lesados. Diferentemente dos animais intactos, os animais portadores de lesão neuroquímica da PAGrl apresentaram clara diminuição dos neurônios duplamente marcados para Fos e orexina na LHA tanto na região perifornical (controle da manutenção da atenção e do alerta) quanto na região lateral (controle dos comportamentos de busca por droga e comida) (HARRIS; ASTON-JONES, 2006, 2010; SAKURAI, 2007), e esta diminuição se deve provavelmente a lesão da PAGrl. É importante salientar que não houve diferença no número total de neurônios orexinérgicos nos grupamentos perifornical e lateral da LHA quando comparamos os animais intactos com os animais lesados.

De acordo com Mota-Ortiz e colaboradores (2012), os neurônios orexinérgicos da LHA são aferentados por neurônios oriundos da PAGrl, e a perda destes neurônios pode, além de inibir a caça predatória durante o comportamento alimentar, causar também a diminuição dos neurônios duplamente marcados para Fos e orexina neste setor hipotalâmico, indicando assim a possível existência de uma via entre a PAGrl e os neurônios orexinérgicos da LHA, que modularia a busca alimentar durante o comportamento de caça predatória. Vários são os dados da literatura que mostram o envolvimento dos neurônios orexinérgicos da LHA com os mecanismos de recompensa, por se comunicarem com o Sistema Dopaminérgico Mesolímbico através de projeções para a VTA (HARRIS; ASTON-JONES, 2006; ASTON-JONES et al., 2009, 2010).

Dessa forma, a lesão da PAGrl seria capaz de impedir a ação modulatória que estes neurônios exercem sobre os neurônios orexinérgicos da LHA, causando assim uma drástica diminuição das duplas marcações Fos + orexina neste setor (tanto na região lateral já que os animais não desempenharam a busca, quanto na região perifornical, pois, uma vez que os animais não apresentaram a busca os níveis de atenção exigidos para a execução deste comportamento não foram requeridos) e a consequente inibição do comportamento de busca por droga, já que os animais lesados não apresentaram preferência por nenhum dos compartimentos do aparato durante o paradigma de CPP.

Por fim, realizamos lesões neuroquímicas bilaterais por NMDA restritas a PAGvl para controle de sítio especificidade, visando mostrar que a busca pela droga durante o CPP para sulfato de morfina dependeria apenas da PAGrl e não da PAG como um todo.

Visto isso, após o tempo de recuperação cirúrgica, os animais portadores de lesões neuroquímicas bilaterais por NMDA restritas a PAGvl, foram submetidos ao CPP para posterior avaliação comportamental. Os animais com lesão na PAGvl desempenharam clara preferência pelo compartimento previamente pareado com a droga, indicando que esta região da PAG não estaria envolvida na busca pela droga durante o CPP para sulfato de morfina. Este resultado era esperado, pois estes animais estavam com a PAGrl intacta, e, portanto, os neurônios desta região estariam recebendo projeções do mPFC e enviando projeções para os neurônios orexinérgicos da LHA (Gráfico 13), que por sua vez estariam ativando o sistema dopaminérgico mesolímbico para então promover a busca pela droga.

Contudo, todos os resultados apresentados e discutidos neste trabalho, nos permite sugerir que a PAGrl exerceria um papel crítico para a promoção do comportamento de busca por droga durante o CPP para sulfato de morfina, integrando aferências provenientes do mPFC (ACAd, PL e ILA) para então modular os neurônios orexinérgicos da LHA que se projetam para o sistema dopaminérgico mesolímbico.

6 CONCLUSÃO

- Tanto o mPFC (ACAd, PL e ILA) quanto a PAGrl estariam envolvidos na modulação do comportamento de busca por droga durante o CPP para sulfato de morfina, uma vez que os neurônios destes sítios encefálicos se encontram ativados nos animais submetidos ao CPP e que apresentaram clara preferência pelo compartimento previamente pareado com a droga, salientando a participação da PAGrl nos mecanismos neurais relacionados à recompensa;
- O aumento de neurônios duplamente marcados Fos + orexina na LHA pode indicar que além desse sistema participar dos processos de busca por droga como já descrito na literatura, a PAG, em particular, a PAGrl mobilizada poderia estar modulando este comportamento via LHA, assim como ocorre no comportamento de busca pela presa durante a caça predatória.
- Tanto a lesão neuroquímica bilateral da ACAd quanto à lesão neuroquímica bilateral casada das áreas PL e ILA do mPFC foram capazes de inibir a preferência pelo compartimento previamente pareado com a droga, além de causar uma grande diminuição da ativação dos neurônios da PAGrl e do número de duplas marcações para Fos e orexina na LHA. Sendo assim, este dado reforça a ideia de que a PAGrl exerceria um papel crítico nesta via, integrando aferências provenientes do mPFC (ACAd, PL e ILA) para modular os neurônios orexinérgicos da LHA que se projetam para o sistema dopaminérgico mesolímbico.
- A lesão neuroquímica bilateral da PAGrl foi capaz de inibir a preferência pelo compartimento previamente pareado com a droga, além de causar uma grande diminuição do número de duplas marcações para Fos e orexina na LHA. Sendo assim, esse dado reforça a ideia de que os neurônios da PAGrl integrariam aferências do mPFC (ACAd, PL e ILA) e consequentemente exerceriam uma ação modulatória sobre os neurônios orexinérgicos da LHA que por sua vez se comunicam com estruturas do Sistema Dopaminérgico

