LUCIANO GONÇALVES

**ORGANIZAÇÃO DAS PROJEÇÕES DO CÓRTEX PRÉ-
FRONTAL PARA O NÚCLEO DORSAL DA RAFE
NO RATO**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas (Ciências Morfofuncionais).**

**São Paulo
2008**

LUCIANO GONÇALVES

**ORGANIZAÇÃO DAS PROJEÇÕES DO CÓRTEX PRÉ-
FRONTAL PARA O NÚCLEO DORSAL DA RAPE
NO RATO**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas.**

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

**São Paulo
2008**

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

© reprodução total

Gonçalves, Luciano.

Organização das projeções do córtex pré-frontal para o núcleo dorsal da rafe no rato / Luciano Gonçalves. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Maria Inês Nogueira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Neuroanatomia funcional.

Versão do título para o inglês: Organization of the projections from the prefrontal cortex to the dorsal raphe nucleus in the rat.

Descritores: 1. Córtex pré-frontal 2. Núcleo dorsal da Rafe 3. Rato 4. CTb 5. Traçador neuronal 6. Imunoistoquímica I. Nogueira, Maria Inês II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB123/2008

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Candidato(a): **Luciano Gonçalves**

Título da Dissertação: **Organização das projeções do córtex pré-frontal para o núcleo dorsal da rafe no rato.**

Orientador(a): **Maria Inês Nogueira**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado**

☐ **Reprovado**

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 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **079** nas fls. **33** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Maria Ines Nogueira, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Organização das projeções dos núcleos da rafe para o núcleo dorso medial do hipotálamo em rato: estudo de dupla marcação – CTb e 5HT**" do qual participou(arão) o(s) alunos **Luciano Gonçalves**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **22.06.2006**.

São Paulo, 23 de junho de 2006.

Profa. Dra. Marília C.L. Seelaender
Coordenadora -CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente CEEA – ICB/USP

Aos meus guerreiros e queridos pais Jerônimo Gonçalves e Luzia Braz Gonçalves pelo apoio e incentivo, não me deixando desencorajar, sempre oferecendo carinho, dedicação, competência e tempo para minha educação formal e informal.

A minha querida irmã Laís Aline Gonçalves, símbolo de sinceridade e personalidade.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A DEUS e à evolução.

À minha querida vovó Dolores por toda a simplicidade, respeito, preocupação e companheirismo desde os primeiros minutos da minha vida. Sinceramente, você é e sempre será o exemplo de vida de nossa família. Muito obrigado por você existir.

A toda a minha família que sempre me ofereceram apoio e energia durante toda a minha formação acadêmica.

Aos meus tios Lauro e Maria pela moradia concedida logo no início em 2005, época que ainda estava assustado com a minha “missão”. Com amor, carinho e dedicação, vocês conseguiram transmitir tranquilidade e muita energia. Eu amo vocês.

Aos meus tios Wilson e Tia Nena (ou Rosa Maria) pela moradia concedida durante um ano e três meses. Realmente fui tratado como se fosse filho de vocês; foram momentos marcantes que levarei para toda a minha vida. Muito obrigado por todo carinho e respeito. Eu amo vocês.

Aos meus primos Junior Negão e Sandro Beça pelo companheirismo e irmandade durante toda a minha vida. Muito obrigado por serem esses primos queridos.

Aos meus queridos amigos e professores Irinéia Paulina Baretta e Fausto Pierdoná Guzen pela confiança e incentivo em minha formação acadêmica. Vocês foram essenciais para toda alegria que sinto nesta fase importante da minha vida.

Ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo por todas as oportunidades que me foram concedidas para realização desta dissertação no Curso de Pós Graduação.

À minha orientadora Maria Inês Nogueira pela amizade, compreensão e permitir a realização do meu sonho. Muito obrigado pelos ensinamentos.

Aos professores Martin Andreas Metzger e Sara Joyce Shammah Lagnado pela importantíssima colaboração, ensinamentos e respeito durante todo o meu trabalho de mestrado. Muito obrigado por terem confiado em meus potenciais.

Aos professores Jackson Cioni Bittencourt e Carol Fuzeti Elias do Laboratório de Neuroanatomia Química pelos ensinamentos e espaço oferecido para realização dos procedimentos cirúrgicos e realização dos desenhos em câmera lúcida de meu trabalho.

Ao Newton Sabino Canteras, professor do Departamento de Anatomia da USP, pela paciência em discussões relacionadas ao meu estudo. Seus apontamentos sempre foram fundamentais.

Ao autêntico Anatomista Professor Edson Aparecido Liberti por participar na concretização de minha paixão em ensinar Anatomia Humana. Eu não tenho dúvidas que você foi e sempre será uma das pessoas mais sensacionais que conheci na minha vida. De fato, nenhuma pessoa é igual à outra, mas se todas conseguissem ter pelo menos a sua simplicidade, humildade e sinceridade, nossa comunidade científica estaria mais avançada. Admiro-lhe muito querido amigo. Muito Obrigado pelos ensinamentos.

À professora Silvia de Campos Boldrini, pessoa de muita personalidade, competência e respeito. Obrigado pelos ensinamentos. Admiro muito você.

Ao professor Renato Paulo Chopard pela paciência, ensinamentos e confiança. Conte sempre comigo.

Ao querido professor Richard Halti Cabral pelos ensinamentos e por seu comportamento amigo com todos os pós-graduandos.

Aos professores de Anatomia Humana da USP, Silvia de Campos Boldrini; Renato Paulo Chopard; Maria Inês Nogueira; Richard Halti Cabral; Newton Sabino Canteras; Luís Ronaldo Picosse e Edson Aparecido Liberti que durante muitas aulas de Anatomia, ofereceram-me confiança no papel de monitor dos alunos da graduação de Enfermagem, Farmácia, Fisioterapia, Fonoaudiologia, Terapia Ocupacional e Odontologia.

Aos funcionários do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Marcelo e Renaide e do Departamento de Anatomia, Renivaldo, Ricardo “Tevez”, Rodrigo e Fábio pelo exemplo de paciência e presteza.

Ao serviço da biblioteca e informação biomédica, em especial a diretora técnica Maria José de Jesus Carvalho da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da USP pela orientação exemplar na normalização e correção das referências de minha dissertação de mestrado.

A todos os funcionários dos setores de serviços gerais, guardas e secretários que direta ou indiretamente contribuíram para a correta e importante manutenção, proteção e administração do Departamento de Anatomia da USP.

Aos técnicos do didático, Adão, Amaro (*em memória*), Carlinhos, Edinho, Everton, Gil, Milton e Tim pela amizade, disponibilidade das peças e diversos momentos de descontração.

Aos amigos integrantes do Laboratório de Neurociências: Wilma Allemand; Leila Campos; Renata Vasconcelos; Renata Frazão; Luciana Pinato; Luiz Takase; Carmem; Cleyton; Vanderlei; Margareth; Silvia Honda; Paula; Paola e Renne.

À Mariana Silveira Matos, uma mulher sensacional que tem compartilhado momentos maravilhosos comigo. Agradeço sinceramente o carinho, incentivo, preocupação e por me transmitir tranquilidade em todos os momentos. “Rápido, intenso e verdadeiro”. Conhecer você só poderia ter sido sensacional.

À amiga de Umuarama Marcila Martins pelo carinho e por se prontificar a ajudar sempre em momentos difíceis. Conte sempre comigo.

A amiga Gisele Reisdorfer pela amizade e preocupação durante todo período de mestrado.

À queridíssima amiga Zuma pela preocupação, carinho e respeito desde o primeiro dia em que nos conhecemos. Você é especial.

Ao amigo e irmão Cristiano Mendes da Silva pela amizade e preocupação em me ajudar durante toda sua fase no laboratório. Admiro-te pela vontade em vencer na vida.

À amiga Sandra Lopes de Souza pela atenção e ensinamentos quando cheguei ao Laboratório de Neurociências.

Ao amigo e irmão Alexandre de Melo, um verdadeiro companheiro nos momentos de trabalho, mas também nos momentos de descontração. Você é uma pessoa sensacional.

Ao grande amigo Eduardo Beber pela amizade e sempre divertida convivência.

Aos meus amigos e irmãos Flávio Silva Tampelini, popular “PREGO” e Guilherme Cotomacci, popular “AURÉLIO, CHORUME OU COTO”. Queridos amigos, gostaria de agradecer, sinceramente todo o companheirismo durante toda a minha jornada aqui em São Paulo. Para mim é uma alegria e uma satisfação muito grande expressar todo o meu agradecimento a vocês que sempre nos momentos mais difíceis estiveram ao lado para me ajudar a decidir o melhor caminho que, aliás, não foi simples. Sou fã de carteirinha de vocês por serem pessoas companheiras, verdadeiras, simples e sonham em vencer na vida ensinando e transmitindo conhecimentos. Pelo grande respeito que temos entre ambos e por termos muita fé, acredito que em breve, ainda vamos trabalhar juntos como docentes. Sendo assim, vamos sempre juntos que “pegamos Tubarão”. Muito obrigado pelo respeito, preocupação e carinho. Contem sempre comigo!

Ao amigo e irmão, popular “TEVEZ”, essa pessoa brilhante, sempre alegre, brincalhona, competente, responsável, humilde e guerreiro para vencer na vida. Você é um gênio moleque.

À amiga e irmã Leila Maria Guissoni Campos por sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis, opinando e ajudando a decidir muitas dúvidas. Simplesmente quase tudo o que aconteceu comigo em 3 anos e meio relacionado ao meu trabalho ou não, você brilhou com suas opiniões. Afinal, situações incrivelmente difíceis é com você mesmo, símbolo de garra, não desiste nunca e sempre procura melhorar e aprimorar. Sou o seu fã número um. Conte sempre comigo.

À amiga e irmã Wilma Allemand, umas das pessoas mais incríveis e bondosas que conheci na vida. Você pode não ter noção, mas eu te amo do fundo do meu coração. Se alguém criou o espelho, meu espelho de vida é você. Guarde em sua memória querida “Wilminha”: se você precisar de um amigo irmão em qualquer situação fácil ou difícil, estarei sempre de braços

abertos para discutirmos muito, como sempre, até mesmo se for para almoçarmos no bandeirão e depois estender uma esteira (ou uma caixa de papelão) debaixo de uma árvore para eu deitar em seu colo e você fazer carinho de mamãe. Muito obrigado por você existir.

Aos amigos Willian e Josemberg pela amizade verdadeira, companheirismo, aprendizagem, simplicidade, humildade e sinceridade. Serei eternamente grato por terem ajudado em minha acolhida.

Aos amigos de outros laboratórios do Departamento de Anatomia pelo convívio, amizade e conversas durante esses anos: Amandinha; Ana Claudia; André Valério; Carlos; Cibele; Dorival; Fátima; Fernando; Flávia; Gisele; Isabela; José Donato; Juliana ou Renatinha; Leonardo Liberti; Lincoln; Marcelo Calderon; Márcia; Maria Tereza; Mateus; Maritza; Paulo; Pedro; Priscila; Regina; Ricardo; Rubia; Sandra; Simone; Thompson; Willian Bautz.

Aos amigos do laboratório de Neuroanatomia Funcional do departamento de Fisiologia e biofísica da USP pela amizade, companheirismo, discussões científicas e momentos de muitas alegrias: Aline; Aninha (A técnica mais extrovertida, habilidosa e atualizada do planeta – “Né Martin?”); Jozélia (sempre me ajudando a resolver os problemas); Leandro; Leonardo; Luiz; Marina; Nicolau; Tatiana e Wagner.

Às pessoas com quem divido moradia: Aline Silverol Carneiro e Luiz Machado Filho. Muito obrigado pelo carinho, atenção, preocupação, respeito e companheirismo em todos os momentos que vivemos juntos. Não tenho dúvidas que sou a pessoa mais sortuda por ter conhecido vocês e ainda por morar junto com vocês. Vocês são grandes irmãos. Contem sempre comigo.

Aos amigos “cruspianos”: Luiz; Aline; Vitão, Sandrinho; Jader; Prego; Leila; Iesus; Fabi; Suene; Renata; Paulão Pegada; Batavo; Kelly; Betão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo suporte financeiro durante meu trabalho de mestrado (06/53068-8).

Enfim, muito obrigado a todos!!!

"Tire o chapéu para o passado e arregace as mangas para o futuro. Tire de cada dificuldade que a vida lhe trazer a lição de que nada tem valor a não ser o que é conquistado"

Autor Desconhecido

Ser professor é professar a fé e a certeza de que tudo terá valido a pena se o aluno sentir-se feliz pelo que aprendeu com você e pelo que ele lhe ensinou...

Ser professor é consumir horas e horas pensando em cada detalhe daquela aula que, mesmo ocorrendo todos os dias, a cada dia é única e original...

Ser professor é entrar cansado numa sala de aula e, diante da reação da turma, transformar o cansaço numa aventura maravilhosa de ensinar e aprender...

Ser professor é importar-se com o outro numa dimensão de quem cultiva uma planta muito rara que necessita de atenção, amor e cuidado...

Ser professor é ter a capacidade de "sair de cena, sem sair do espetáculo..."

Ser professor é apontar caminhos, mas deixar que o aluno caminhe com seus próprios pés...

Autor Desconhecido

RESUMO

GONÇALVES, L. **Organização das projeções do córtex pré-frontal para o núcleo dorsal da rafe no rato.** 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O núcleo dorsal da rafe (DR) envia densas projeções para o prosencéfalo e está implicado em várias funções complexas. Muitos estudos indicam que a atividade neuronal do DR é controlada por neurônios do córtex pré-frontal (PFC). Devido à escassez de informações detalhadas sobre as conexões entre o PFC e o DR, objetivamos mapear sistematicamente as projeções do PFC para o DR. O traçador neuronal toxina colérica subunidade b (CTb) foi injetado nas diferentes partes do DR. Com técnica imunoistoquímica contra a CTb, células CTb-ir foram encontradas em maior escala no córtex polar frontal e na parede medial do PFC. No PFC lateral, o córtex da insula agranular dorsal, apresentou maior densidade de neurônios CTb-ir. No PFC orbital, o córtex orbital lateral e dorso-lateral eferentam principalmente a parte central do DR. Injeções situadas na parte caudal do DR resultaram em marcação atenuada. Os resultados indicam que o PFC envia robustas projeções para o DR de forma diferenciada. Através dessas projeções o PFC pode exercer um controle “*top down*” sobre os neurônios do DR.

Palavras-chave: Córtex pré-frontal; Núcleo dorsal da rafe; Imunoistoquímica; CTb; Traçador neuronal; Controle “*top down*”.

ABSTRACT

GONÇALVES, L. **Organization of the projections from the prefrontal cortex to the dorsal raphe nucleus in the Rat.** 85 p. 2008. Master Thesis (Morfo-Functional Sciences) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The dorsal raphe nucleus (DR) sends massive projections to the forebrain and is implicated in a variety of complex functions. Several studies indicate that neuronal activity in the DR is controlled by the prefrontal cortex (PFC). Since there is no detailed information about the projections from the PFC to the DR, the goal of the present study was to map these projections systematically. The neuronal tracer cholera toxin, subunit b (CTb) was injected at different levels of the DR. By immunohistochemical methods, CTb-ir cells were found highly enriched in the frontal polar cortex and in the medial wall of the PFC. In the lateral PFC, the dorsal lateral insular cortex presented the highest density of CTb-ir neurons. In the orbital PFC, the lateral and dorso-lateral orbital cortex project principally to the central segment of the DR. Injections in the caudal segment of the DR resulted in reduced CTb staining. Our results indicate that the PFC sends massive topographically organized projections to the DR, which may exert a “top down” control over neurons in the DR.

Key words: Prefrontal cortex; Dorsal raphe nucleus; Immunohistochemistry; CTb; Neuronal tracing; Top down control.

