

**ALINE COELHO MACEDO**

**COMPARTIMENTALIZAÇÃO DO NÚCLEO ACUMBENS E SUA  
RELAÇÃO COM AS AFERÊNCIAS DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL**

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

São Paulo  
2013

**ALINE COELHO MACEDO**

**COMPARTIMENTALIZAÇÃO DO NÚCLEO ACUMBENS E SUA  
RELAÇÃO COM AS AFERÊNCIAS DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Martin Andreas Metzger

Versão original

São Paulo  
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Macedo, Aline Coelho.

Compartimentalização do núcleo acumbens e sua relação com as aferências do córtex pré-frontal / Aline Coelho Macedo. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Martin Andreas Metzger.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Comunicação celular no sistema nervoso.

Versão do título para o inglês: Compartmental organization of the nucleus accumbens and its relationship with prefrontal afferents.

1. Neurotransmissores 2. Glutamato 3. Núcleo accumbens  
4. Córtex pré-frontal 5. Dopamina 6. AMPA I. Metzger, Prof. Dr. Martin Andreas II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana  
III. Título.

ICB/SBIB0217/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Aline Coelho Macedo.

Título da Tese: Compartimentalização do núcleo acumbens e sua relação com as aferências do córtex pré-frontal.

Orientador(a): Prof. Dr. Martin Andreas Metzger.

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

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

---

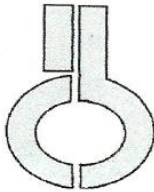
## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **012** nas fls. **03** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **José Donato Junior**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Neurofisiologia da leptina e regulação central da ingestão alimentar*" do qual participam o(s) aluno(s), **Thais Tessari Zampieri, Isadora Clivatti Furigo, João Alfredo Bolivar Pedroso, Laís Iatauro Cardinali, Vanessa Sayuri Nagaishi, Aline Coelho Macedo, Marina Silveira, Regina Silva** os pesquisadores **Martin Andreas Metzger, Sara Joyce Shammah Lagnado, Renata Frazão**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **19.03.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 20 de março de 2013.

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

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **153** nas fls. **136** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Martin Andreas Metzger**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Circuitaria e assinatura neuroquímica das conexões de grupamentos monoaminérgicos no mesencéfalo e rombencéfalo do rato*" do qual participam o(s) aluno(s), **Luciano Gonçalves, Aline Coelho Macedo, Leandro Bueno Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **23.10.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 24 de outubro de 2012.

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

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

**Ao meu querido e amado avô João Cardoso, que inesperadamente nos deixou, dedico esta homenagem mais que especial.**

## AGRADECIMENTOS

Aos queridos amigos do laboratório de neuroanatomia, Leandro, Luciano (e sua paciência em me ensinar esterotaxia), Tai, Isadora, Ângela, Thaís, Laís, Vanessa e João, agradeço pelo inestimável auxílio e convivência maravilhosa todos esses anos. À minha amiga Laiali, admiro muito a profissional que você é. Obrigada por estar sempre me incentivando e ajudando.

À Ana Maria P. Campos que muito mais que uma técnica tornou-se uma grande amiga. Obrigada por transmitir seu vasto conhecimento com tanto carinho e prestatividade.

Ao meu grande professor Alexandre Massao, obrigada por ter me incentivado a me dedicar à ciência, por todos os ensinamentos e por ter me ajudado a escolher o caminho certo, sempre almejei me tornar uma professora tão competente quanto você.

Ao meu orientador Martin, por tudo que aprendi na ciência desde o mestrado, pelos conselhos, por me apoiar sempre. Você é um grande exemplo, tenho orgulho em ter sido sua aluna. A professora Sara e ao professor Donato pela atenção, pelos conselhos pertinentes durante a construção deste trabalho. Ainda no âmbito acadêmico agradeço às professoras Carol e Rosana e ao professor Britto pelas sugestões e valiosas observações realizadas em minha qualificação que ajudaram na conclusão deste estudo.

À minha família, em especial à minha mãe e minha tia que sempre investiram em minha educação e sempre acreditaram no meu potencial e sucesso. Admiro e amo muito vocês duas. Obrigada à minha avó Elza que auxiliou na minha criação e formação como pessoa. Ao meu afilhadinho Douglas que é grande companheiro de todas as horas, sempre tão interessado em tudo que faço, você é muitíssimo importante para mim!!!! Ao meu marido João Paulo, pelo apoio diário, pela paciência em muitos momentos difíceis da minha caminhada e por me motivar sempre. Você me faz acordar e ter vontade de continuar todos os dias. Duda, não posso esquecer-me de você, pela companhia na mesa do computador, te amo também!

À CAPES pelo auxílio financeiro para a execução do meu estudo, às bibliotecárias pela atenção e revisão do trabalho, aos secretários de pós graduação José Maria e Paloma pelas dicas, esclarecimentos, conselhos e ajuda em toda a parte burocrática do processo.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.