Mesolímbico, controlando assim a expressão do comportamento de busca por droga.

- A lesão neuroquímica bilateral da PAGvl não causou grandes déficits comportamentais nos animais tratados com sulfato de morfina e submetidos ao CPP e tão pouco causou diminuição da ativação dos neurônios orexinérgicos da LHA, indicando assim que a promoção do comportamento de busca por droga durante o CPP para sulfato de morfina dependeria da integridade da PAGrl e não da PAG como um todo.

REFERÊNCIAS*

ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 5. ed. São Paulo: **Artmed**, 2014. 992 p.

ASTON-JONES, G.; SMITH, R. J.; MOORMAN, D.E.; RICHARDSON, K .A. Role of lateral hypothalamic orexin neurons in reward processing and addiction. **Neuropharmacology**, v.56, s.1, p.112-121, 2009.

ASTON-JONES, G.; SMITH, R. J.; SARTOR, G. C.; MOORMAN, D. E.; MASSI, L.; TAHSILI-FAHADAN, P.; RICHARDSON, K. A. Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: a role in reward seeking and addiction. **Brain. Res.**, v.1314, p.74-90, 2010.

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S. P. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. **Prog. Brain. Res.**, v.87, p.269-305, 1991.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends Neurosci.**, v.17, n.9, p.379-389, 1994.

BOLLA, K. I.; ELDTRETH, D. A.; LONDON, E. D.; KIEHL, K. A.; MOURATIDIS, M.; CONTOREGGI, C.; MATOCHIK, J. A.; KURIAN, V.; CADET, J. L.; KIMES, A. S.; FUNDERBURK, F. R.; ERNST, M. Orbitofrontal cortex dysfunction in abstinent cocaine abusers performing a decision-making task. **Neuroimage**, v.19, n.3, p. 1085-1094, 2003.

BORGLAND, S. L.; TAHA, S. A.; SARTI, F.; FIELDS, H. L.; BONCI, A. Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. **Neuron.**, v.49, n.4, p.589-601, 2006.

BOUTREL, B.; KENNY, P. J.; SPECIO, S. E.; MARTIN-FARDON, R.; MARKOU, A.; KOOB, G. F.; DE LECEA, L. Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.102, n.52, p.19168-19173, 2005.

CAPRILES, N.; RODAROS, D.; SORGE, R. E.; STEWART, J. A role for the prefrontal cortex in stress- and cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. **Psychopharmacology**, v.168, n.1-2, p. 66-74, 2003.

CARRIVE, P.; LEUNG, P.; HARRIS, J.; PAXINOS, G. Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. **Neuroscience**, v.78, n.1, p.165-177, 1997.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHEMELLI, R. M.; WILLIE, J. T.; SINTON, C. M.; ELMQUIST, J. K.; SCAMMELL, T.; LEE, C.; RICHARDSON, J. A.; WILLIAMS, S. C.; XIONG, Y.; KISANUKI, Y.; FITCH, T. E.; NAKAZATO, M.; HAMMER, R. E.; SAPER, C. B.; YANAGISAWA, M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. **Cell**, v.98, n.4, p.437-451, 1999.

CHILDRESS, A. R.; MOZLEY, P. D.; MCELGIN, W.; FITZGERALD, J.; REIVICH, M.; O'BRIEN, C.P. Limbic activation during cue-induced cocaine craving. **Am.J. Psychiatry**, v.156, n.1, p.11-8, 1999.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; NEGRÃO, N.; GOTO, M.; CANTERAS, N. S. Functional mapping of the prosencephalic systems involved in organizing predatory behavior in rats. **Neuroscience**, v.130, n.4, p.1055-67, 2005.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behav. Brain. Res.**, v.138, n.1, p.17-28, 2003.

DALLEY, J. W.; CARDINAL, R. N.; ROBBINS, T. W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 28, p.771-784, 2004.

DEADWYLER, S. A. Electrophysiological correlates of abused drugs: relation to natural rewards. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1187, p.140-147, 2010.

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; McNAUGHTON, B. L. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. **Neuron**, v. 76, p. 1057-1070, 2012.