LISTA DE ABREVIÇÕES

2	Lóbulo cerebelar	IL	Córtex ínfra-límbico
3	Núcleo oculomotor	LO	Córtex orbital lateral
4	Núcleo troclear	lot	Trato olfatório lateral
5-HT	Serotonina	mlf	Fascículo longitudinal medial
5-HT _{1A}	Receptor serotoninérgico do tipo 1A	MnR	Núcleo mediano da rafe
5-HT _{2A}	Receptor serotoninérgico do tipo 2A	MO	Córtex orbital medial
ac	Comissura anterior	NeuN	<i>Vertebrate neuron-specific nuclear protein</i>
AC	Córtex do cíngulo anterior	NPY	Neuropeptídeo Y
Acb	Núcleo Accumbens	OT	Tubérculo olfatório
ACd	Córtex do cíngulo anterior dorsal	PAG	Substância cinzenta periaquedutal
ACTH	Adrenocorticotrofina	PBS	Tampão fosfato de sódio
ACv	Córtex do cíngulo anterior ventral	PFC	Córtex pré-frontal
AI	Córtex da ínsula agranular	PFCl	Córtex pré-frontal lateral
AId	Córtex da ínsula agranular dorsal	PFCm	Córtex pré-frontal medial
Alp	Córtex da ínsula agranular posterior	PFCo	Córtex pré-frontal orbital
AIv	Córtex da ínsula agranular ventral	PL	Córtex pré-límbico
AON	Núcleo olfatório anterior	PLd	Córtex pré-límbico dorsal
aq	Aqueduto cerebral	PLv	Córtex pré-límbico ventral
Cl	Claustro	PrCl	Córtex pré-central lateral
Cli	Núcleo caudal linear da rafe	PrCm	Córtex pré-central medial
CRF	Fator liberador de corticotrofina	S1	Córtex somato sensorial primário
CTb	Subunidade b da toxina colérica	SNC	Sistema Nervoso Central
CTb-ir	Células imunorreativas à subunidade b da toxina colérica	TTd	<i>Taenia tecta</i> dorsal
DA	Dopamina	vGluT1	Transportador vesicular de glutamato
DAB	Tetracloro de diaminobenzidina	VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
DI	Córtex da ínsula disgranular	VLO	Córtex orbital ventro-lateral
DLO	Córtex orbital dorso-lateral	VLPAG	Substância cinzenta periaquedutal ventro-lateral
DR	Núcleo dorsal da rafe	VO	Córtex orbital ventral
DRd	Componente dorsal do núcleo dorsal da rafe	VTa	Área tegmental ventral
DRl	Componente lateral do núcleo dorsal da rafe	VTg	Núcleo tegmental ventral
DRv	Componente ventral do núcleo dorsal da rafe	VTgP	Núcleo tegmental dorsal
DTgP	Núcleo tegmental dorsal	xscp	Decussação do pedúnculo cerebelar superior
FPI	Córtex polar frontal lateral		
FPm	Córtex polar frontal medial		
GABA	γ -aminobutírico		
GAD	Enzima para síntese de GABA		
GI	Córtex da ínsula granular		

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1</i> - Desenhos de cortes coronais do encéfalo do rato ao nível do PFC.....	20
<i>Figura 2</i> - Desenhos de cortes coronais do encéfalo do rato ao nível do DR.....	24
<i>Figura 3</i> - Desenhos feitos em câmara lúcida ilustrando a extensão ântero-posterior das injeções de CTb no DR.....	42
<i>Figura 4</i> - Fotomicrografias de campo claro ilustrando os centros das injeções de CTb nas partes rostral, central e caudal do DR, adjacentes a cortes reagidos para 5-HT, como controle dos locais de injeções.....	43
<i>Figura 5</i> - Exemplo de avaliação semi-quantitativa dos neurônios retrogradamente marcados no PFC após injeções de CTb no DR.....	49
<i>Figura 6</i> - Desenhos feitos em câmara lúcida representando a distribuição diferenciada de neurônios marcados retrógradamente após injeções de CTb nas partes rostral, central e caudal do DR.....	50
<i>Figura 7</i> - Fotomicrografias de campo claro ilustrando a marcação neuronal retrógrada em várias regiões do PFC após injeções de CTb no DR.....	58
<i>Figura 8</i> - Fotomicrografias de dupla imunofluorescência para CTb e NeuN ilustrando a distribuição laminar dos neurônios marcados retrógradamente no PFC.....	59
<i>Figura 9</i> - Diagrama geral de projeções do PFCm, PFCo e PFCl para as partes rostral, central e caudal do DR.....	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	<i>Córtex Pré-frontal</i>	19
1.1.1	<i>Morfologia</i>	19
1.1.2	<i>Funções</i>	21
1.2	<i>Núcleo Dorsal da Rafe – DR</i>	23
1.2.1	<i>Morfologia</i>	23
1.2.2	<i>Neuroquímica</i>	24
1.2.3	<i>Funções</i>	25
1.3	<i>Conexões entre o PFC e o DR</i>	26
1.3.1	<i>Projeções do DR para o PFC</i>	26
1.3.2	<i>Projeções do PFC para o DR</i>	28
2	OBJETIVOS	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	<i>Animais</i>	33
3.2	<i>Injeção de traçador neuronal retrógrado – CTb</i>	33
3.3	<i>Perfusão e Microtomia</i>	34
3.4	<i>Procedimentos Histológicos</i>	35
3.4.1	<i>Imunoperoxidase Simples – CTb</i>	35
3.4.2	<i>Imunoperoxidase Simples – 5-HT</i>	36
3.4.3	<i>Dupla Imunofluorescência – CTb/NeuN</i>	36
3.4.4	<i>Coloração pelo método de Nissl</i>	37
3.5	<i>Análises dos resultados e produções de imagens</i>	37
3.5.1	<i>Análises e produções de imagens dos sítios de injeções no DR</i>	38
3.5.2	<i>Análises, descrições e produções de imagens dos neurônios CTb-ir no PFC</i>	38
4	RESULTADOS	40
4.1	<i>Análises dos sítios de injeções no DR</i>	41
4.2	<i>Análises da marcação neuronal retrógrada no PFC</i>	44
4.2.1	<i>Córtex pré-frontal medial – PFCm</i>	44
4.2.2	<i>Córtex pré-frontal orbital – PFCo</i>	46
4.2.3	<i>Córtex pré-frontal lateral – PFCl</i>	48
5	DISCUSSÃO	61
5.1	<i>Considerações técnicas</i>	62
5.2	<i>Eferências do PFC para o DR</i>	63
5.3	<i>Considerações Funcionais</i>	66
5.3.1	<i>Influência do PFC sobre os neurônios do DR</i>	67
5.3.2	<i>Implicações Terapêuticas</i>	68
5.3.3	<i>Influência da 5-HT no PFC</i>	69
6	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Córtex Pré-frontal*

O córtex pré-frontal (PFC) de mamíferos tem sido classificado e descrito por diversos critérios anatômicos, como: fatores citoarquitetônicos (características agranular *versus* granular), (BRODMANN, 1909), conectividade com o núcleo talâmico médio-dorsal (KRETTEK e PRICE, 1977a; GROENEWEGEN, 1988; RAY e PRICE, 1992), aferências de fibras dopaminérgicas do mesencéfalo ventral ou ainda uma combinação desses padrões (THIERRY *et al.*, 1973; UYLINGS e VAN EDEN, 1990; WILLIAMS e GOLDMAN-RAKIC, 1998).

1.1.1 *Morfologia*

Citoarquiteticamente, de acordo com a descrição de Ray e Price (1992), (Fig. 1), no rato, o PFC está localizado ao longo do sulco rinal em sua maior parte ocupado pela área da ínsula agranular, que é subdividido rostralmente em córtex da ínsula agranular ventral (AIV) e córtex da ínsula agranular dorsal (AID) e caudalmente em córtex da ínsula agranular posterior (AIP). Rostral à área da ínsula agranular ventral e dorsal, muitas áreas orbitais ocupam a superfície inferior do pólo frontal, dorsal ao tubérculo olfatório (OT). Dentre estas, incluem o córtex orbital lateral (LO), córtex orbital ventro-lateral (VLO), córtex orbital ventral (VO) e córtex orbital medial (MO). Essas regiões são contínuas com o córtex ínfra-límbico (IL), córtex pré-límbico (PL) e córtex do cíngulo anterior (AC) na parede medial do hemisfério cerebral. Localizadas dorso-lateralmente ao AC está o córtex pré-central medial (PrCm) e o córtex pré-central lateral (PrCl).

Além dessas regiões, o córtex da ínsula disgranular (DI) Cechetto e Saper, (1987) e o córtex da ínsula granular (GI) são suplementares no PFC. O DI e o GI estão situados imediatamente dorsal ao AID. O DI é caracterizado primariamente por sua camada IV granular, menor que o GI, porém maior que no córtex da ínsula agranular (AI). Além disso, a camada II cortical é ampla e menos densa no DI que no AID (RAY e PRICE, 1992).

O AID é assim definido por situar-se rostral ao pólo frontal (KRETTEK e PRICE, 1977a). Entretanto, a parte rostral desta região difere do restante do AID em termos de suas conexões com o tálamo e de sua citoarquitetura. Por este motivo é apropriado considerar esta região do córtex orbital como córtex orbital dorso-lateral (DLO) ao invés de córtex insular. Esta área encontra-se imediatamente dorsal ao LO e se diferencia desta por sua II camada

cortical mais densa. O DLO é mais largo do que o AId e apresenta uma camada III estreita (RAY e PRICE, 1992).

No pólo frontal do hemisfério cerebral, a área rostral ao córtex pré-frontal medial (PFCm) e córtex pré-frontal orbital (PFCo) é referida como córtex polar frontal. Este pode ser subdividido em porções medial e lateral. O córtex polar frontal medial (FPM) substitui o MO, PL e AC e apresenta-se citoarquiteticamente semelhante ao PL. O córtex polar frontal lateral (FPL) é semelhante ao DLO em suas projeções tálamo-corticais e aparência citoarquitetônica. A principal característica de diferenciação do FPL para o DLO e LO restringe-se a camada II fina, que tende a ser interrompida por grupos de células. O FPL diferencia-se do FPM por uma II camada mais escassa e comprimida (RAY e PRICE, 1992).

Figura 1 - Desenhos de cortes coronais do encéfalo do rato ao nível do PFC. A figura A ilustra o encéfalo do rato nos planos: **I**: lateral, **II**: dorsal e **III**: orbital. A letra **B** na figura A, representa o Bregma e o retângulo delimitado em cinza claro indica a região do PFC, que está representada em 7 níveis em cortes coronais. **Escala figura A: 5 mm**. Adaptado de Gabbott *et al.* (2005) para figura A e Ray e Price (1992) para figuras 1-7. Consultar lista, para abreviações.

1.1.2 Funções

O PFC encontra-se no topo da hierarquia sensório-motora e destina-se na modulação de informações sensoriais oriundas principalmente de áreas associativas de todas as modalidades para a representação, planejamento e execução de tarefas complexas. Desta forma, as funções do PFC residem em seu envolvimento nos aspectos mais complexos da seleção, ordenação e sequência comportamental e no processo cognitivo (UYLINGS e VAN EDEN, 1990; FUSTER, 2001). Um dos mecanismos subjacentes a essas funções pode ser a capacidade do PFC em reter traços de memória de curta duração, referida como memória de trabalho (*“working memory”*), baseado nas informações do ambiente externo (GOLDMAN–RAKIC *et al.* 1990; GOLDMAN–RAKIC, 1995). O direcionamento do comportamento pelo PFC também está em alta dependência de traços de memória de longa duração, que são armazenadas em outras áreas do cérebro. Esse dado pode ser evidenciado pelas ricas conexões do PFC com o lobo temporal. Essa intercalação das conexões funcionais entre o PFC e o lobo temporal tem sido referida como, trabalhar com a memória (*“working with memory”*) (SCHACTER, 1994).

Além desse papel chave em planejamento e coordenação de tarefas complexas, o PFC tem sido associado a outras funções, incluindo: controle oculomotor, processos de atenção, atividades víscero-motoras, tomada de decisões, comportamento de objetivo direcionado e processamento da memória (KOLB, 1990; NEAFSEY, 1990; FUSTER, 2001; REPOVS e BADDELEY, 2006).

Algumas dessas funções têm sido relacionadas a distintas regiões do PFC. Com base em diversos critérios anatômicos, Berendse *et al.* (1992); Steketee (2003) sugeriram que existe uma subdivisão principal no PFCm dentro de um componente dorsal, que abrange o PrCm, AC e o córtex pré-límbico dorsal (PLd), e um componente ventral que abrange o córtex pré-límbico ventral (PLv), IL e MO. Assim, as regiões dorsais do PFCm (PrCm e AC), devido às ricas conexões com áreas corticais sensório-motoras e associativas têm sido implicadas em vários comportamentos motores, enquanto a região ventral do PFCm (IL e PL), devido às densas conexões com a amígdala, córtex temporal e outros córtices associativos límbicos tem sido associada com vários processos relacionados às emoções, cognição e à memória (HEIDBREder e GROENEWEGEN, 2003). Os resultados do estudo de Floyd e colaboradores, sobre projeções do PFC para a substância cinzenta periaquedutal (PAG), sugere que, diante de uma diferença dorso-ventral, existe também uma diferença rostro-caudal com relação às projeções do PFCm. Estes autores demonstraram que a parte rostral do PL, IL

e MO eferentam principalmente a substância cinzenta periaquedutal ventro-lateral (VLPAG), enquanto a parte caudal do PFCm eferenta predominantemente a parte dorso-lateral da substância cinzenta periaquedutal (DLPAG) (FLOYD *et al.*, 2000).

As regiões do córtex orbital estão envolvidas em grande escala com funções comportamentais, tais como, aspectos do processamento da gustação, associações de recompensa e eventos espaço-temporal (ONGUR e PRICE, 2000). Por outro lado, o córtex da ínsula está relacionado primariamente com funções víscero-sensoriais somáticas gerais e específicas (SAPER, 1982; CECETTO e CHEN, 1990; NEAFSEY, 1990; ALLEN *et al.*, 1991; YASUI *et al.*, 1991; ZHANG e OPPENHEIMER, 1997; WESTERHAUS e LOEWY, 2001; ALEKSANDROV e FEDOROVA, 2003). O AIp e regiões adjacentes, como o DI e GI estão diretamente envolvidas no processamento de informações cardiovasculares, cardiopulmonares e gastrointestinais, enquanto o AId e AIV estão envolvidos na gustação, olfação e processos víscero-sensoriais (REEP e WINANS, 1982a; REEP e WINANS, 1982b; SAPER, 1982; RUGGIERO *et al.*, 1987; ALLEN *et al.*, 1991; YASUI *et al.*, 1991; ZHANG e OPPENHEIMER, 1997; SHI e CASSELL, 1998).

A dopamina (DA) e a serotonina (5-HT) são os principais sistemas de neurotransmissores moduladores ascendentes no PFC (ROBBINS, 2000; PUIG *et al.*, 2004a; SEAMANS e YANG, 2004) que atuam sobre a rede de neurônios piramidais glutamatérgicos (MORIYAMA e YAMAMOTO, 2004) e um sistema de diferentes tipos mofo funcionais de inter-neurônios GABAérgicos (GABBOTT *et al.*, 1997). Funções importantes como a memória de trabalho dependem criticamente da estimulação apropriada de receptores dopaminérgicos do tipo D1 (SAWAGUCHI e GOLDMAN-RAKIC, 1991), e também de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (KESNER e DAKIS, 1997; MOGHADDAM *et al.*, 1997) e receptores serotoninérgicos do tipo 2A (WILLIAMS *et al.*, 2002). Várias doenças afetivas, como a esquizofrenia e a depressão têm sido associadas com a função pré-frontal anormal (ANDREASEN *et al.*, 1997; DREVETS *et al.*, 1997; ARANGO *et al.*, 2002; MELTZER *et al.*, 2003).

Estabelecido o envolvimento da 5-HT em alterações afetivas, como ansiedade, depressão e esquizofrenia, aliado ao conhecimento detalhado das projeções do PFC para o núcleo dorsal da rafe (DR) é de particular importância para compreender a pato-fisiologia e tratamento dessas alterações (CELADA *et al.*, 2001).

1.2 Núcleo Dorsal da Rafe – DR

Os grupamentos serotoninérgicos do sistema nervoso central (SNC) estão localizados principalmente ao longo da linha mediana no tronco encefálico, e devido a esta localização, são chamados de núcleos da rafe, os quais apresentam distintas denominações específicas e características morfológicas e funcionais. Basicamente, os núcleos da rafe podem ser considerados como complexo nuclear inferior ou caudal (B1 a B3) e em complexo nuclear superior ou rostral (B4 a B9). Os grupamentos B6 e B7 são classicamente conhecidos como núcleo dorsal da rafe. Entre os núcleos da rafe, o DR é considerado a principal fonte de projeções serotoninérgicas do prosencéfalo (JACOBS e AZMITIA, 1992; ABRAMS *et al.*, 2004; MICHELSEN *et al.*, 2007).

1.2.1 Morfologia

O DR no rato está localizado ao longo da linha mediana no tronco encefálico, na porção ventro-medial da PAG, na junção entre o mesencéfalo e a ponte. Baseado na distribuição de células imunorreativas para 5-HT ou de sua enzima precursora, triptofano hidroxilase, este núcleo pode ser subdividido em partes rostral (nível do núcleo troclear ou distante do bregma aproximadamente -7,30 mm), central (distante do bregma aproximadamente -8,00 mm) e caudal (distante do bregma aproximadamente -8,80 mm). Além dessas subdivisões, seu componente lateral é chamada de “asa lateral” do DR (DRl), bem desenvolvida ao nível da parte central do DR. Todos esses componentes podem ser subdivididos também em componentes ventral e dorsal (DRv e DRd) (STEINBUSCH, 1981; JACOBS e AZMITIA, 1992; PAXINOS e WATSON, 1998; PEYRON *et al.*, 1998; ABRAMS *et al.*, 2004; DAY *et al.*, 2004). A organização anatômica do DR está esquematizada na figura 2.

Figura 2 - Desenhos de cortes coronais do encéfalo do rato ao nível do DR: **A:** Parte Rostral, bregma aproximado -7,30 mm. **B:** Parte Central, bregma aproximado -8,00 mm. **C:** Parte Caudal, bregma aproximado -8,80 mm. As figuras A, B e C ilustram as partes ventral (Amarelo - DRv) e dorsal (Azul - DRd) do DR. Na parte central do DR, observa-se também a “asa lateral” (Cinza - DRl) do DR. **2:** lóbulo cerebelar; **3:** núcleo oculomotor; **4:** núcleo troclear; **CLi:** núcleo caudal linear da rafe; **mlf:** fascículo longitudinal medial; **xscp:** decussação do pedúnculo cerebelar superior; **VLPAG:** substância cinzenta periaquedutal ventro-lateral; **VTgP:** núcleo tegmental dorsal; **VTg:** núcleo tegmental ventral. Adaptado de Paxinos e Watson (1998).

1.2.2 Neuroquímica

Em humanos, estima-se que o DR é composto por aproximadamente 70 % de neurônios serotonérgicos (BAKER *et al.*, 1991). Estudo de caracterização morfológica e imunoistoquímica do DR em macaco ilustram que além da 5-HT, outros neurotransmissores, neuropeptídeos, enzima de síntese e proteínas ligantes de cálcio, participam na produção ou são produzidos no interior do DR, como a tirosina hidroxilase, GABA, substância P, calbindina-D28k, calretinina e parvalbumina (CHARARA e PARENT, 1998). No rato, o DR constitui um grupo celular grande com aproximadamente 40 % dos neurônios serotonérgicos do encéfalo, assim como considerável quantidade de células não serotonérgicas (VERTES, 1991; JACOBS e AZMITIA, 1992). Vários estudos demonstraram que o DR contém não apenas neurônios serotonérgicos, mas também neurônios que sintetizam outros neurotransmissores, tais como o ácido γ -aminobutírico (GABA), DA, glutamato (GAMRANI *et al.*, 1979; STRATFORD e WIRTSHAFTER, 1990; JACOBS e AZMITIA, 1992; DAY *et al.*, 2004) e neuropeptídeos, como o fator liberador de corticotrofina (CRF) (COMMONS *et al.*, 2003) e neurotensina (UHL *et al.*, 1979).

Além disso, o DR recebe aferências de vários neuropeptídeos, incluindo: β endorfinas (BLOOM *et al.*, 1978), substância P (SHULTS *et al.*, 1984), neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), galanina (EL KAFI *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 1994), colecistocinina (VANDERHAEGHEN *et al.*, 1980), adrenocorticotrofina (ACTH) (LEGER *et al.*, 1994) e CRF (KIRBY *et al.*, 2000; VALENTINO *et al.*, 2001).

Day *et al.* (2004) verificaram com estudo de dupla hibridização *in situ* em rato a distribuição topográfica de vários neuropeptídeos e neurotransmissores além de alguns receptores no DR. O estudo ilustra que neurônios serotoninérgicos e GABAérgicos estão distribuídos ao longo de toda sua extensão rostro-caudal, enquanto neurônios catecolaminérgicos estão geralmente restritos na parte rostral do DR. Além disso, foi verificado que ambos RNAm para receptores serotoninérgicos do tipo 1A (5-HT_{1A}) e adrenérgicos α_{1b} ADR estão altamente expressos por toda sua extensão, sendo que a grande maioria dos neurônios serotoninérgicos expressam ambos os receptores. Uma pequena porcentagem dos neurônios GABAérgicos também expressam RNAm para receptores 5-HT_{1A} e α_{1b} ADR. Poucas células catecolaminérgicas expressam RNAm para receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e adrenérgicos α_{1b} ADR. Com relação ao RNAm para receptores CRF-R1, foi encontrada pouca expressão no interior do DR, porém a análise de RNAm para receptores CRF-R2 foi principalmente expressa nas partes central e caudal do DR. Na porção central o RNAm para receptores CRF-R2 foi expresso exclusivamente em neurônios serotoninérgicos, enquanto na porção caudal, aproximadamente metade foram expressos em neurônios gabaérgicos. Essa distribuição variada de fenótipos neuroquímicos distintos sustenta a idéia da diferenciação topográfica e funcional do DR.

1.2.3 Funções

O DR tem sido implicado em grande variedade de funções comportamentais e fisiológicas, tais como, ciclo sono-vigília (JACOBS e AZMITIA, 1992; MONTI e JANTOS, 2006; URBAIN *et al.*, 2006), modulação da dor (WANG e NAKAI, 1994), modulação da frequência respiratória e pressão arterial (YU *et al.*, 2007), ansiedade, processamento da memória, ingestão alimentar (CARLINI *et al.*, 2004; MELONI *et al.*, 2008), estresse (LOWRY *et al.*, 2000; VALENTINO *et al.*, 2001; VALENTINO e COMMONS, 2005) e depressão (MICHELSEN *et al.*, 2007).

Várias características neuroanatômicas fazem do DR um núcleo diversificado funcionalmente. Primeiramente, este é o maior núcleo serotonérgico da rafe (VERTES, 1991; JACOBS e AZMITIA, 1992). Segundo, além de neurônios serotonérgicos, outros neurotransmissores e neuropeptídeos são sintetizados no DR. Esses neurônios, diversificados neuroquimicamente se relacionam com os neurônios serotonérgicos e alguns dos neuropeptídeos são co-localizados com neurônios serotonérgicos (CHARARA e PARENT, 1998; VALENTINO *et al.*, 2001; DAY *et al.*, 2004; VALENTINO e COMMONS, 2005). Terceiro, é um dos principais núcleos rostrais da rafe com projeções eferentes para várias regiões do prosencéfalo (VERTES, 1991; VERTES e KOCSIS, 1994; ABRAMS *et al.*, 2004; HOOVER e VERTES, 2007). Por fim, o DR recebe projeções de várias regiões do SNC (HAJÓS *et al.*, 1998; PEYRON *et al.*, 1998; VERTES, 2004; GABBOTT *et al.*, 2005; HOOVER e VERTES, 2007).

Considerando as densas distribuições de 5-HT pelo DR em várias regiões do SNC, é importante destacar que a 5-HT desempenha suas funções de acordo com o padrão diferenciado da distribuição de vários tipos e subtipos de receptores para a serotonina (HOYER *et al.*, 2002).

1.3 Conexões entre o PFC e o DR

Diversos estudos ilustram as projeções que envolvem o PFC e o DR. Como descrito anteriormente, o PFC e o DR do rato estão constituídos por várias sub-regiões distintas morfologicamente e funcionalmente. Além disso, o PFC pode ser diferenciado com base no variado padrão de projeções aferentes e eferentes estabelecido com áreas corticais, sub-corticais, como o estriado, tálamo, hipotálamo, amígdala e com vários núcleos do tronco encefálico, como o DR (KRETTEK e PRICE, 1977a; KRETTEK e PRICE, 1977b; BECKSTEAD, 1979; SESACK *et al.*, 1989; VERTES, 1991; RAY e PRICE, 1992; CONDE *et al.*, 1995; HAJÓS *et al.*, 1998; FLOYD *et al.*, 2001; VERTES, 2004; GABBOTT *et al.*, 2005; HOOVER e VERTES, 2007).

1.3.1 Projeções do DR para o PFC

Sabe-se que o PFC recebe densas projeções serotonérgicas, principalmente dos núcleos rostrais da rafe, DR e mediano (MnR) (AZMITIA e SEGAL, 1978; KOSOFISKY e

MOLLIVER, 1987; WILSON e MOLLIVER, 1991a; WILSON e MOLLIVER, 1991b; HOOVER e VERTES, 2007). Assim, Descarries *et al.* (1990) ilustram que o DR distribui maior quantidade de terminais serotoninérgicos por milímetro cúbico no córtex cerebral que outras regiões do encéfalo.

Entretanto, há um parcelamento diferenciado de projeções eferentes do DR, sendo a sua parte rostral aquela que mais densamente inerva estruturas telencefálicas, tais como as regiões do PFCm, PFCo, PFCl, em relação à sua parte caudal (VERTES, 1991). Investigação recente utilizando traçador neuronal retrógrado ilustra densas projeções do DR para o PrCm, AC, PL e IL (HOOVER e VERTES, 2007). Já, Reep e Winans (1982a) relataram as projeções do DR para o AIV e AId. Essas observações estão de acordo com a idéia de que diferentes regiões do DR podem influenciar a atividade neuronal em diferentes regiões PFC.

Embora esteja caracterizada a distribuição das aferências serotoninérgicas no PFC, a compreensão das relações funcionais da serotonina nessa região cerebral é ainda bastante limitada. Estudos de microscopia eletrônica demonstram que os axônios serotoninérgicos estabelecem principalmente sinapses assimétricas com neurônios GABAérgicos no PFCm (SMILEY e GOLDMAN-RAKIC, 1996). Porém, a incidência sináptica no PFC (SMILEY e GOLDMAN-RAKIC, 1996) e em outras áreas corticais (SÉGUELA *et al.*, 1989) geralmente é muito baixa, indicando que mecanismos de neurotransmissão volumétrica (FUXE *et al.*, 2005; AGNATI *et al.*, 2006) estão envolvidos nas ações da 5-HT. Para melhor compreensão das complexas ações da 5-HT no PFC, é importante retomar também que as ações serotoninérgicas no sistema nervoso central e periférico são mediadas por 7 diferentes famílias de receptores para 5-HT com 14 diferentes subtipos (HOYER *et al.*, 2002). Entre eles, os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e o tipo 2A (5-HT_{2A}) são os subtipos mais amplamente expressos no PFC (ASHBY *et al.*, 1994; MENGOD *et al.*, 1996; MINER *et al.*, 2003; AMARGÓS-BOSCH *et al.*, 2004; SANTANA *et al.*, 2004) e parecem exercer papel chave na mediação de funções serotoninérgicas no PFC.

Sabe-se que mecanismos serotoninérgicos no PFC estão envolvidos na fisiopatologia de enfermidades psiquiátricas graves, como a esquizofrenia e a depressão (ANDREASEN *et al.*, 1997; DREVETS *et al.*, 1997; STOCKMEIER, 1997; ARANGO *et al.*, 2002; MELTZER *et al.*, 2003). Porém, é controverso se o envolvimento da 5-HT nessas enfermidades ocorre através de alterações na síntese, estoque e liberação por terminais nervosos de 5-HT (LEONARD, 2000) ou a partir de efeitos mais complexos da 5-HT sobre outros sistemas de neurotransmissores (ABI-DARGHAM, 2007). Drogas antipsicóticas atípicas e antidepressivas atuam sobre o sistema serotoninérgico, mas também sobre outros sistemas de

neurotransmissores, como o glutamatérgico e dopaminérgico (KROETZE e ROTH, 1998, MELTZER *et al.*, 2003) dando evidências que esses sistemas de neurotransmissores devem ser estudados em conjunto e não de forma isolada (STEKETEE, 2003; MILLER e D'ESPOSITO, 2005; ROBBINS, 2005).

1.3.2 Projeções do PFC para o DR

As informações neuronais processadas pelo PFC são transmitidas para regiões sub-corticais predominantemente pelos neurônios piramidais localizados nas camadas profundas, V e VI do córtex. As camadas corticais V e VI se diferenciam-se principalmente a partir de seus padrões de projeções eferentes. Assim, a camada V envia projeções, principalmente para regiões sub-corticais, enquanto a camada VI envia projeções essencialmente para o tálamo (DE FELIPE e FARIÑAS, 1992; GABBOTT *et al.*, 2005; HOOVER e VERTES, 2007).

Estudos prévios usando traçadores retrógrados ou anterógrados demonstraram que diferentes partes do DR recebem projeções diferenciadas de várias áreas pré-frontais, incluindo as regiões do PFCm, PFCo e PFCl (REEP e WINANS, 1982b; PEYRON *et al.*, 1998; VERTES, 2004; GABBOTT *et al.*, 2005). Porém, a grande maioria desses trabalhos não investigou a organização sistemática dessas projeções. Assim, Hajós *et al.* (1998) e Peyron *et al.* (1998) verificaram que o IL e PD formam as principais fontes de projeções eferentes para o DR. Entretanto, Vertes (2004) demonstrou com traçador neuronal anterógrado, maior densidade de projeções do PL em comparação às projeções do IL para o DR. Estes dados são parecidos ao trabalho de Gabbott *et al.* (2005), porém com traçador neuronal retrógrado, demonstrando projeções do AC, PL, IL para o DR. Esses achados demonstram que as regiões dos componentes dorsal e ventral do PFCm do rato enviam projeções para o DR. Entre as regiões do PFCl, Reep e Winans (1982b) demonstraram as projeções do AIv e AId para o DR. Adicionalmente, evidências neuroanatômicas ilustram também projeções entre o PFC e os núcleos rostrais da rafe, em coelhos (BUCHANAN *et al.*, 1994) e macacos (CHIBA *et al.*, 2001). Embora as projeções do PFC para o DR tenham sido exploradas previamente, nenhum estudo apresenta essas projeções detalhadamente.

Além dos dados neuroanatômicos apresentados anteriormente, investigações recentes utilizando estimulação elétrica e farmacológica do PFC (CASANOVAS *et al.*, 1999; CELADA *et al.*, 2001; MARTÍN- RUIZ *et al.*, 2001; VARGA *et al.*, 2001; PUIG *et al.*, 2003) mostraram que as projeções glutamatérgicas do PFCm para o DR podem influenciar a

atividade de neurônios GABAérgicos e serotonérgicos do DR (JACOBS e AZMITIA, 1992; CELADA *et al.*, 2001). Assim as projeções do PFC para o DR podem atuar como um poderoso sistema de retroalimentação com que o PFC pode exercer um tipo de controle “*top down*” sobre os neurônios do DR.

Hajós *et al.* (1998) verificaram que a estimulação elétrica do PFCm, fonte direta de projeções glutamatérgicas para o DR, resulta em marcada inibição pós-estímulo em grande parte dos neurônios serotonérgicos do DR. Acredita-se que a inibição dos neurônios serotonérgicos do DR causada pela estimulação do PFCm possa ser modulada tanto por neurônios GABAérgicos (VARGA *et al.*, 2001) quanto pela liberação da própria serotonina no interior do DR (CELADA *et al.*, 2001). De forma oposta, outros estudos verificaram que a ativação farmacológica dos neurônios piramidais do PFCm resulta em aumento da atividade dos neurônios serotonérgicos e consecutiva liberação de 5-HT no PFCm (CASANOVAS *et al.*, 1999; CELADA *et al.*, 2001; MARTÍN-RUIZ *et al.*, 2001; PUIG *et al.*, 2003). Estudos de microscopia eletrônica evidenciaram que os efeitos descritos acima podem ser mediados diretamente ou indiretamente, mostrando que os terminais nervosos oriundos do PFC relacionam-se com dendritos e axônios de neurônios serotonérgicos e GABAérgicos nas diferentes partes do DR (JANKOWSKI e SESACK, 2004).

É importante destacar que o PFC também pode exercer, via projeções eferentes diretas, um controle “*top-down*” semelhante sobre neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral (VTA) (CARR e SESACK, 2000; GEISLER e ZAHM, 2005) e noradrenérgicos no locus coeruleus (LUPPI *et al.*, 1995; JODO e ASTON-JONES, 1997; JODO *et al.*, 1998). Essas áreas enviam proeminentes projeções dopaminérgicas (SWANSON, 1982) e noradrenérgicas (MORRISON *et al.*, 1979) para o PFC e assim modulam a atividade neuronal no PFC. Interessantemente, nenhuma outra área cortical envia projeções tão densas para os núcleos catecolaminérgicos e serotonérgicos no tronco encefálico do que o PFC.

Em conjunto, todos esses dados destacam a importância do sistema de controle “*top down*” do PFC sobre os neurônios no DR e outros núcleos subcorticais e faz imperativo de estudar essas alças de retro-alimentação em detalhes, o que constitui nossa proposta de estudo. Assim, a compreensão detalhada destes circuitos se torna necessária porque as alças de retro-alimentação entre o PFCm e o DR e entre o PFCm e a VTA têm sido implicados na patofisiologia de importantes disfunções, como a esquizofrenia e depressão, assim como na ação de drogas terapêuticas (PUIG *et al.*, 2004; BORTOLOZZI *et al.*, 2005; ABDARGHAM, 2007) e drogas de abuso (GONZÁLEZ-MAESO *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

Destacado a existência de densas conexões recíprocas entre o PFC e o DR, como um sistema de retro-alimentação e a escassez de informações detalhadas desse circuito neuronal, o presente trabalho objetiva:

- ✓ Mapear de forma sistemática as projeções das diversas regiões do PFC para as partes rostral, central e caudal do DR com técnicas de mapeamento retrógrado usando como traçador neuronal, a subunidade b da toxina colérica.
- ✓ Comparar nossos dados com a literatura e discutir as relatadas implicações funcionais e terapêuticas das relações recíprocas entre o PFC e DR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 42 ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) machos, adultos (50 – 55 dias), peso entre 160-220g, criados no Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas III – USP, com temperatura constante (23 °C), ciclo claro/escuro de 12/12h, início do claro às 7:00h e água *ad libitum*. Os procedimentos foram autorizados pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas – USP (protocolo CEEA nº. 079/2006) e seguem os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 Injeção de traçador neuronal retrógrado – CTb

Utilizamos como traçador neuronal retrógrado a subunidade b da toxina colérica (CTb) (*low salt*, List Biological Labs). O traçador foi injetado por meio de cirurgia estereotáxica como descrito adiante. As coordenadas foram obtidas no Atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (1998) e adaptadas com as seguintes coordenadas para injeção na parte rostral (AP: -7,0 mm; ML: 0,0 mm e DV: -5,4 mm), central (AP: -7,4 mm; ML: 0,0 mm e DV: -5,4 mm) e caudal (AP: -7,7 mm; ML: 0,0 mm e DV: -5,7 mm) do DR.

Inicialmente os animais foram sedados com associação anestésica preparada em água destilada (7,2 mL) com acepromazina (1,8 mL ou 10 % - Acepran, Univet), xilazina (4,5 mL ou 25 % - Rompum, Bayer) e Cetamina (4,5 mL ou 25 % - Dopalen, AgribRANDS do Brasil), anestesiados através de injeção subcutânea no volume de 0,2 mL para cada 100g de peso do animal. Após comprovado o grau de anestesia do animal, foi realizada tricotomia na região craniana, seguida pelo posicionamento do animal no estereotáxico (Kopf, Califórnia, USA). A cabeça do animal foi imobilizada por barras auriculares, posicionadas nos ductos auriculares e através da presilha nasal, presa aos incisivos superiores. A calota craniana foi exposta por incisão de aproximadamente 2 cm na superfície cutânea mediana e rebatida a pele que a recobre, seguido de afastamento dos tecidos subcutâneos aderidos na superfície óssea. Com auxílio de microscópio cirúrgico, dois pontos craniométricos foram identificados como referência: o Bregma e o Lambda. Para garantia de nivelamento do crânio no plano horizontal, foi medida a altura desses dois pontos e os ajustes foram feitos, evitando diferença superior a 0,2 mm entre ambos.

Após ajuste da coordenada ântero-posterior a partir do ponto craniométrico, Bregma, com auxílio de motor de suspensão com broca odontológica esférica, foi aberta janela para expor a superfície do encéfalo. O traçador foi injetado com micropipeta de vidro previamente

confeccionada em estirador de pipetas (Kopf-720, Califórnia, USA) e ponta feita com diâmetro interno entre 15 à 20 μm , preenchidas por capilaridade com solução de 1 % de CTb diluída em água destilada.