FADEL, J.; DEUTCH, A. Y. Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. **Neuroscience**, v.111, n.2, p.379-387, 2002.

FUSTER, J. M. Executive frontal functions. **Exp. Brain Res.**, v.422, p.556-578, 2000.

FUCHS, R. A.; BRANHAM, R. K.; SEE, R. E. Different neural substrates mediate cocaine seeking after abstinence versus extinction training: critical role for the dorsolateral caudate-putamen. **J. Neurosci.**, v. 26, p.3584-3588.

GEORGESCU, D.; ZACHARIOU, V.; BARROT, M.; MIEDA, M.; WILLIE, J. T.; EISCH, A. J.; YANAGISAWA, M.; NESTLER, E. J.; DILEONE, R. J. Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. **J. Neurosci.**, v.15, n.8, p.3106-3111, 2003.

GIPSON, C. D.; KUPCHIK, Y. M.; SHEN, H.; REISSNER, K. J.; THOMAS, C. A.; KALIVAS, P. W. Relapse induced by cues predicting cocaine depends on rapid, transient synaptic potentiation. **Neuron**, v. 77, p.867-872, 2013.

GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D., 2011. Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 12, p.652-669, 2011.

HAO, Y.; YANG, J.; SUN, J.; QI, J.; DONG, Y.; WU, C. F. Lesions of the medial prefrontal cortex prevent the acquisition but not reinstatement of morphine-induced conditioned place preference in mice. **Neurosci. Letters.**, v. 433, p. 48-53, 2008.

HARRIS, G. C.; ASTON-JONES, G. Arousal and reward: a dichotomy in orexin function. **Trends Neurosci.**, v.29, n.10, p.571-577, 2006.

HARRIS, G. C.; HUMMEL, M.; WIMMER, M.; MAGUE, S. D.; ASTON-JONES, G. Elevations of FosB in the nucleus accumbens during forced cocaine abstinence correlate with divergent changes in reward function. **Neuroscience**, v.147, n.3, p.583-591, 2007.

HARRIS, G. C.; WIMMER, M.; ASTON-JONES, G. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. **Nature**, v.437, n.7085, p.556-559, 2005.

HARRIS, G. C.; WIMMER, M.; RANDALL-THOMPSON, J. F.; ASTON-JONES, G. Lateral hypothalamic orexin neurons are critically involved in learning to associate an environment with morphine reward. **Behav. Brain Res.**, v.183, n.1, p.43-51, 2007.

ITOH, K.; KONISHI, A.; NOMURA, S.; MIZUNO, N.; NAKAMURA, Y.; SUGUIMOTO, T. Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of the horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. **Brain Res.**, v.175, p.341-346, 1979.

KALIVAS, P. W.; VOLKOW. The neural basis of addiction: A pathology of motivation and choice. **Am. J. Psychiatry**, v.162, n.8, p.1403-1413, 2005.

KELLEY, A. E.; BALDO, B. A.; PRATT, W. E. A proposed hypothalamic-thalamic-striatal axis for the integration of energy balance, arousal, and food reward. **J. Comp. Neurol.**, v.493, n.1, p.72-85, 2005.

KILTS, C. D.; GROSS, R. E.; ELY, T. D.; DREXLER, K. P. The neural correlates of cue-induced craving in cocaine-dependent women. **Am. J. Psychiatry**, v. 161, p.233-241, 2004.

KOLB, B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. **Brain Res. Rev.**, v.8, p.65-98, 1984.

KUHN, S.; GALLINAT, J.; Common biology of craving across legal and illegal drugs – a quantitative meta-analysis of cue-reactivity brain response. **Eur. J. Neurosci.**, v. 33, p. 1318-1326, 2011.

LAWRENCE, A. J.; COWEN, M. S.; YANG, H. J.; CHEN, F.; OLDFIELD, B. The orexin system regulates alcohol-seeking in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v.148, n.6, p.752-759, 2006.

LIN, L.; FARACO, J.; LI, R.; KADOTANI, H.; ROGERS, W.; LIN, X.; QIU, X.; DE JONG, P. J.; NISHINO, S.; MIGNOT, E. The sleep disorder canine narcolepsy is

caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. **Cell**, v.98, n.3, p.365-76, 1999.

McFARLAND, K.; KALIVAS, P. W. The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. **J. Neurosci.** v. 1, n.21 p. 8655-8663, 2001.

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.18, n.24(7), p.1551-1560, 2004.

MOTA-ORTIZ, S. R.; SUKIKARA, M. H.; FELICIO, L. F.; CANTERAS, N. S. Afferent connections to the rostromedial part of the periaqueductal gray: a critical region influencing the motivation drive to hunt and forage. **Neural Plast.**, v.2009, p. 1-11, 2009.