Após limpeza da superfície externa das pipetas, as injeções foram efetuadas por iontoforese, que consiste do depósito do traçador para o tecido utilizando corrente elétrica positiva pulsada de 5 μA (7/7) por aproximadamente 7 minutos (Stoelting-51590). Em seguida a pipeta foi mantida no local por 3 minutos com corrente negativa contínua de 2 μA para prevenir o escape do traçador ao longo da pipeta na remoção para o meio externo. Após isso, os tecidos foram limpos com solução salina, reposicionados e realizados a sutura da região operada. Para transporte do traçador no tecido nervoso, os animais permaneceram em período pós-operatório de 7 dias.

3.3 Perfusão e Microtomia

Para perfusão, os animais foram profundamente anestesiados com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral 35 % (Carlo Erba). Após comprovação do grau de profundidade da anestesia pelo pinçamento das patas, os animais foram posicionados na cuba de perfusão, imobilizados e perfundidos conforme procedimento usual do laboratório (NOGUEIRA *et al.*, 1997). Assim, os animais foram perfundidos, inicialmente, transcardiacamente, com 150 mL de solução salina 0,9 %, pH 7,4, em temperatura ambiente. Esta etapa teve como finalidade lavar o sistema circulatório do animal, prevenindo a formação de coágulos e possibilitando a correta penetração do fixador nos tecidos. Em seguida a fixação dos tecidos foi realizada com injeção de 350 mL de solução de paraformaldeído 4 % e borato de sódio com pH 9,5 a 4 °C durante 20 minutos em fluxo controlado.

Os encéfalos foram então retirados da caixa craniana, pós-fixados em solução fixadora mais sacarose 20 % durante 4h a 4 °C, e crio-protegidos em PB (tampão sódio fosfato, 0,1 M, pH 7,4 a 4 °C) mais sacarose 20 % durante 48 horas a 4 °C. Em seguida, os encéfalos foram seccionados no plano frontal em micrótomo de congelamento, na espessura de 40 μm . Os cortes foram coletados em 5 séries com 5 compartimentos cada e armazenados em congelador (-20 °C) em solução anti-congelante (20 % etilenoglicol, 30 % glicerol em PB) até o início dos procedimentos histológicos.

3.4 Procedimentos Histológicos

A primeira série coletada de cada animal foi processada com técnicas de imunoperoxidase simples contra a CTb. Para referência citoarquitetônica das regiões do PFC e o DR, a segunda série de cada animal foi processada com técnica histológica de coloração pelo método de Nissl. Para delimitação dos locais de injeções de CTb nas partes rostral, central e caudal do DR e visualização da inervação serotoninérgica do PFC, utilizamos cortes adjacentes da terceira série de cada animal ao nível do DR e PFC para realização de procedimento imunoistoquímico contra a 5-HT. Além disso, para uma avaliação confiável da distribuição laminar dos neurônios marcados retrogradamente, utilizamos alguns cortes da terceira série ao nível do PFC para realização de procedimento de dupla-imunofluorescência para NeuN (Chemicon, Temecula, CA), proteína expressa seletivamente em neurônios de vertebrados e CTb.

3.4.1 Imunoperoxidase Simples – CTb

Inicialmente os cortes foram lavados em PB e pré-tratados em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,3 % em PB e Triton X-100 a 0,3 % (Amresco) durante 30 minutos para inativação da peroxidase endógena. Após novas lavagens em PB até serem eliminadas as bolhas, os cortes foram incubados em solução PB mais Triton X-100 a 0,3 % (Amresco) mais soro normal de burro (Jakson Laboratories) a 3 % durante 1 hora para bloqueio da ligação dos anticorpos em sítios não específicos. Após esse período foi acrescentado à solução, o anticorpo primário (anti-CTb, feito em cabra, 1:50.000 - List Biological Labs) por aproximadamente 24 horas, em suave agitação à temperatura ambiente.

Após este período, os cortes foram lavados em PB e incubados em PB mais Triton X-100 a 0,3 % mais anticorpo secundário biotilado (feito em burro contra cabra, 1:1000, Vector Labs) durante 1 hora. Em seguida, os cortes foram lavados em PB para então serem incubados em complexo avidina-biotina (1:500 de cada proteína, Vectastain Kit Elite, Vector Labs, Burlingame, CA) durante 1 hora. Após novas lavagens em PB, os cortes foram reagidos em PB, contendo 0,03 % de H_2O_2 mais tetra cloreto de diaminobenzidina (DAB, 0,05 %, Sigma) como cromógeno. A reação foi interrompida com novas lavagens em PB. Os cortes foram montados sequencialmente em lâminas gelatinizadas e secos em temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas e desidratados em séries crescentes de alcoóis etílicos (50 % e

70 % - 3 minutos cada; 95 % - 6 minutos; 100 % - 9 minutos) seguidos de deslipidificação em xilol por 30 minutos. As lâminas foram cobertas com laminulas utilizando o DPX (BDH) como meio de montagem.

3.4.2 *Imunoperoxidase Simples – 5-HT*

Inicialmente os cortes foram pré-tratados em solução contendo 1 % do boro-hidreto de sódio (Sigma) mais PB, 0,1M durante 15 minutos. Após lavagens, os cortes foram incubados em PB, contendo 1 % de H₂O₂ e 10 % de álcool metílico durante 5 minutos. Após novas lavagens em PB, os cortes foram incubados em PB contendo 2 % de soro normal de cabra (Amersham) durante 30 minutos para bloqueio da ligação dos anticorpos em sítios inespecíficos. Após esse período os cortes foram lavados e incubados em solução contendo o anticorpo primário policlonal (anti-5-HT, feito em coelho, 1:80.000 - Immunostar), 1 % de soro normal de cabra e 0,4 % de Triton X-100 por aproximadamente 36 horas a 4 °C em agitação suave.

Após este período, os cortes foram lavados em PB e incubados durante 2 horas em PB contendo 1 % de soro normal de cabra mais anticorpo secundário biotilado (feito em burro contra coelho, 1:200, Amersham). Em seguida, os cortes foram novamente submetidos a lavagens em PB e incubados em PB contendo o complexo avidina-biotina (1:200 para cada proteína, Vectastain Kit Elite, Vector Labs, Burlingame, CA) durante 2 horas. Após novas lavagens em PB, os cortes foram reagidos em PB contendo 0,03 % de H₂O₂ mais DAB, 0,05 %, Sigma, como cromógeno. A reação foi interrompida com novas lavagens em PB. Os cortes foram montados sequencialmente em lâminas gelatinizadas, secos em temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas e desidratados em séries crescentes de alcoóis etílicos (50 % e 70 % - 3 minutos cada; 95 % - 6 minutos; 100 % - 9 minutos) seguidos de deslipidificação em xilol (30 minutos). As lâminas foram cobertas com laminulas utilizando o DPX (BDH) como meio de montagem.

3.4.3 *Dupla Imunofluorescência – CTb/NeuN*

Inicialmente os cortes foram lavados em PB e pré-tratados em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1 % em PB durante 15 minutos para inativação da peroxidase endógena.

Após novas lavagens em PB, os cortes foram incubados em PB mais Triton X-100 a 0,3 % e soro normal de burro (Jakson Laboratories) a 2 % durante 30 minutos para bloqueio da ligação dos anticorpos em sítios inespecíficos. Após esse período foi acrescentado à solução, o anticorpo primário (anti-CTb, feito em cabra, 1:10.000 - List Biological Labs) mais anticorpo primário (anti-NeuN, feito em camundongo, 1:750 - Chemicon) por aproximadamente 36 horas, em suave agitação a 4 °C.

Após este período, os cortes foram lavados em PB e incubados em PB com anticorpo secundário acoplado a fluoróforo Texas Red (feito em burro contra cabra, 1:200, Jackson) durante 1 hora. Em seguida, os cortes foram novamente submetidos a lavagens em PB e incubados em PB com 1 % de soro normal de burro mais anticorpo secundário acoplado a fluoróforo Alexa 488 (feito em burro contra camundongo, 1:500 – Molecular Probes) durante 1 hora. Após novas lavagens em PB, os cortes foram montados sequencialmente em lâminas gelatinizadas, cobertas com lamínulas, utilizando tampão glicerol como meio de montagem e armazenadas em refrigerador, protegidas da luz.

3.4.4 Coloração pelo método de Nissl

Este método de coloração utiliza a tionina (Fisher Scientific) como corante. De acordo com o protocolo de nosso laboratório, primeiramente foram realizadas lavagens nos cortes em PB, pH 7,4 seguida da montagem dos cortes em lâminas previamente gelatinizadas e secas em temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação dos cortes em concentrações crescentes de alcoóis, iniciando por 95 % durante 5 minutos; 100 % durante 15 minutos e deslipidificação em xilol durante 15 minutos. Os cortes foram então, reidratados em concentrações decrescentes de alcoóis etílicos de 100 %; 95 %; 70 % e 50 %, distribuídos em um total de 25 minutos, seguido de incubação em solução de tionina a 0,25 % durante 30 segundos, mergulhados em água destilada e novamente desidratados e deslipidificados na mesma seqüência descrita acima, sendo finalmente cobertos com lamínula, utilizando DPX como meio de montagem.

3.5 Análises dos resultados e produções de imagens

Todos os resultados foram analisados em microscópios Nikon e Leica, utilizando campo claro, campo escuro ou epifluorescência. As imagens foram digitalizadas utilizando

câmera (DXM 1200F – Nikon), acoplada a um computador com programa *Image Pro Plus 6.0*. Utilizamos desenhos esquemáticos feitos com a ajuda de câmera lúcida acoplada a um microscópio (Leica), digitalizados com scanner e editados com programa Canvas (*Professional Edition 9.0 – Deneba*). As pranchas com fotos e desenhos foram montadas utilizando-se os programas *Photoshop CS (Adobe)* e Canvas. Apenas o brilho, contraste e equilíbrio de cores foram ajustados (SAPER, 1999).

3.5.1 *Análises e produções de imagens dos sítios de injeções no DR*

Os limites das diferentes partes do DR analisados e desenhados em câmera lúcida após injeções do traçador neuronal CTb foram estabelecidas de acordo com o Atlas estereotático de Paxinos e Watson (1998) e série adjacente dos cortes de cada animal corada com tionina. Além disso, para controle dos locais de injeções no DR, realizamos procedimento de imunoistoquímica contra 5-HT em cortes adjacentes. Os desenhos e fotomicrografias tiveram como finalidade ilustrar os diferentes sítios de injeções nas partes rostral (W-19 e W-22), central (W-10 e W-20) e caudal (W-37 e W-42) do DR em seus correspondentes níveis distantes aproximados do Bregma.

3.5.2 *Análises, descrições e produções de imagens dos neurônios CTb-ir no PFC*

Os níveis (1 a 7) e regiões do PFC (FPm; PrCm; AC; PL; IL; MO; VO; VLO; LO; DLO; AIv; Aid) analisados, descritos e desenhados em câmera lúcida foram estabelecidos de acordo com descrição de Ray e Price (1992). Os valores distantes do Bregma do PFC foram desenhados ao longo do eixo ântero-posterior de acordo com o Atlas estereotático de Paxinos e Watson (1998), acompanhados com série adjacente dos cortes de cada animal corada com tionina.

Para descrição dos resultados da marcação neuronal retrógrada, subdividimos o PFC em componentes medial (PFCm), orbital (PFCo) e lateral (PFCI). As regiões de cada componente foram descritas separadamente, focando as diferenças encontradas em suas partes rostral, caudal, dorsal e ventral.

A análise semi-quantitativa da densidade dos neurônios imunorreativos a CTb (CTb-ir) em todos os casos foi baseada em padrão representativo da densidade de neurônios

retrogradamente marcados, classificado em 5 graus de densidades: muito intensa ++++; intensa +++; modesta ++; pequena + e ausente - (Fig. 5). A partir desta padronização, todas as análises feitas foram relatadas na tabela 1.

Os desenhos feitos em câmera lúcida do PFC foram representados esquematicamente em sete níveis diferentes distantes do Bregma, estabelecidos de acordo com descrição de Ray e Price (1992). Esta etapa teve como finalidade ilustrar e comparar o padrão diferenciado de marcação neuronal retrógrada no PFC após injeções de CTb nas partes rostral (W-19), central (W-20) e caudal (W-42) do DR. Além dos desenhos, as figuras 7 e 8 ilustram fotomicrografias de campo claro ou fluorescência os neurônios CTb-ir. A figura 9 demonstra esquematicamente um diagrama geral das projeções das regiões do PFCm, PFCo e PFCi para as partes rostral, central e caudal do DR.

4 RESULTADOS

Inicialmente apresentaremos a descrição dos locais de injeções CTb nos casos em que as injeções foram restritas nas diferentes partes do DR (Fig. 3 e 4). Em seguida, descreveremos a marcação neuronal retrógrada em todas as regiões do PFCm, PFCo e PFCl, de acordo com a padronização de análise semi-quantitativa (Fig. 5). Depois, apresentaremos desenhos esquemáticos (Fig. 6) para ilustrar o padrão diferenciado da marcação neuronal retrógrada no PFC nos casos de injeções centralizadas nas partes rostral (W-19), central (W-20) e caudal (W-42) do DR. Além disso, apresentaremos na tabela 1, o resumo a densidade de células marcadas retrogradamente após injeções de CTb nas partes rostral, central e caudal do DR. Por fim, as fotomicrografias ilustrando a marcação neuronal retrógrada no PFC e sua distribuição laminar cortical estão apresentadas nas figuras 7 e 8.

4.1 Análises dos sítios de injeções no DR

Para ajustes e acertos das coordenadas obtidas a partir do Atlas, utilizamos um total de 42 ratos, os quais 6 injeções foram centralizadas no DR. A partir delas, a marcação neuronal retrógrada no PFC foi estudada e descrita. As injeções consideradas restritas na parte rostral do DR foram: (W-19 e W-22), central (W-10 e W-20) e caudal (W-37 e W-42). A figura 3 evidencia a extensão ântero-posterior dos casos de injeções rostral (W-19), central (W-20) e caudal (W-42), os quais foram utilizados para ilustrar com desenhos feitos em câmera lúcida a marcação neuronal retrógrada no PFC (Fig. 6). As injeções rostrais e centrais apresentaram pequena sobreposição ao nível distante aproximado do Bregma -7,64 mm. Os centros das injeções rostral (W-22), central (W-10) e caudal (W-37) apresentaram centros de injeções muito semelhantes aos casos de injeções rostral (W-19), central (W-20) e caudal (W-42).

No caso W-19 a injeção foi restrita entre a região ventral e dorsal da parte rostral do DR. O halo da injeção preencheu a parte rostral do DR de forma a desenhá-lo em seus níveis distantes aproximados do Bregma. No caso W-22 a injeção foi centrada principalmente na região dorsal da parte rostral do DR. Neste caso houve pequena contaminação da VLPAG em seu antímero esquerdo. O caso W-10 apresentou injeção restrita na parte central do DR. O centro da injeção situou-se principalmente entre a região dorsal e ventral do DR, além de preenchimento da asa lateral do DR pelo halo da injeção. No caso W-20 a injeção também foi centrada na parte central do DR sem contaminações de outros núcleos. Nos casos W-37 e W-42, os centros das injeções foram restritos no componente dorsal da parte caudal do DR. Nestes casos as injeções foram menores que as injeções centradas nas partes rostral e central do DR. Os centros de injeções de todos os casos estudados estão ilustrados na figura 4, juntamente com cortes adjacentes para caracterização das partes do DR contra a 5-HT.

Figura 3 - Desenhos feitos em câmera lúcida ilustrando a extensão ântero-posterior das injeções de CTb no DR. **A:** Caso W-19. **B:** Caso W-20. **C:** Caso W-42. A marcação em cinza escuro indica o centro da injeção e a marcação em cinza claro indica o halo da injeção. **3:** núcleo oculomotor; **4:** núcleo troclear; **aq:** aqueduto cerebral; **mlf:** fascículo longitudinal medial; **CLi:** núcleo caudal linear da rafe; **xscp:** decussação do pedúnculo cerebelar superior; **PAG:** substância cinzenta periaquedutal; **VLPAG:** substância cinzenta periaquedutal ventro-lateral; **DR:** núcleo dorsal da rafe; **DRd:** parte dorsal do núcleo dorsal da rafe; **DTgP:** núcleo tegmental dorsal. Escala para todas as imagens: 1000 µm.

Figura 4 - Fotomicrografias de campo claro ilustrando os centros das injeções de CTb nas partes rostral (W-19, D e W-22, G), central (W-20, E e W-10, H) e caudal (W-42, F e W-37, I) do DR. As imagens A, B e C evidenciam uma reação imunoistoquímica contra 5-HT para controle dos limites do DR. **3:** núcleo oculomotor; **4:** núcleo troclear; **aq:** aqueduto cerebral; **mlf:** fascículo longitudinal medial; **CLi:** núcleo caudal linear da rafe; **xscp:** decussação do pedúnculo cerebelar superior; **PAG:** substância cinzenta periaquedutal; **VLPAG:** substância cinzenta periaquedutal ventro-lateral; **DR:** núcleo dorsal da rafe; **DRd:** parte dorsal do núcleo dorsal da rafe; **DTgP:** núcleo tegmental dorsal. **Escala para todas as imagens: 1000 μ m.**

4.2 Análises da marcação neuronal retrógrada no PFC

Células CTb-ir foram encontradas em todas as regiões do PFC, com maior intensidade na região rostral do PFC (FPm e FPl) e em sua parede medial, principalmente FPm, PLd e PLv IL e MO. Neurônios marcados retrogradamente foram observados em menor densidade nas regiões do PFCo e PFCl (Fig. 6, 7 e Tab. 1). A análise de cortes adjacentes corados com Nissl e principalmente a dupla marcação para CTb/NeuN mostraram que em quase todas as regiões do PFC, a grande maioria dos neurônios retrogradamente marcados situam-se na camada V do córtex, que é densamente inervada por fibras serotonérgicas (Fig. 8). Apenas nos níveis caudais (Bregma 1,70 mm) do PFC foram encontrados números consideráveis de neurônios CTb-ir na camada VI do PL, IL e ACv.

Em geral, as injeções de CTb centralizadas nas partes rostral e central do DR resultaram em marcação neuronal do PFC mais densa, quando comparada às injeções na parte caudal do DR. Injeções centralizadas na parte caudal do DR resultaram na maioria das áreas investigadas, em padrão semelhante aos casos de injeção nas partes rostral e central do DR, porém foi observada a ausência de marcação neuronal em algumas regiões como, no PrCm, VO e Alv (Fig. 6, 7 e Tab. 1).

4.2.1 Córtex pré-frontal medial – PFCm

Todas as regiões do PFCm apresentaram marcação neuronal retrógrada após injeções de CTb nas partes rostral e central do DR. O PrCm não apresentou marcação apenas nos casos de injeções situadas na parte caudal do DR. Os resultados ilustram claramente que o córtex polar frontal, PL e IL formam as principais fontes de projeções eferentes para as diferentes partes do DR (Fig. 6, 7 e Tab. 1).

➤ Córtex polar frontal

Após injeções de CTb nas partes rostral e central do DR, observamos padrão muito intenso de marcação neuronal retrógrada na região rostral do FPm e modesta em sua região caudal. O caso rostral W-19 apresentou menor marcação neuronal retrógrada do que o caso rostral W-22, porém com o mesmo predomínio de marcação no FPm, se comparado ao FPl. As duas injeções de CTb situadas na parte caudal do DR resultaram em modesta densidade de

neurônios CTb-ir na região rostral do FPM e ausente em sua região caudal. Na região do FPI observamos padrão intenso de marcação neuronal retrógrada nos casos rostrais W-19 e W-22 e central W-10 e W-20 e pequena marcação neuronal retrógrada nos casos caudais W-37 e W-42.

➤ ***Córtex pré-central medial – PrCm***

Após injeções de CTb nas partes rostral e central do DR, observamos pequena marcação neuronal retrógrada na região rostral do PrCm. Entre os casos de injeções caudais W-37 e W-42, nenhuma célula marcada retrogradamente foi encontrada na região rostral do PrCm. Além disso, nenhuma célula CTb-ir foi encontrada na região caudal do PrCm após injeções nas partes rostral, central e caudal do DR.

➤ ***Córtex do cíngulo – AC***

Na região rostral do ACd, observamos modesta marcação neuronal retrógrada após injeções nas partes rostral e central do DR e ausência de células CTb-ir nos casos de injeções caudais. Por outro lado, na região rostral do ACv, observamos concentração modesta e intensa de células CTb-ir nos casos de injeções rostral e concentração pequena nos casos de injeções nas partes central e caudal do DR. O ACv e ACd caudal apresentaram pequenas densidades de células marcadas retrogradamente em todos os casos de injeções estudados.

➤ ***Córtex pré-límbico – PL***

Após injeções de CTb nas partes rostral e central do DR, observamos padrão muito intenso de marcação neuronal retrógrada na região rostral do PL e padrão modesto nos casos de injeções caudais. Na região caudal do PL, apenas os casos de injeções de CTb na parte rostral do DR apresentaram padrão de marcação neuronal retrógrado muito intenso, entretanto nos casos de injeções de CTb nas partes central e caudal do DR resultou em padrão modesto de marcação neuronal retrógrado. Além disso, pequena diferença foi observada nos componentes dorsal e ventral do PL. O componente dorsal do PL apresentou padrão de marcação neuronal retrógrada intensa nos casos de injeções de CTb nas partes rostral e central do DR e padrão pequeno nos casos de injeções caudais. Por outro lado, o componente ventral do PL, ao nível do joelho do corpo caloso, apresentou padrão de marcação neuronal

retrógrada muito intensa, intensa e modesta nos casos de injeções de CTb nas partes rostral, central e caudal do DR respectivamente.

➤ *Córtex infra-límbico – IL*

A região rostral do IL apresentou marcação neuronal retrógrada modesta nos casos de injeções de CTb nas partes rostral, central e caudal do DR. Por outro lado, os resultados indicam que existe um padrão diferenciado de projeções do IL caudal para o DR. Desta forma, observamos que a região caudal do IL apresenta padrão de marcação neuronal retrógrada muito intensa nos casos de injeções de CTb na parte rostral do DR e padrão de marcação modesta nos casos de injeções nas partes central e caudal do DR.

4.2.2 *Córtex pré-frontal orbital – PFCo*

As principais diferenças de neurônios CTb-ir no PFCo, comparando injeções na parte rostral e central do DR, foram nas regiões do LO e DLO. O VO não apresentou marcação apenas nos casos de injeções na parte caudal do DR (Fig. 6, 7 e Tab. 1).

➤ *Córtex orbital medial – MO*

Os resultados indicam que os casos de injeções de CTb compreendendo as partes rostral e central do DR, resultam em padrão intenso de marcação neuronal retrógrada no MO em todas as regiões avaliadas. As injeções de CTb situadas na região caudal do DR resultaram em padrão modesto de marcação neuronal retrógrada no MO. De modo geral, os resultados indicam que o MO envia densas projeções para todas as partes do estudadas DR.

➤ *Córtex orbital ventral – VO*

O VO apresentou pequena densidade de neurônios CTb-ir apenas nos casos de injeções rostral W-22 e central W-10 e nenhuma marcação neuronal retrógrada nos casos de injeções rostral W-19 e central W-20 e caudais W-37 e W-42.

➤ ***Córtex orbital ventro-lateral – VLO***

Após injeções de CTb na parte rostral do DR, observamos modesta marcação neuronal retrógrada nas regiões rostrais do VLO. Por outro lado, nos casos de injeções nas partes central e caudal do DR, poucas células CTb-ir foram encontradas nas regiões rostrais do VLO. Entretanto, nenhuma célula CTb-ir foi encontrada nas regiões caudais do VLO após injeções nas partes rostral, central e caudal do DR, exceto no caso caudal W-37 que apresentou pequena marcação neuronal retrógrada.

➤ ***Córtex orbital lateral – LO***

Os resultados indicam que há um padrão diferenciado de marcação neuronal retrógrada no LO após injeções de CTb nas partes rostral, central e caudal do DR. Desta forma, em todos os níveis distante do Bregma avaliados, o LO apresentou densidade intensa de neurônios CTb-ir nos casos de injeções de CTb na parte central do DR, porém poucos neurônios marcados foram observados no LO após injeções de CTb nas partes rostral e caudal do DR.

➤ ***Córtex orbital dorso-lateral – DLO***

Entre as regiões do PFCo, o DLO também apresentou diferenças nas densidades de neurônios CTb-ir após injeções de CTb nas partes rostral, central e caudal do DR. Os resultados sugerem que o DLO apresenta maior densidade de projeções para a parte central do que para as partes rostral e caudal do DR. Desta forma, as injeções de CTb centralizadas na parte central do DR, resultaram em padrões modesto de marcação neuronal retrógrada na região rostral do DLO e muito intenso em sua região caudal. As regiões rostral e caudal do DLO apresentaram pequenas marcações neuronais retrógradadas após injeções de CTb na parte rostral do DR e, principalmente, ausência de marcação neuronal retrógrada nos casos de injeções de CTb na parte caudal do DR.

4.2.3 *Córtex pré-frontal lateral – PFCI*

Entre as regiões do PFCI, o AId apresentou maior densidade de neurônios CTb-ir, comparado ao AIv. De modo geral, os resultados indicam que o AId eferenta principalmente as partes rostral e central do DR. O AIv não apresentou marcação apenas nos casos de injeções na parte caudal do DR (Fig. 6, 7 e Tab. 1).

➤ *Córtex da ínsula agranular – AI*

No PFCI, neurônios CTb-ir foram encontrados principalmente nas regiões do AIv e AId. Após injeções de CTb nas partes rostral e central do DR, observamos que a região rostral do AIv apresenta densidade modesta de marcação neuronal retrógrada, porém, a região caudal do AIv não apresenta marcação neuronal retrógrada. As injeções centralizadas na parte caudal do DR resultaram em ausência de neurônios CTb-ir nas regiões rostral e caudal do AIv. Por outro lado, nas regiões rostral e caudal do AId, identificamos densidade intensa de marcação neuronal retrógrada após injeções de CTb centralizadas nas partes rostral e central do DR e, principalmente, ausência de marcação nos casos de injeções na parte caudal do DR.

Figura 5 - Exemplo da análise semi-quantitativa dos neurônios retrogradamente marcados no PFC após injeções de CTb no DR . Padrões adotados de marcação neuronal retrógrada: muito intenso ++++; intenso +++; modesto ++; pequeno + e ausente -. **Escala para todas as imagens: 300 µm.**

Nível 1

W-19
4,70 mm

W-20
4,70 mm

W-42
4,70 mm

Figura 6 - Desenhos feitos em câmera lúcida representando a distribuição diferenciada de neurônios CTb-ir após injeções de CTb nas partes rostral (W-19), central (W-20) e caudal (W-42) do DR. Cada prancha representa um nível diferente do PFC, 1 à 7 de acordo com descrição de Ray e Price (1992). Os níveis distantes aproximados do Bregma estão de acordo com o Atlas estereotático de Paxinos e Watson (1998). A figura ilustrada no canto superior esquerdo representa uma vista medial do encéfalo do rato e o ponto "O" (zero) indica o Bregma. Cada ponto identificado representa um neurônio CTb-ir. Ver Tab. 1. Consultar lista, para abreviações.

Nível 2

W-19
4,20 mm

W-20
4,20 mm

W-42
4,20 mm

Figura 6 - Continuação.

Nível 3

W-19
3,70 mm

W-20
3,70 mm

W-42
3,70 mm

Figura 6 - Continuação.

Nível 4

W-19
3,20 mm

W-20
3,20 mm

W-42
3,20 mm

Figura 6 - Continuação.

Nível 5

W-19
2,70 mm

W-20
2,70 mm

W-42
2,70 mm

Figura 6 - Continuação.

Nível 6

W-19
1,70 mm

W-20
1,70 mm

W-42
1,70 mm

Figura 6 - Continuação.

Nível 7

W-19
1,60 mm

W-20
1,60 mm

W-42
1,60 mm

Figura 6 - Continuação.

Tabela 1 - Densidade de neurônios marcados retrogradamente após injeções de CTb nas partes rostral (W-19 e W-22), central (W-10 e W-20) e caudal (W-37 e W-42) do DR. A tabela ilustra as regiões do PFC, conforme descrição de Ray e Price (1992). **R:** rostral; **C:** caudal; **D:** dorsal; **V:** ventral. Padrões adotados de marcação retrógrada: muito intenso +++++; intenso ++++; modesto ++; pequeno + e ausente -. Ver Fig. 6. Consultar lista, para abreviações.

Regiões do PFC		Casos de Injeções no DR					
		Rostral		Central		Caudal	
		W-19	W-22	W-10	W-20	W-37	W-42
FPm	R	+++	++++	++++	++++	++	++
	C	++	++	++	++	-	-
FPI		++	+++	+++	+++	+	+
PrCm	R	+	+	+	+	-	-
	C	-	-	-	-	-	-
ACd	R	++	++	++	++	-	-
	C	+	+	+	+	+	+
ACv	R	+++	++	+	-	+	+
	C	+	+	+	+	+	+
PL	R	++++	++++	++++	++++	++	++
	C	++++	++++	++	++	+	++
	D	+++	+++	+++	+++	+	+
	V	++++	++++	+++	+++	++	++
IL	R	++	++	++	++	++	++
	C	++++	++++	++	++	++	++
MO		+++	+++	+++	+++	++	++
VO		-	+	+	-	-	-
VLO	R	++	++	+	+	-	+
	C	-	-	-	-	+	-
LO		+	+	+++	+++	+	+
DLO	R	+	+	++	++	-	+
	C	+	-	++++	++++	-	-
AIv	R	++	++	++	++	-	-
	C	-	-	-	-	-	-
AId	R	+++	+++	+++	+++	-	+
	C	+++	+++	+++	+++	-	-

Figura 7 - Fotomicrografias de campo claro ilustrando a marcação neuronal retrógrada em várias regiões do PFC após injeções de CTb no DR. O número identificado em cada imagem representa o nível aproximado do Bregma, de acordo com o Atlas estereotático de PAXINOS e WATSON (1998). A imagem G representa em maior aumento a característica morfológica de neurônios piramidais imatureativos a CTb na região do PL (seta preta). FPM: Córtex polar frontal medial; FPI: Córtex polar frontal lateral; PL: Córtex pré-límbico; IL: Córtex infra-límbico; MO: Córtex orbital medial; VO: Córtex orbital media; VLO: Córtex orbital dorso-lateral; LO: Córtex orbital lateral; DLO: Córtex orbital dorso-lateral; AIv: Córtex da ínsula agranular ventral; AId: Córtex da ínsula agranular dorsal; cc: corpo caloso. **Escala para imagem A: 1000μm; imagens B-F: 500 μm e imagem G: 50 μm.**

Figura 8 - Fotomicrografias de imunofluorescência para CTb e NeuN ilustrando a distribuição laminar dos neurônios marcados retrogradamente na camada V do PL (A e B). A imagem C ilustra a distribuição de fibras serotoninérgicas no PFC, capturada em campo escuro. M: medial; D: dorsal; V: ventral; L: lateral. I – VI: camadas do córtex. **Escala para todas as imagens: 300 μ m.**

Figura 9 - Diagrama geral das projeções do PFCm, PFCo e PFCl para as partes rostral (A), central (B) e caudal (C) do DR. As cores vermelha, verde, azul, roxo e laranja representam respectivamente a padrão de marcação neuronal retrógrada muito intenso, intenso, modesto, pequeno e ausente. Esquema baseado em análises feitas após injeções de CTb no DR. Consultar lista para abreviações.

5 DISCUSSÃO

5.1 Considerações técnicas

A eficiência da técnica de injeções iontoforéticas do traçador neuronal CTb a 1 % foi confirmado nas eferências do PFC para o DR. Segundo Luppi *et al.* (1990), a injeção por iontoforese possibilita maior precisão do local de injeção em comparação ao método de injeção por pressão. Assim, a técnica de injeção por iontoforese mostrou-se eficaz para injeções de CTb no DR e poucos problemas ocorreram no decorrer das diversas injeções feitas, a não ser pelas dificuldades em acertar as diferentes partes do DR sem contaminar os núcleos adjacentes. Em alguns casos não ocorreu depósito do traçador, provavelmente devido à obstrução da pipeta ao entrar em contato com o seio sagital superior ou tecido nervoso. Em nosso material observamos que nos casos escolhidos para a análise da marcação retrógrada no PFC, os depósitos de CTb foram centralizados e de tamanho adequado nas partes rostral, central e caudal do DR, comparado com a caracterização do DR em cortes adjacentes reagidos contra 5-HT. O diâmetro da pipeta entre 15 e 20 μm e o tempo de injeção entre 5 e 7 minutos foram eficazes nas injeções descritas. Além disso, a intensidade e intervalo da corrente utilizada foram adequados, pois apresentou adequado depósito do traçador, sem causar necrose no tecido (LUPPI *et al.* 1990).

A CTb não conjugada a outros traçadores apresenta-se como um eficiente e sensível traçador neuronal retrógrado que possibilita injeção iontoforética restrita, lesando minimamente o tecido. Além disso, ao contrário do que foi afirmado por Chen e Aston-Jones (1995), Luppi *et al.* (1990) relatam que a CTb não é captada e transportada por fibras de passagem intactas. Em nosso trabalho, acreditamos que a CTb não foi captada e transportada por fibras de passagem de modo a interferir nos resultados de marcação neuronal retrógrada no PFC. Uma grande vantagem da utilização da CTb não conjugada é a de permitir estudos de dupla marcação (LUPPI *et al.*, 1987; LUPPI *et al.*, 1988; LUPPI *et al.*, 1990). Neste sentido, sugerimos que outros estudos sejam realizados para análise de co-localização sobre neurônios marcados retrogradamente.

Apesar da comprovada eficiência como traçador neuronal retrógrado, a CTb também vem sendo utilizada como traçador anterógrado, principalmente para investigar as projeções da retina (LU *et al.*, 1999; FRAZÃO *et al.*, 2008). Observamos poucas fibras marcadas anterogradamente em algumas regiões encefálicas. Contudo, essa pequena marcação neuronal anterógrada não dificultou o estudo da marcação neuronal retrógrada no PFC.

A técnica de imunoperoxidase simples utilizada neste trabalho foi adequada e eficiente para visualização da CTb e 5-HT, portanto descartamos qualquer tipo de

intensificação da imunomarcção. Além disso, a técnica de dupla imunofluorescência contra CTb/NeuN nos possibilitou precisa interpretação da marcação neuronal retrógrada principalmente nos neurônios piramidais da camada V do córtex.

5.2 Eferências do PFC para o DR

Os resultados do presente trabalho indicam que as partes rostral, central e caudal do DR recebem aferências de todas as regiões dos componentes medial, orbital e lateral do PFC ao longo de seu eixo ântero-posterior, distribuídas de forma heterogênea. Destacamos as densas projeções da região rostral do PFC (FPm e FPl) e sua parede medial, principalmente FPm, PLd e PLv IL e MO para todas as partes do DR estudadas. As principais áreas do PFC que se projetam para a parte rostral do DR foram: FPm, PL, IL, MO e Aid, central do DR: FPm, PL, IL, MO, LO, DLO e Aid e caudal do DR: FPm, PL, IL e MO.