MOTA-ORTIZ, S. R.; SUKIKARA, M. H.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F.; BALDO, M. V.; FELICIO, L. F.; CANTERAS, N. S. The periaqueductal gray as a critical site to mediate reward seeking during predatory hunting. **Behav. Brain. Res.** , v.226, n.1, p.32-40, 2012.

NAKAMURA, T.; URAMURA, K.; NAMBU, T.; YADA, T.; GOTO, K.; YANAGISAWA, M.; SAKURAI, T. Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. **Brain Res.**, v.873, n.1, p.181-187, 2000.

NARITA, M.; NAGUMO, Y.; HASHIMOTO, S.; NARITA, M.; KHOTIB, J.; MIYATAKE, M.; SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; NAKAMACHI, T.; SHIODA, S.; SUZUKI, T. Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. **J. Neurosci.**, v.26, n.2, p.398-405, 2006.

ONGÜR, D.; NA, X.; PRICE, J. L. Prefrontal cortical projections to the hypothalamus in macaque monkeys. **J. Comp. Neurol.**, v.30, p.480-505, 1998.

PHILLIPS, A.G.; VACA, G.; AHN, S. A top-down perspective on dopamine, motivation and memory. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.58, p.322-339, 2008.

SAKUMA, Y.; PAFF, D. W. Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. **Am. J. Physiol**, v.237, p.278-84, 1979.

SAKOORI, K.; MURPHY, N. P. Maintenance of conditioned place preferences and aversion in C57BL6 mice: effects of repeated and drug state testing. **Behav. Brain Res.**, V.160, p. 34-43, 2005.

SAKURAI, T.; AMEMIYA, A.; ISHII, M.; MATSUZAKI, I.; CHEMELLI, R. M.; TANAKA, H.; WILLIAMS, S. C.; RICHARDSON, J. A.; KOZLOWSKI, G. P.; WILSON, S.; ARCH, J. R.; BUCKINGHAM, R. E.; HAYNES, A. C.; CARR, S. A.; ANNAN, R. S.; MCNULTY, D. E.; LIU, W. S.; TERRETT, J. A.; ELSHOURBAGY, N. A.; BERGSMA, D. J.; YANAGISAWA, M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. **Cell**, v.92, n.4, p.573-585, 1998.

SAKURAI, T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.8, p.171-181, 2010.

SCHOENBAUM, G.; ROESCH, M. Orbitofrontal cortex, associative learning, and expectancies. **Neuron.**, v.47, n.5, p.633-636, 2005.

SUKIKARA, M. H.; MOTA-ORTIZ, S. R.; BALDO, M. V.; FELÍCIO, L. F.; CANTERAS, N. S. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. **J. Neurosci.**, v.26, n.9, p.2583-2589, 2006.

SUKIKARA, M. H.; MOTA-ORTIZ, S. R.; BALDO, M. V.; FELICIO, L. F.; CANTERAS, N. S. The periaqueductal gray and its potential role in maternal behavior inhibition in response to predatory threats. **Behav. Brain Res.**, v.209, n.2, p.226-233, 2010.

SWASON, L. W. Brain Maps. Structure of the rat brain. 3. Ed. Amsterdam: **Elsevier**, 2004. 215 p.

SWANSON, L. W.; WATTS, G. C.; WATTS, A. G. Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/ orexin mRNA expression patterns in a new parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. **Neurosci. Letters.**, v.387, p.80-84, 2005.

THORPE, A. J.; KOTZ, C. M. **Orexin A in the nucleus accumbens stimulates feeding and locomotor activity.** Brain Res., v.1050, n.1-2, p.156-162, 2005.

TZSCHENTKE, T. M.; SCHMIDT, W. J. Discrete quinolinic acid lesions of the rat prelimbic medial prefrontal cortex affect cocaine- and MK-801-, but not morphine- and amphetamine-induced reward and psychomotor activation as measured with the place preference conditioning paradigm. **Behav. Brain. Res.** v.97(1-2), p. 115-127, 1998.

TZSCHENTKE, T. M.; SCHMIDT, W. J. Functional heterogeneity of the rat medial prefrontal cortex: effects of discrete subarea-specific lesions on drug-induced conditioned place preference and behavioural sensitization. **Eur. J. Neurosci.**, v. 11(11), p. 4099-4109, 1999.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S. Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. **Cereb. Cortex.**, v.10, n.3, p.318-325, 2000.

WHEELER, R. A.; CARELLI, R. M. Dissecting motivational circuitry to understand substance abuse. **Neuropharmacology**, v.56, s.1, p.149-159, 2009.

WINSKY-SOMMERER, R.; YAMANAKA, A.; DIANO, S.; BOROK, E.; ROBERTS, A.J.; SAKURAI, T.; KILDUFF, T.S.; HORVATH, T.L.; DE LECEA, L. Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. **J. Neurosci.**, v.24, n.50, p.11439-11448, 2004.