Diante dos achados encontrados no presente estudo, chamamos especial atenção quando comparamos nossos dados com a literatura prévia sobre conexões entre o PFC e DR (SESACK *et al.*, 1989; HURLEY *et al.*, 1991; TAKAGISHI e CHIBA, 1991; BUCHANAN *et al.*, 1994; HAJÓS *et al.*, 1998; PEYRON *et al.*, 1998; CHIBA *et al.*, 2001; VARGA *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2003; JANKOWSKI e SESACK, 2004; VERTES, 2004; GABBOTT *et al.*, 2005). Em geral, os nossos resultados corroboram nitidamente com os principais resultados apresentados nesses trabalhos. Entretanto alguns importantes aspectos dos nossos achados não ainda não foram descritos. Vale ressaltar que a discussão dos dados de projeções do PFC para o DR foi baseada em estudos realizados em ratos, embora existam evidências destas projeções em outras espécies de mamíferos, como coelhos (BUCHANAN *et al.*, 1994) e macacos (CHIBA *et al.*, 2001).

Trabalhos como de Hajós *et al.* (1998) demonstram com a utilização de injeção de traçador neuronal retrógrado e anterógrado por pressão e iontoforese, projeções do ACv, PL, IL e PD, com predomínio de projeções do componente ventral (IL e PD) do PFCm para o DR. De modo geral, esses autores não identificaram as partes do DR, se rostral, central ou caudal que recebem estas projeções. Além disso, o estudo dos neurônios do PFC que se projetam para o DR foi avaliado apenas ao nível distante do Bregma 2,70 mm, não sendo possível a comparação das projeções em diferentes níveis do PFC para o DR. Hajós *et al.* (1998) verificaram a marcação neuronal retrógrada nas camadas superficiais e profundas do PFCm. Entretanto, em nosso trabalho, verificamos que a grande maioria dos neurônios

retrogradamente marcados situam-se principalmente na camada V do PFC, resultados parecidos com o trabalho de mapeamento laminar detalhado de Gabbott *et al.* (2005).

Peyron *et al.* (1998), após injeções por iontoforese de traçador neuronal CTb nos componentes dorsal, ventral e lateral da parte central do DR, e também sua parte rostral, observaram marcação neuronal retrógrada no AC, IL, PD, córtex orbital e AI de forma heterogênea. Porém, neste estudo, os autores descreveram os resultados de marcação neuronal retrógrada no PFC apenas em três níveis distantes do bregma e não estudou as projeções do PFC para a parte caudal do DR. Além disso, neste mesmo trabalho de Peyron *et al.* (1998) as injeções de CTb centralizadas no componente lateral do DR apresentaram ampla contaminação do componente dorsal e ventral do DR e da VLPAG, regiões que também recebem densas projeções de todas as regiões do PFC (HURLEY *et al.*, 1991; FLOYD *et al.*, 2000). Ainda, verificamos que injeção centralizada no componente ventral da parte central do DR no trabalho de Peyron *et al.* (1998) mostrou-se semelhante à nossa injeção central, compreendendo os componentes dorsal e ventral da parte central do DR. Neste caso, observamos padrão de marcação neuronal retrógrada similar nas regiões do PFC, comparando os dois trabalhos. Por outro lado, nos casos de injeções centralizadas na parte rostral do DR, apesar dos resultados mostrarem-se semelhantes, em nosso estudo, observamos em geral, maior densidade de neurônios CTb-ir em todas as regiões do PFC investigadas.

Com de técnicas de mapeamento retrógrado e anterógrado, Lee *et al.* (2003) também estudaram as projeções do PFCm para os componentes dorsal, ventral, asa lateral e parte caudal do DR. Os casos de injeções de traçador neuronal retrógrado centralizados nas diferentes partes do DR resultaram em marcações neuronais retrógrada semelhantes, principalmente na parede medial do PFC (PL, IL e PD), além de menores marcações neuronais retrógrada no córtex da ínsula e córtex orbital. Vale ressaltar que o caso de injeção 19 do trabalho de Lee *et al.* (2003), preenchendo o componente dorsal e ventral da parte caudal do DR resultou em padrão de marcação neuronal retrógrada semelhante à injeção na parte caudal do DR do nosso estudo, porém nossa injeção preencheu principalmente o componente dorsal da parte caudal do DR. Os resultados de marcação neuronal retrógrada, comparando os dois trabalhos, foram semelhantes, com predomínio de marcação na parede medial do PFC. Embora as injeções centralizadas em diferentes componentes do DR tenham sido restritas, sem contaminações de regiões adjacentes, Lee *et al.* (2003) não estudaram o padrão diferenciado de marcação neuronal retrógrada em diferentes níveis e sub-regiões do PFC.

Após injeção de traçador neuronal retrógrado no DR em seu nível aproximado do Bregma -7,80 mm, Gabbott *et al.* (2005) investigaram a distribuição de neurônios marcados retrogradamente em diversas regiões do PFC: PrCm, ACd, PL, IL, córtex orbital, AIv, AId. Estes autores verificaram predomínio de marcação nas regiões do PFCm (ACd, PL e IL) e PFCI (AIv e AId). A marcação neuronal retrógrada na região do PFCo não foi representada. Em nosso estudo, as injeções de CTb no DR, centralizadas ao nível aproximado do Bregma - 8,00 mm, resultaram em marcação neuronal retrógrada no PFC similar ao trabalho de Gabbott *et al.* (2005), porém na região do PrCm e ACd, observamos respectivamente, quantidade pequena e modesta de densidade de neurônios CTb-ir. Além disso, ao contrário do que foi relatado por Gabbott *et al.* (2005), observamos neurônios marcados retrogradamente em outras regiões do PFCo (MO, VO, VLO, LO, DLO) com padrão diferenciado de marcação neuronal retrógrada.

É importantíssimo destacar que nenhum dos trabalhos citados acima analisou a marcação no córtex polar frontal, região onde encontramos em nosso estudo padrão muito intenso de marcação retrógrada. O córtex polar frontal do rato tem sido pouco explorado morfológicamente e funcionalmente. Neste sentido, estudos relacionados devem explorar esta região em detalhes. O FPM é uma continuação rostral das regiões MO, PL e ACd com uma citoarquitetura semelhante ao PL (RAY e PRICE, 1992). Estudos de ressonância magnética em humanos indicam que o córtex pré-frontal está envolvido em complexas funções de memória de trabalho e, em particular na integração de processos encefálicos subordinados dentro da memória de trabalho (KOECHLIN *et al.*, 1999; BRAVER e BONGIOLATTI, 2002). Ainda, destacamos em nosso estudo os padrões parecidos de marcações neuronais retrógradas no PFC após injeções de CTb nas partes rostral e central do DR, enquanto os casos de injeções centralizadas no componente dorsal da parte caudal do DR apresentaram marcações neuronais retrógradas atenuadas, ou até mesmo ausência de marcações em algumas regiões, como no PrCm, VO e AIv.

Além dos estudos investigando as projeções do PFC para o DR com traçadores retrógrados existem vários estudos gerais sobre as eferências do PFC utilizando técnicas de mapeamento anterógrado que confirmam essas projeções. Sesack *et al.* (1989), utilizando traçador neuronal anterógrado, não relataram projeções do PrCm e ACd para o DR e as projeções do MO e IL não ficaram bem esclarecidas, porém relataram projeções do componente médio do PL, entre seu componente dorsal e ventral (caso P364) para os núcleos dorsal, mediano, magno, pálido e obscuro da rafe sem destacar suas partes e padrões diferenciados de projeções. Além disso, outros estudos verificaram as projeções eferentes das

regiões rostral e caudal do IL para o DR, porém de modo geral, sem identificar suas partes (HURLEY *et al.*, 1991; TAKAGISHI e CHIBA, 1991). Lee *et al.* (2003) ilustraram após injeções de traçador anterógrado que as partes rostral, central e caudal do DR recebem densas projeções eferentes do PL e IL, sem identificar seus níveis. Por outro lado, Vertes (2004), utilizando traçador neuronal anterógrado, relata que o PL e IL apresentam, respectivamente, densas e pequenas projeções para o DR, sem identificar as partes do DR que recebem estas projeções. Além disso, Reep e Winans (1982b) demonstraram que o AId apresenta maiores projeções que o AIv para o DR.

Estudos de microscopia eletrônica combinando o uso de traçador anterógrado com imunoistoquímica para GABA e 5-HT indicaram que as fibras oriundas do PFCm formam contatos sinápticos principalmente com dendritos e axônios de neurônios GABAérgicos no DR (VARGA *et al.*, 2001, JANKOWSKI e SESACK, 2004). Porém, uma minoria das fibras contata também neurônios serotonérgicos formando sinapses clássicas ou justaposições sem sinapses detectáveis (JANKOWSKI e SESACK, 2004). Esses estudos claramente indicam que as projeções oriundas do PFCm podem influenciar diretamente ou indiretamente a atividade dos neurônios serotonérgicos no DR.

Considerando a existência de robustas projeções do PFC para o DR (HAJÓS *et al.*, 1998; PEYRON *et al.*, 1998; VERTES, 2004; GABBOTT *et al.*, 2005) e do DR para o PFC (REEP e WINANS, 1982a; VERTES, 1991; HOOVER e VERTES, 2007), podemos dizer que esses dois centros formam um importante circuito recíproco que exerce retroalimentação principalmente por projeções glutamatérgicas do PFC para o DR e serotonérgicas do DR para o PFC.

5.3 Considerações Funcionais

Atualmente, têm sido muito explorado e discutido as regiões ou núcleos do SNC que apresentam conexões recíprocas com os núcleos de origem de sistemas de neurotransmissores do tronco encefálico. O PFC é uma das poucas regiões do encéfalo que não apenas recebe, mas também envia robustas projeções para grupos de células dopaminérgicas, noradrenérgicas, colinérgicas e serotonérgicas do tronco encefálico (SESACK *et al.*, 1989; HURLEY *et al.*, 1991; SEMBA e FIBIGER, 1992; LUPPI *et al.*, 1995; JODO e ASTON-JONES, 1997; HAJÓS *et al.*, 1998; JODO *et al.*, 1998; GABBOTT *et al.*, 2005; GEISLER e ZAHM, 2005; HOOVER e VERTES, 2007). Os dados do presente trabalho demonstram

extensivas projeções de várias regiões do PFC para diferentes partes do DR de forma detalhada, o que reforça a idéia de retroalimentação envolvendo o PFC e o DR.

Além dos dados neuroanatômicos apresentados previamente, investigações recentes combinando métodos de estimulação elétrica e experimentos farmacológicos indicam que o PFC apresenta importante influência sobre os neurônios do DR (HAJÓS *et al.*, 1998; CASANOVAS *et al.*, 1999; CELADA *et al.*, 2001; MARTÍN- RUIZ *et al.*, 2001; VARGA *et al.*, 2001; PUIG *et al.*, 2003; AMARGÓS-BOSCH *et al.*, 2004).

5.3.1 Influência do PFC sobre os neurônios do DR

Hajós *et al.* (1998); Celada *et al.* (2001); Varga *et al.* (2001) demonstraram que os neurônios serotonérgicos do DR são principalmente inibidos após a estimulação elétrica do PFCm. Os autores sugerem que esses efeitos são causados primariamente pela excitação inicial glutamatérgica modulada por receptores ionotrópicos glutamatérgicos (NMDA e AMPA/KA) sobre neurônios serotonérgicos, que induzem um aumento na liberação de serotonina no interior do DR, responsável pela auto-inibição de outros neurônios serotonérgicos por receptores 5-HT_{1A}. Além disso, a estimulação de inter-neurônios GABAérgicos no interior do DR inibe os neurônios serotonérgicos via receptores GABA_A. Isto sugere que há menor liberação de 5-HT em suas estruturas alvo, inclusive no PFC. Esses dados indicam que a estimulação elétrica dos neurônios piramidais do PFCm resulta principalmente em inibição da atividade dos neurônios serotonérgicos do DR. Por outro lado, a estimulação farmacológica dos neurônios piramidais do PFCm causa aumento da atividade dos neurônios serotonérgicos e consequente liberação de 5-HT no PFCm (CASANOVAS *et al.*, 1999; CELADA *et al.*, 2001; MARTÍN-RUIZ *et al.*, 2001; PUIG *et al.*, 2003).

Algumas hipóteses parecem explicar os efeitos opostos encontrados após a estimulação elétrica e farmacológica do PFCm sobre a atividade neuronal do DR. Assim, Varga *et al.* (2001) propõem que os neurônios piramidais do componente ventral do PFCm, especialmente IL, inervam principalmente inter-neurônios GABAérgicos no interior do DR, o que resultaria em inibição indireta dos neurônios serotonérgicos do DR. Entretanto, a estimulação farmacológica parece ser a técnica mais confiável, pois sua ação é restrita a distintas populações de neurônios que expressam tipos específicos de receptores e assim atuam na modulação de diferentes circuitos neuronais ou gliais.

5.3.2 Implicações Terapêuticas

O conhecimento detalhado das conexões recíprocas entre o PFC e o DR pode fornecer a base para uma melhor compreensão dos complexos processos fisiopatológicos envolvidos em algumas disfunções importantes do sistema nervoso. Atualmente é muito discutido o envolvimento do sistema serotoninérgico em enfermidades psiquiátricas graves, como a esquizofrenia (ANDREASEN *et al.*, 1997; AGHAJANIAN e MAREK, 2000; MELTZER *et al.*, 2003) e a depressão (DREVETS *et al.*, 1997; MANJI *et al.*, 2001; ARANGO *et al.*, 2002). O envolvimento do sistema serotoninérgico na fisiopatologia dessas enfermidades foi proposto porque, atualmente, as drogas mais usadas no tratamento da esquizofrenia, como as drogas antipsicóticas atípicas (MELTZER *et al.*, 2003; ROTH *et al.*, 2004) e no tratamento da depressão, como os antidepressivos tricíclicos e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (BERTON e NESTLER, 2006), agem, pelo menos, parcialmente no sistema serotoninérgico.

Os mecanismos de ação das drogas antipsicóticas atípicas são extremamente complexos e envolvem além do sistema serotoninérgico, outros sistemas de neurotransmissores, como o dopaminérgico e o glutamatérgico (SEEMAN, 2002; ROTH *et al.*, 2004). Esses achados reforçam as teorias atuais sobre a esquizofrenia, que não apenas dão importância no envolvimento de fatores genéticos, como também no desequilíbrio do balanceamento dos sistemas dopaminérgicos e glutamatérgicos do PFC (hipofunção) e estriado (hiperfunção) estão criticamente envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia (CARLSSON *et al.*, 2001; HARRISSON e WEINBERGER, 2005; WINTERER e WEINBERGER, 2005; LARUELLE *et al.*, 2005). Apesar de muitas investigações sobre o assunto, poucas alterações específicas foram descritas no sistema serotoninérgico de esquizofrênicos (ABI-DARGHAM, 2007). Porém, muitas pesquisas indicam um importante papel modulador serotoninérgico na neurotransmissão dopaminérgica (MELTZER *et al.*, 2003; PUIG *et al.*, 2004; ROTH *et al.*, 2004; ABI-DARGHAM, 2007). Nesse sentido, alças de retro-alimentação entre o PFC e a VTA e a alça entre o PFC e o DR apresentada neste trabalho, constitui um substrato neural implicado nas complexas ações das drogas antipsicóticas atípicas (BORTOLOZZI *et al.*, 2005; PEHEK *et al.*, 2006).

5.3.3 Influência da 5-HT no PFC

A densa inervação serotoninérgica no PFC oriunda do DR (AZMITIA e SEGAL, 1978; KOSOFSKY e MOLLIVER, 1987; WILSON e MOLLIVER, 1991a; WILSON e MOLLIVER, 1991b; HOOVER e VERTES, 2007), por si só, não explica as altamente complexas funções desempenhadas pela 5-HT no PFC. Estas dependem também da neuroquímica dos neurônios pós-sinápticos e dos tipos dos receptores de 5-HT presentes no PFC. Com relação aos alvos pós-sinápticos, Smiley e Goldman-rakic (1996), em estudo realizado com macacos, puderam observar, com técnica de microscopia eletrônica, que os inter-neurônios do PFC são os principais alvos das sinapses serotoninérgicas e apenas uma pequena porcentagem (8 %) de fibras serotoninérgicas relacionam-se diretamente com dendritos de neurônios piramidais. As sinapses serotoninérgicas com inter-neurônios e neurônios piramidais são predominantemente assimétricas, e assim, supostamente excitatórias. Porém, Séguela *et al.* (1989), Smiley e Goldman-Rakic (1996) retratam que a incidência sináptica serotoninérgica no PFC é muito baixa, indicando que os mecanismos de neurotransmissão volumétrica (FUXE *et al.*, 2005; AGNATI *et al.*, 2006) estão envolvidos nas ações da 5-HT.

Com relação aos receptores de 5-HT, notavelmente os tipos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} são altamente expressos em todas as regiões do PFCm (MENGOD *et al.*, 1996; CORNEA-HÉBERT *et al.*, 1999; AMARGÓS-BOSCH *et al.*, 2004) e apresentam importantes influências moduladoras sobre sua atividade neuronal (ASHBY *et al.*, 1994). A ativação dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} parecem causar efeitos opostos na atividade dos neurônios piramidais do PFCm. Nesse sentido, vários estudos combinando a técnica de microdiálise e registros eletrofisiológicos verificaram que a administração local de drogas agonistas para os receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) no PFCm diminui a atividade dos neurônios piramidais do PFCm, enquanto a administração local de droga agonista para os receptores 5-HT_{2A} (DÓI-dimetoxianfetamina) aumenta a atividade dos neurônios piramidais (CASANOVAS *et al.*, 1999; CELADA *et al.*, 2001; MARTÍN-RUIZ *et al.*, 2001; PUIG *et al.*, 2003). Ainda, estudos eletrofisiológicos *in vitro* (ZHOU e HABLITZ, 1999) e *in vivo* (AMARGÓS-BOSCH *et al.*, 2004) descrevem tanto respostas excitatórias quanto inibitórias da 5-HT sobre a atividade dos neurônios piramidais do PFC.

Interessantemente, estudo de dupla hibridização *in situ* revelou que 60 % dos neurônios no PFCm de ratos e camundongos expressam RNAm para receptores 5-HT_{1A} e/ou 5-HT_{2A}, com alto grau de co-expressão em aproximadamente 80 % dos neurônios (AMARGÓS-BOSCH *et al.*, 2004). Santana *et al.* (2004) verificaram com técnica de dupla

hibridização *in situ* para GAD (enzima para síntese de GABA) e 5-HT_{1A} e GAD/5-HT_{2A}, assim como para vGluT1 (transportador vesicular de glutamato, marcador específico de neurônios glutamatérgicos) e 5-HT_{2A} e vGluT1/5-HT_{2A}, que aproximadamente 25 % dos neurônios GABAérgicos do PFC e cerca de 60 % dos neurônios glutamatérgicos expressam os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}. Em humanos e macacos, Almeida e Mengod (2007) demonstraram com a técnica de dupla hibridização *in situ* para vGluT1/5-HT_{2A} que aproximadamente 100 % dos neurônios piramidais da camada V do PFC expressam o receptor do tipo 5-HT_{2A}. Em conjunto, esses dados sugerem que as eferências do PFC originadas da camada V para estruturas sub-corticais, inclusive as investigadas no presente estudo para o DR, são glutamatérgicas e podem ser efetivamente moduladas por receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}.

Nesse sentido, vários estudos verificaram com técnica de microdiálise associada a registros eletrofisiológicos que a infusão local de drogas agonistas/antagonistas para receptores 5-HT_{1A}/5-HT_{2A} no PFCm pode ativar ou inibir a atividade dos neurônios serotoninérgicos no DR (MARTÍN-RUIZ *et al.*, 2001) e dopaminérgicos na VTA (BORTOLOZZI *et al.*, 2005; PEHEK *et al.*, 2006) e, subsequente, a liberação desses neurotransmissores no PFC. Assim, foi mostrado que a infusão de agonistas do receptor 5-HT_{2A} no PFCm aumenta a liberação de glutamato na VTA e dopamina no PFCm (BORTOLOZZI *et al.*, 2005; PEHEK *et al.*, 2006), enquanto esse efeito é abolido com infusão de antagonistas do receptor 5-HT_{2A} (PEHEK *et al.*, 2001; PEHEK *et al.*, 2006). O fato que a administração local dos agonistas e antagonistas no PFC indicam, claramente, que esses efeitos são mediados por neurônios do PFC que expressam receptores do tipo 5-HT_{2A}. Além disso, corroborando ainda mais com os estudos já descritos, Metzger *et al.*, (2007) demonstraram que a grande maioria dos neurônios da camada V do PFC que projetam para a VTA, expressa o receptor 5-HT_{2A}.

Infusão de drogas antipsicóticas atípicas como a clozapina e olanzapina no PFCm também aumentam a liberação de dopamina no PFC (GESSA *et al.*, 2000; ICHIKAWA *et al.*, 2001; DÍAZ-MATAIX *et al.*, 2005). Esse efeito parece paradoxal, numa primeira análise, já que trata-se de antagonistas do receptor 5-HT_{2A}. Porém, Ichikawa *et al.* (2001) e Díaz-Mataix *et al.* (2005) demonstraram que além de receptores do tipo 5-HT_{2A}, os receptores do tipo 5-HT_{1A} também estão envolvidos nesse efeito.

Em conjunto, esses dados claramente destacam a importância das alças de retro-alimentação existentes entre o PFC e os centros subcorticais como o DR e a VTA e indicam que a atividade neuronal no DR e na VTA pode ser controlada de maneira “*top-down*” pelo

PFC. Esse mecanismo de controle “*top-down*” do PFC sobre a atividade dos neurônios da VTA e DR é atualmente muito discutido por estar envolvido nas ações de drogas antipsicóticas atípicas (PUIG *et al.*, 2004; BORTOLOZZI *et al.*, 2005; ABI-DARGHAM, 2007) e drogas alucinógenas como ácido lisérgico (LSD) e DÓI (GONZÁLEZ-MAESO *et al.*, 2007). Recentemente foi demonstrado com elegantes experimentos em animais “*knockout*” do receptor 5-HT_{2A}, seguido de sua reativação seletiva no PFCm, que as ações das drogas alucinógenas LSD e DÓI dependem criticamente de receptores 5-HT_{2A} intactos no PFC e do controle “*top-down*” do PFC sobre centros subcorticais (GONZÁLEZ-MAESO *et al.*, 2007). Adicionalmente, Béïque *et al.* (2007) verificaram com experimentos eletrofisiológicos e farmacológicos em fatias do PFC, que os neurônios piramidais da camada V do PFCm, em particular, apresentam papel chave na mediação dos efeitos dessas drogas alucinógenas.

6 CONCLUSÕES

1. O PFC envia robustas projeções para as partes rostral, central e caudal do DR e todas as regiões do PFC contribuem de forma heterogênea para essas projeções.
2. As injeções centradas nas partes rostral e central do DR apresentaram um padrão de marcação neuronal retrógrada semelhante em quase todas as regiões do PFC, enquanto as injeções situadas na parte caudal do DR resultaram em marcação atenuada.
3. A região do córtex polar frontal contribui extensivamente com projeções para as partes rostral, central e caudal do DR e apresentou consistentemente maior quantidade de neurônios retrogradamente marcados que as regiões caudais do PFC.
4. A marcação retrógrada no PFC medial foi notavelmente maior, comparado as regiões orbitais e laterais do PFC. As maiores fontes de projeções da parede medial do PFC para o DR foram o PL e IL.
5. Entre as regiões do PFC orbital, o LO e DLO formam as principais fontes de projeções para a parte central do DR.
6. Entre as regiões do PFC lateral, o AId apresenta maior densidade de projeções para o DR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABI-DARGHAM, A. Alterations of serotonin transmission in schizophrenia. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 78, p. 133-64, 2007.
- ABRAMS, J.K.; JOHNSON, P.L.; HOLLIS, J.H.; LOWRY, C.A. Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1018, p. 46-57, 2004.
- AGHAJANIAN, G. K.; MAREK, G. J. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. **Brain Res. Rev.**, v. 31, p. 302-312, 2000.
- AGNATI, L. F.; LEO, G.; ZANARDI, A.; GENEDANI, S.; RIVERA, A.; FUXE, K.; GUIDOLIN, D. Volume transmission and wiring transmission from cellular to molecular networks: history and perspectives. **Acta Physiol.**, v. 187, n. 1-2, p. 329-44, 2006.
- ALEKSANDROV, V.G.; FEDOROVA, K.P. Structure of the insular region of the rat neocortex, *Neurosci. Behav. Physiol.*, v. 33, p. 199-202, 2003.
- ALLEN, G. V.; SAPER, C. B.; HURLEY, K. M.; CECETTO, D. F. Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 311, p. 1-16, 1991.
- ALMEIDA, J.; MENGOD, G. Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic neurons expressing 5-HT(2A) receptors in human and monkey prefrontal cortex. **J. Neurochem.**, v. 103, n. 2, p. 475-86, 2007.
- AMARGÓS-BOSCH, M.; BORTOLOZZI, A.; PUIG, M. V.; SERRATS, J.; ADELL, A.; CELADA, P.; TOTH, M.; MENGOD, M.; ARTIGAS, F. Co-expression and *in vivo* interaction of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 14, p. 281-299, 2004.
- ANDREASEN, N. C.; O'LEARY, D. S.; FLAUM, M.; NOPOULOS, P.; WATKINS, G. L.; BOLES-PONTO, L. L.; HICHTWA, R. D. Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naive patient. **Lancet**, v. 349, p. 1730-1734, 1997.
- ARANGO, V.; UNDERWOOD, M. D.; MANN, J. J. Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. **Prog. Brain Res.**, v. 136, p. 443-453, 2002.
- ASHBY, C. R. Jr.; EDWARDS, E.; WANG, R. Y. Electrophysiological evidence for a functional interaction between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat medial prefrontal cortex: an iontophoretic study. **Synapse**, v.17, p. 173-181, 1994.

*De acordo com:

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

AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 179, p. 641-668, 1978.

BAKER, K. G.; HALLIDAY, G. M.; HORNUNG, J. P.; GEFFEN, L. B.; COTTON, R. G.; TÖRK, I. Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. **Neuroscience**, v. 42, n. 3, p. 757-75, 1991.

BECKSTEAD, R. M. An autoradiographic examination of cortico-cortical and subcortical projections of the mediodorsal projection (prefrontal) cortex in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 184, p. 43-62, 1979.

BÉIQUE, J. C.; IMAD, M.; MLADENOVIC, L.; GINGRICH, J. A.; ANDRADE, R. Mechanism of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor-mediated facilitation of synaptic activity in prefrontal cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 23, p. 9870-5, 2007.

BERENDSE, H. W.; GALIS-DE GRAAF, Y.; GROENEWEGEN, H. J. Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 316, p. 314-47, 1992.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, n. 2, p. 137-51, 2006.

BLOOM, F.; BATTENBERG, E.; ROSSIER, J.; LING, N.; GUILLEMIN, R. Neurons containing beta-endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: Immunocytochemical studies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, p. 1591-1595, 1978.

BORTOLOZZI, A.; DÍAZ-MATAIX, L.; SCORZA, M. C.; CELADA, P.; ARTIGAS, F. The activation of 5-HT receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. **J. Neurochem.**, v. 95, n. 6, p. 1597-607, 2005.

BRAVER, T. S.; BONGIOLATTI, S. R. The role of frontopolar cortex in subgoal processing during working memory. **Neuroimage**, v. 15, n. 3, p. 523-36, 2002.

BRODMANN, K. **Vergleichende lokalisationslehre der grosshirnhinde**. Leipzig: Barth, 1909.

BUCHANAN, S. L.; THOMPSON, R. H.; MAXWELL, B. L.; POWELL, D. A. Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit. **Expl. Brain Res.**, v. 100, p. 469-483, 1994.

CARLINI, V. P.; VARAS, M. M.; CRAGNOLINI, A. B.; SCHIOTH, H. B.; SCIMONELLI, T. N.; DE BARIOGLIO, S. R. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 313, p. 635-641, 2004.

CARLSSON, A.; WATERS, N.; HOLM-WATERS, S.; TEDROFF, J.; NILSSON, M.; CARLSSON, M. L. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 41, p. 237-60, 2001.

CARR, D. B.; SESACK, S. R. GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. **Synapse**, v. 38, n. 2, p. 114-23, 2000.

CASANOVAS, J. M.; HERVÁS, I.; ARTIGAS, F. Postsynaptic 5-HT_{1A} receptors control 5-HT release in the rat medial prefrontal cortex. **Neuroreport**, v. 10, n. 7, p. 1441-5, 1999.

CECHETTO, D. F.; CHEN, S. J. Subcortical sites mediating sympathetic responses from insular cortex in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. R245-R255, 1990.

CECHETTO, D. F.; SAPER, C. B. Evidence for a viscerotopic sensory representation in the cortex and thalamus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 262, n. 1, p. 27-45, 1987.

CELADA, P.; PUIG, M. V.; CASANOVAS, J. M.; GUILLAZO, G.; ARTIGAS, F. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 24, p. 9917-29, 2001.

CHARARA, A.; PARENT, A. Chemoarchitecture of the primate dorsal raphe nucleus. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 15, n. 2, p. 111-27, 1998.

CHEN, S.; ASTON-JONES, G. Evidence that cholera toxin B subunit (CTb) can be avidly taken up and transported by fibers of passage. **Brain Res.**, v. 674, n. 1, p. 107-11, 1995.

CHIBA, T.; KAYAHARA, T.; NAKANO, K. Efferent projections of infralimbic and prelimbic areas of the medial prefrontal cortex in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*. **Brain Res.**, v. 888, p. 83-101, 2001.

COMMONS, K. G.; CONNOLLEY, K. R.; VALENTINO, R. J. A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 206-215, 2003.

CONDE, F.; MAIRE-LEPOIVRE, E.; AUDINAT, E.; CREPEL, F. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. **J. Comp. Neurol.**, v. 352, p. 567-93, 1995.

CORNEA-HÉBERT, V.; RIAD, M.; WU, C.; SINGH, S. K.; DESCARRIES, L. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of the adult rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 409, p. 187-209, 1999.

DAY H. E. W.; GREENWOOD, B. N.; HAMMACK, S. E.; WATKINS, L. R.; FLESHNER, M.; MAIER, S. F.; CAMPEAU, S. Differential expression of 5HT-1A, α_{1b} adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 receptor mRNA in serotonergic, γ -aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v. 474, n. 3, p. 364-378, 2004.

DE FELIPE, J.; FARINAS, I. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. **Prog. Neurobiol.**, v. 39, p. 563-607, 1992.

DESCARRIES, L.; AUDET, M. A.; DOUCET, G.; GARCIA, S.; OLESKEVICH, S.; SÉGUÉLA, P.; SOGHOMONIAN, J. J.; WATKINS, K. C. Morphology of central serotonin neurons. Brief review of quantified aspects of their distribution and ultrastructural relationships. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 600, p. 81-92, 1990.

DÍAZ-MATAIX, L.; SCORZA, M. C.; BORTOLOZZI, A.; TOTH, M.; CELADA, P.; ARTIGAS, F. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 47, p. 10831-10843, 2005.

DREVETS, W. C.; PRICE, J. L.; SIMPSON, J. R. Jr.; TODD, R. D.; REICH, T.; VANNIER, M.; RAICHLE, M. E. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. **Nature**, v. 386, n. 6627, p. 824-7, 1997.

EL KAFI, B.; CESPUGLIO, R.; LEGER, L.; MARINESCO, S.; JOUVET, M. Is the nucleus raphe dorsalis a target for the peptides processing hypnogenic properties? **Brain Res.**, v. 637, p. 211-221, 1994.

FLOYD, N. S.; PRICE, J. L.; FERRY, A. T.; KEAY, K. A.; BANDLER, R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 432, n. 3, p. 307-28, 2001.

FLOYD, N. S.; PRICE, J. L.; FERRY, A. T.; KEAY, K. A.; BANDLER, R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 422, p. 556-78, 2000.

FRAZÃO, R.; PINATO, L.; DA SILVA, A. V.; BRITTO, L. R.; OLIVEIRA, J. A.; NOGUEIRA, M. I. Evidence of reciprocal connections between the dorsal raphe nucleus and the retina in the monkey *Cebus apella*. **Neurosci. Lett.**, v. 430, n. 2, p. 119-23, 2008.

FUSTER, J. M. The prefrontal cortex-an update: time is of the essence. **Neuron**, v. 30, n. 2, p. 319-33, 2001.

FUXE, K.; RIVERA, A.; JACOBSEN, K. X.; HÖISTAD, M.; LEO, G.; HORVATH, T. L.; STAINES, W.; DE LA CALLE, A.; AGNATI, L. F. Dynamics of volume transmission in the brain. Focus on catecholamine and opioid peptide communication and the role of uncoupling protein 2. **J. Neural Transm.**, v. 112, n. 1, p. 65-76, 2005.

GABBOTT, P. L.; DICKIE, B. G.; VAID, R. R.; HEADLAM, A. J.; BACON, S. J. Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. **J. Comp. Neurol.**, v. 377, n. 4, p. 465-99, 1997.

GABBOTT, P. L.; WARNER, T. A.; JAYS, P. R.; SALWAY, P.; BUSBY, S. J. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. **J. Comp. Neurol.**, v. 492, n. 2, p. 145-77, 2005.

GAMRANI, H.; CALAS, A.; BELIN, M. F.; AGUERA, M.; PUJOL, J. F. High resolution radioautographic identification of [3H]GABA labeled neurons in the rat nucleus raphe dorsalis. **Neurosci. Lett.**, v. 15, p. 43-48, 1979.

GEISLER, S.; ZAHM, D.S. Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. **J. Comp. Neurol.**, v. 26, p. 270-294, 2005.

GESSA, G. L.; DEVOTO, P.; DIANA, M.; FLORE, G.; MELIS, M.; PISTIS, M. Dissociation of haloperidol, clozapine, and olanzapine effects on electrical activity of mesocortical dopamine neurons and dopamine release in the prefrontal cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 6, p. 642-9, 2000.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Cellular basis of working memory. **Neuron**, v. 14, n. 3, p. 477-85, 1995.

GOLDMAN-RAKIC, P. S.; FUNAHASHI, S.; BRUCE, C. J. Neocortical memory circuits. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 55, p. 1025-38, 1990.

GONZÁLEZ-MAESO, J.; WEISSTAUB, N. V.; ZHOU, M.; CHAN, P.; IVIC, L.; ANG, R.; LIRA, A.; BRADLEY-MOORE, M.; GE, Y.; ZHOU, Q.; SEALFON, S. C.; GINGRICH, J. A. Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. **Neuron**, v. 53, n. 3, p. 439-52, 2007.

GROENEWEGEN, H. J. Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to medio dorsal prefrontal topography. **Neuroscience**, v. 24, p. 397-431, 1988.

HAJÓS, M.; RICHARDS, C. D.; SZEKELY, A. D.; SHARP, T. An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. **Neuroscience**, v. 87, n. 1, p. 95-108, 1998.

HARRISON, P. J.; WEINBERGER, D. R. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. **Mol. Psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 40-68, 2005.

HEIDBREDER, C. A.; GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 27, n. 6, p. 555-79, 2003.

HOOVER, W. B.; VERTES, R. P. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. **Brain Struct. Funct.**, v. 212, n. 2, p. 149-79, 2007.

HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 71, n. 4, p. 533-54, 2002.

HURLEY, K. M.; HERBERT, H.; MOGA, M. M.; SAPER, C. B. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 308, p. 249-276, 1991.

ICHIKAWA, J.; ISHII, H.; BONACCORSO, S.; FOWLER, W. L.; O'LAUGHLIN, I. A.; MELTZER, H. Y. 5-HT(2A) and D(2) receptor blockade increases cortical DA release via 5-

HT(1A) receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. **J. Neurochem.**, v. 76, n. 5, p. 1521-31, 2001.

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

JANKOWSKI, M. P.; SESACK, S. R. Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: Ultrastructural features and associations with serotonin and γ -aminobutyric acid neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 468, n. 4, p. 518-529, 2004.

JODO, E.; ASTON-JONES, G. Activation of locus coeruleus by prefrontal cortex is mediated by excitatory amino acid inputs. **Brain Res.**, v. 768, p. 327-32, 1997.

JODO, E.; CHIANG, C.; ASTON-JONES, G. Potent excitatory influence of prefrontal cortex activity on noradrenergic locus coeruleus neurons. **Neuroscience**, v. 83, n. 1, p. 63-79, 1998.

KESNER, R. P.; DAKIS, M. Intrahippocampal injections of phencyclidine but not naloxone disrupt acquisition of a spatial continuous recognition memory task. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 56, n. 1, p. 97-101, 1997.

KIRBY, L. G.; RICE, K. C.; VALENTINO, R. J. Effects of corticotrophin releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, p. 148-162, 2000.

KOLB, B. Animal models for human PFC-related disorders. **Prog. Brain Res.**, v. 85, p. 501-519, 1990.

KOECHLIN, E.; BASSO, G.; PIETRINI, P.; PANZER, S.; GRAFMAN, J. The role of the anterior prefrontal cortex in human cognition. **Nature**, v. 13, p. 148-151, 1999.

KOSOFISKY, B. E.; MOLLIVER, M. E. The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. **Synapse**, v. 1, p. 153-68, 1987.

KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 171, n. 2, p. 157-91, 1977a.

KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. Projection from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. **J. Comp. Neurol.**, v. 172, p. 687-722, 1977b.

KROEZE, W. K.; ROTH, B. L. The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis. **Biol. Psychiatry**, v. 44, p. 1128-1142, 1998.

LARUELLE, M.; FRANKLE, W. G.; NARENDRAN, R.; KEGELES, L. S.; ABIDARGHAM, A. Mechanism of action of antipsychotic drugs: from dopamine D(2) receptor antagonism to glutamate NMDA facilitation. **Clin. Ther.**, v. 27, p. S16-24, 2005. Suppl. A.

LEE, H. S.; KIM, M. A.; VALENTINO, R. J.; WATERHOUSE, B. D. Glutamatergic afferent projections to the dorsal raphe nucleus of the rat. **Brain Res.**, v. 963, n. 1-2, p. 57-71, 2003.

LEGER, L.; BONNET, C.; CESPUGLIO, R.; JOUVET, M. Immunocytochemical study of the CLIP/ACTH-immunoreactive nerve fibers in the dorsal raphe nucleus of the rat, **Neurosci. Lett.**, v. 174, p. 137-140, 1994.

LEONARD, B. E. Evidence for a biochemical lesion in depression. **J. Clin. Psychiatry**, v. 61, n. 6, p. 12-17, 2000.

LOWRY, C. A.; RODDA, J. E.; LIGHTMAN, S. L.; INGRAM, C. D. Corticotropin-releasing factor increases in vitro firing rates of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus: evidence for activation of a topographically organized mesolimbocortical serotonergic system. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 7728-7736, 2000.

LUPPI, P. H.; ASTON-JONES, G.; AKAOKA, H.; CHOUVET, G.; JOUVET, M. Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. **Neuroscience**, v. 65, p. 119-60, 1995.

LUPPI, P. H.; FORT, P.; JOUVET, M. Iontophoretic application of unconjugated cholera toxin B subunit (CTb) combined with immunohistochemistry of neurochemical substances: a method for transmitter identification of retrogradely labeled neurons. **Brain Res.**, v. 534, n. 1-2, p. 209-24, 1990.

LUPPI, P.H.; SAKAI, K.; FORT, P.; SALVERT, D.; JOUVET, M.; The nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat nucleus reticularis magnocellularis: a double-labeling study with cholera toxin as a retrograde tracer. **J. Comp. Neurol.**, v. 1, p. 1-20, 1988.

LUPPI, P.H.; SAKAI, K.; SALVERT, D.; FORT, P.; JOUVET, M. Peptidergic hypothalamic afferents to the cat nucleus raphe pallidus as revealed by a double immunostaining technique using unconjugated cholera toxin as a retrograde tracer. **Brain Res.**, v. 402, n. 2, p. 339-345, 1987.

MANJI, H. K.; DREVETS, W. C.; CHARNEY, D. S. The cellular neurobiology of depression. **Nat. Med.**, v. 7, n. 5, p. 541-7, 2001.

MARTÍN-RUIZ, R.; PUIG, M. V.; CELADA, P.; SHAPIRO, D. A.; ROTH, B. L.; MENGOD, G.; ARTIGAS, F. Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 24, p. 9856-66, 2001.

MELONI, E. G.; REEDY, C. L.; COHEN, B. M.; CARLEZON, W. A. Jr. Activation of raphe efferents to the medial prefrontal cortex by corticotropin-releasing factor: correlation with anxiety-like behavior. **Biol. Psychiatry**, v. 63, n. 9, p. 832-9, 2008.

MELTZER, H. Y.; LI, Z.; KANEDA, Y.; ICHIKAWA, J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 27, n. 7, p. 1159-72, 2003.

- MENGOD, G.; VILARO, M. T.; RAURICH, A.; LOPEZ-GIMENEZ, J. F.; CORTES, R. PALACIOS, J. M. 5-HT receptors in mammalian brain: receptor autoradiography and *in situ* hybridization studies of new ligands and newly identified receptors. **Histochem. J.**, v. 28, p. 747-758, 1996.
- METZGER, M.; DE AZEVEDO SILVEIRA, A. S.; ANNUNCIATO, W. A.; SHAMMAH-LAGNADO, S. J. Anatomical relationships of serotonin 2A receptors with the dopaminergic system in the prefrontal cortex and mesencephalon of the rat. ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 37., 2007, San Diego. **Abstract...** San Diego: Neuroscience, 2007. Res. 351.23/F47.
- MICHELSSEN, K. A.; SCHMITZ, C.; STEINBUSCH, H. W. The dorsal raphe nucleus from silver stainings to a role in depression. **Brain Res. Rev.**, v. 55, n. 2, p. 329-42, 2007.
- MILLER, B. T.; D'ESPOSITO, M. Searching for "the top" in top-down control. **Neuron**, v. 48, n. 4, p. 535-8, 2005.
- MINER, L.A.; BACKSTROM, J.R.; SANDERS-BUSH, E.; SESACK, S.R.; Ultrastructural localization of serotonin2A receptors in the middle layers of the rat prelimbic prefrontal cortex. **Neuroscience**, v. 116, n. 1, p. 107-117, 2003.
- MOGHADDAM, B.; ADAMS, B.; VERMA, A.; DALY, D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. **J. Neurosci.**, v. 17, n. 8, p. 2921-7, 1997.
- MONTI, J. M.; JANTOS, H. Effects of activation and blockade of 5-HT_{2A/2C} receptors in the dorsal raphe nucleus on sleep and waking in the rat. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 30, n. 7, p. 1189-95, 2006.
- MORIYAMA, Y.; YAMAMOTO, A. Glutamatergic chemical transmission: look! Here, there, and anywhere. **J. Biochem.**, v. 135, n. 2, p. 155-63, 2004.
- MORRISON, J. H.; MOLLIVER, M. E.; GRZANNA, R.; COYLE, J. T. Noradrenergic innervation patterns in three regions of medial cortex: an immunofluorescence characterization. **Brain Res. Bull.**, v. 4, p. 849-57, 1979.
- NEAFSEY, E.J. Prefrontal cortical control of the autonomic nervous system: anatomical and physiological observations. **Prog. Brain Res.**, v. 85, p. 147-166, 1990.
- NOGUEIRA, M.I.; BARBIERI C.; VIEIRA R.; MARQUES ER.; MORENO JE. A practical device for histological fixative procedures that limits formaldehyde deleterious effects in laboratory environments. **J. Neurosci. Methods**, v. 72 , n. 1, p. 65-70, 1997.
- ONGUR, D.; PRICE, J.L. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. **Cerebral Cortex**, v. 10, p. 206- 219, 2000.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. New York: Academic Press, 1998.

PEHEK, E.A.; MCFARLANE, H.G.; MAGUSCHAK, K.; PRICE, B.; PLUTO, C.P. M100-907, a selective 5-HT_{2A} antagonist, attenuates dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. **Brain Res.**, v. 5, p. 51-59, 2001.

PEHEK, E. A.; NOCJAR, C.; ROTH, B. L.; BYRD, T. A.; MABROUK, O. S. Evidence for the preferential involvement of 5-HT_{2A} serotonin receptors in stress- and drug-induced dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 2, p. 265-77, 2006.

PEYRON, C.; PETIT, J. M.; RAMPON, C.; JOUVET, M.; LUPPI, P. H. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. **Neuroscience**, v. 82, p. 443-68, 1998.

PUIG, M. V.; CELADA, P.; ARTIGAS, F. Serotonergic control of prefrontal cortex. **Rev. Neurol.**, v. 39, n. 6, p. 539-47, 2004.

PUIG, M. V.; CELADA, P.; DÍAZ-MATAIX, L.; ARTIGAS, F. In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT_{2A} receptors: relationship to thalamocortical afferents. **Cereb. Cortex**, v. 13, n. 8, p. 870-82, 2003.

RAY, J. P.; PRICE, J. L.; The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal cortex topography. **J. Comp. Neurol.**, v. 323, p. 167-97, 1992.

REEP, R. L.; WINANS, S. S. Afferent connections of dorsal and ventral agranular insular cortex in the hamster, **Neuroscience**, v. 7, p. 1265-1288, 1982a.

REEP, R. L.; WINANS, S. S. Efferent connections of dorsal and ventral agranular insular cortex in the hamster, **Neuroscience**, v. 7, p. 2609-2635, 1982b.

REPOVS, G.; BADDELEY, A. The multi-component model of working memory: explorations in experimental cognitive psychology. **Neuroscience**, v. 139, p. 5-21, 2006.

ROBBINS, T. W. Chemical neuromodulation of frontal-executive functions in humans and other animals. **Exp. Brain Res.**, v. 133, n. 1, p. 130-8, 2000.

ROBBINS, T. W. Chemistry of the mind: neurochemical modulation of prefrontal cortical function. **J. Comp. Neurol.**, v. 493, n. 1, p. 140-6, 2005.

ROTH, B. L.; SHEFFLER, D. J.; KROEZE, W. K. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 3, n. 4, p. 353-9, 2004.

RUGGIERO, D. A.; MRAOVITCH, S.; GRANATA, A. R.; ANWAR, M.; REIS, D. J. A role of insular cortex in cardiovascular function. **J. Comp. Neurol.**, v. 257, n. 2, p. 189-207, 1987.

SANTANA, N.; BORTOLOZZI, A.; SERRATS, J.; MENGOD, G.; ARTIGAS, F. Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. **Cereb. Cortex**, v. 14, n. 10, p. 1100-9, 2004.

SAPER, C. B. Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat, **J. Comp. Neurol.**, v. 210, p. 163-173, 1982.

SAPER, C. B. Image is everything. **J. Comp. Neurol.**, v. 412, n. 3, p. 381-2, 1999.

SAWAGUCHI, T.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. **Science**, v. 251, n. 4996, p. 947-50, 1991.

SCHACTER, D. L. Implicit knowledge: new perspectives on unconscious processes. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 37, p. 271-88, 1994.

SEAMANS, J. K.; YANG, C. R. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. **Prog. Neurobiol.**, v. 74, n. 1, p. 1-58, 2004.

SEEMAN, P. Atypical antipsychotics: mechanism of action. **Can. J. Psychiatry**, v. 47, n. 1, p. 27-38, 2002.

SÉGUÉLA, P.; WATKINS, K.C.; DESCARRIES, L. Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 1, p. 129-142, 1989.

SEMBA, K.; FIBIGER, H. C. Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculo pontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and anterograde transport and immunohistochemical study. **J. Comp. Neurol.**, v. 323, p. 387-410, 1992.

SESACK, S. R.; DEUTCH, A. Y.; ROTH, R. H.; BUNNEY, B. S. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study using Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **J. Comp. Neurol.**, v. 290, p. 213-42, 1989.

SHI, C. J.; CASSELL, M. D. Cortical, thalamic and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. **J. Comp. Neurol.**, v. 399, p. 440-468, 1998.

SHULTS, C. W.; QUIRION, R.; CHRONWALL, B.; CHASE, T. N.; O'DONOHUE, T. L. A comparison of the anatomical distribution of sub-amygdala: substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. **Peptides**, v. 5, p. 1097-1984, 1984.

SMILEY, J. F.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. **J. Comp. Neurol.**, v. 367, n. 3, p. 431-43, 1996.

SMITH, G. S. D.; SAVERY, D.; MARDEN, C.; LOPEZ COSTA, J. J.; AVERILL, S.; PRIESTLEY, J. V.; RATTRAY, M. Distribution of messenger RNAs encoding enkephalin, substance P, somatostatin, galanin, vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide Y, and calcitonin gene-related peptide in the midbrain periaqueductal grey in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 350, p. 23-40, 1994.

STEINBUSCH, H. W. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. **Neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 557-618, 1981.

- STEKETEE, J. D. Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 41, n. 2-3, p. 203-28, 2003.
- STOCKMEIER, C. A. Neurobiology of serotonin in depression and suicide. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 836, p. 220-232, 1997.
- STRATFORD, T. R.; WIRTSHAFTER, D. Ascending dopaminergic projections from the dorsal raphe nucleus in the rat. **Brain Res.**, v. 511, p. 173-176, 1990.
- SWANSON, L.W. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. **Brain Res. Bull.**, v. 9, p. 321-353, 1982.
- TAKAGISHI, M.; CHIBA, T. Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. **Brain Res.**, v. 566, p. 26-39, 1991.
- THIERRY, A. M.; BLANC, G.; SOBEL, A.; STINUS, L.; GLOWINSKI, J. Dopaminergic terminals in the rat cortex. **Science**, v. 182, p. 499-501, 1973.
- UHL, G. R.; GOODMAN, R. R.; SNYDER, S. H. Neurotensin-containing cell bodies, fibers, and nerve terminals in the brainstem of the rat: Immunohistochemical mapping. **Brain Res.**, v. 167, p. 77-91, 1979.
- URBAIN, N.; CREAMER, K.; DEBONNEL, G. Electrophysiological diversity of the dorsal raphe cells across the sleep-wake cycle of the rat. **J. Physiol.**, v. 573, p. 679-95, 2006.
- UYLINGS, H. B.; VAN EDEN, C. G. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in the rat and in primates, including humans. **Prog. Brain Res.**, v. 85, p. 31-62, 1990.
- VALENTINO, R. J.; COMMONS, K.G. Peptides that fine-tune the serotonin system. **Neuropeptides**, v. 39, p. 1-8, 2005.
- VALENTINO, R. J.; LIOUTERMAN, L.; VAN BOCKSTAELE, E. J. Evidence for regional heterogeneity in corticotrophin-releasing factor interactions in the dorsal raphe nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v. 435, p. 450-463, 2001.
- VANDERHAEGHEN, J. J.; LOTSTRA, F.; DE MEY, J.; GILLES, C. Immunohistochemical localization of cholecystokinin- and gastrin-like peptides in the brain and hypophysis of the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 1190-1194, 1980.
- VARGA, V.; SZÉKELY, A. D.; CSILLAG, A.; SHARP, T. HAJÓS, M. Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. **Neuroscience**, v. 106, n. 4, p. 783-92, 2001.
- VERTES, R. P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 313, n. 4, p. 643-68, 1991.

VERTES, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse**, v. 51, n. 1, p. 32-58, 2004.

VERTES, R. P.; KOCSIS, B. Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 340, n. 1, p. 11-26, 1994.

WANG, Q. P.; NAKAI, Y. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. **Brain Res. Bull.**, v. 34, p. 575-585, 1994.

WESTERHAUS, M. J.; LOEWY, A. D. Central representation of the sympathetic nervous system in the cerebral cortex. **Brain Res.**, v. 903, p. 117– 127, 2001.

WILLIAMS, G. V.; RAO, S. G.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. The physiological role of 5-HT_{2A} receptors in working memory. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 2843-2854, 2002.

WILLIAMS, S. M.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Widespread origin of the primate mesofrontal dopamine system. **Cereb. Cortex**, v. 8, p. 321-45, 1998.

WILSON, M. A.; MOLLIVER, M. E. The organization of serotonergic projections to cerebral cortex in primates: regional distribution of axon terminals. **Neuroscience**, v. 44, p. 537-53, 1991a.

WILSON, M. A.; MOLLIVER, M. E. The organization of serotonergic projections to cerebral cortex in primates: retrograde transport studies. **Neuroscience**, v. 44, p. 555-570, 1991b.

WINTERER, G.; WEINBERGER, D. R. Genes, dopamine and cortical signal-to-noise ratio in schizophrenia. **Trends Neurosci.**, v. 27, n. 11, p. 683-90, 2004.

YASUI, Y.; BREDER, C. D.; SAPER, C. B.; CECETTO, D. F. Autonomic responses and efferent pathways from the insular cortex in the rat, **J. Comp. Neurol.**, v. 303, p. 355–374, 1991.

YU, L.; HUANG, M.; XU, H. Y.; ZHAO, H. Effects of 5-hydroxytryptamine ascending pathways of dorsal raphe nuclei and habenular nucleus on the respiration and blood pressure of rats. **Clin. Med. J.**, v. 120, n. 24, p. 2308-10, 2007.

ZHANG, Z.; OPPENHEIMER, S. M. Characterization, distribution and lateralization of baroreceptor-related neurons in the rat insular cortex. **Brain Res.**, v. 760, p. 243-250, 1997.

ZHOU, F. M.; HABLITZ, J. J. Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. **J. Neurophysiol.**, v. 82, n. 6, p. 2989-99, 1999.