“O importante é não parar de questionar”.  
Albert Einstein

## RESUMO

MACEDO, C. A. **Compartimentalização do núcleo acumbens e sua relação com as aferências do córtex pré-frontal**. 2013. 80 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O núcleo acumbens (Acb) é considerado uma das estruturas chave do sistema de recompensa e é tradicionalmente subdividido em duas sub-regiões principais denominadas core (AcbC) e shell (AcbSh). No entanto, há evidências que as divisões do Acb vão além da clássica dicotomia core-shell e que particularmente o AcbSh caudal destaca-se como estrutura altamente heterogênea com distintos compartimentos e microcircuitos. Assim, há evidências crescentes de que regiões fracamente imunomarcadas para tirosina hidroxilase (TH) e calretinina (Calr) podem formar um complexo sistema de corredores no AcbSh caudal. Para detalhar melhor a organização dos compartimentos do Acb e as bases celulares das interações entre dopamina (DA) e glutamato (Glu) nesta estrutura, primeiramente investigamos aqui através de métodos de imunohistoquímica a distribuição de TH, Calr, assim como a distribuição da fosfoproteína neuronal DARPP-32, um marcador para neurônios espinhosos de tamanho médio (MSNs). Adicionalmente investigamos a distribuição do transportador de dopamina (DAT) no AcbSh em camundongos geneticamente modificados que expressam uma proteína fluorescente (tdTomato) em corpos celulares e axônios que contém DAT. Em seguida, foi comparada a distribuição destes marcadores com a das subunidades GluA2/3 dos receptores de Glu do tipo AMPA, que também exibem uma distribuição heterogênea no AcbSh. Finalmente, exploramos através de métodos de rastreamento neural se as aferências vindas do córtex pré-frontal (PFC) são direcionadas à distintos compartimentos do AcbSh. Os experimentos de dupla marcação de imunohistoquímica revelaram que: 1) As regiões que contém corpos celulares GluA2/3+ intensamente imunomarcados e densamente aglomerados não somente coincidem com aglomerados celulares isolados, mas formam um complexo sistema de corredores contínuos no AbSh caudal que coincide com áreas pouco inervadas por axônios TH+ e Calr+; 2) Todos os MSNs DARPP-32+ no Acb contém as subunidades GluA2/3, mas uma minoria (7%) de neurônios GluA2/3 + não contém DARPP-32. Conforme revelado no Acb de camundongos transgênicos, os axônios DAT+ foram distribuídos de forma heterogênea no AcbSh caudal, sendo que o sistema de corredores previamente identificado em ratos, foi caracterizado como pobre em DAT. Finalmente, nossos experimentos de rastreamento anterógrado indicaram que somente uma pequena parte das aferências vindas do PFC é direcionada aos corredores. Em suma, nossos resultados indicam que GluA2/3 é um marcador celular confiável para delinear um sistema complexo de corredores no AcbSh caudal. Esse sistema provavelmente constitui um compartimento neuroquímico altamente especializado do AcbSh, em que a cinética da liberação e recaptação da DA é diferente do restante do Acb.

**Palavras-chave:** Neurotransmissores. Glutamato. Núcleo acumbens. Córtex pré-frontal. Dopamina. DARPP-32. AMPA.

## ABSTRACT

MACEDO, C. A. **Compartmental organization of the nucleus accumbens and its relationship with prefrontal afferents.** 2013. 80 p. Thesis (Doctoral thesis in Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The nucleus accumbens (Acb) is a key structure of the reward system and is traditionally divided into two major subregions denominated core (AcbC) and shell (AcbSh). However, there is evidence that divisions within the Acb go beyond the classical core-shell dichotomy and that particularly the caudal AcbSh stands out as a highly heterogeneous structure consisting of distinct compartments and microcircuits. Thus, there is growing evidence that regions poor in tyrosine hydroxylase (TH) and calretinin (Calr) might form a complex corridor network in the caudal AcbSh. To further clarify the compartmental organization of the Acb and the cellular framework of its dopamine (DA) - glutamate (Glu) interactions, we first investigated here by immunohistochemical methods the distribution of TH, Calr, as well as the neuronal phosphoprotein DARPP -32, a marker for medium-sized spiny neurons (MSNs). Additionally, we investigated the distribution of the dopamine transporter (DAT) in AcbSh in genetically modified mice which express a fluorescent protein (tdTomato) in cell bodies and axons that contains DAT. Then, we compared the distribution of these markers with that of the GluA2/3 AMPA type Glu receptor subunits, which also display a heterogeneous distribution pattern in the AcbSh. Finally, we explored by tract tracing methods, whether afferents from the prefrontal cortex (PFC) are preferentially directed to distinct compartments of the AcbSh. As revealed by double-labeling immunohistochemistry: 1) regions containing densely packed GluA2/3+ cell bodies not only coincide with isolated cell clusters, but form a continuous complex corridor network in the caudal AcbSh that is in register with areas weakly innervated by TH+ and Calr+ axons and TH+ and Calr; 2) All DARPP-32+ MSNs in the Acb contain the GluA2/3 subunits, but a minority (7%) of GluA2/3+neurons does not contain DARPP-32. As revealed in the Acb of transgenic mice, DAT+ axons were distributed heterogeneously in the caudal AcbSh, with the corridor network previously identified in rats, characterized as poor in DAT. Finally, our anterograde tracing experiments indicated that only a small portion of prefrontal afferents is directed to the corridor network. In all, our results indicate that GluA2/3 is a reliable cell marker to outline a complex corridor system in the AcbSh. This system probably is a highly specialized neurochemical compartment of the AcbSh, in which the kinetics of the release and reuptake of DA are different than in the remainder Acb.

**Keywords:** Neurotransmitters. Glutamate. Nucleus accumbens. Prefrontal cortex. Dopamine. DARPP-32. AMPA

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Imunomarcção para calbindina (Calb), ilustrando as principais subdivisões do Acb.....	31
<b>Figura 2-</b> Fotomicrografias ilustrativas das subdivisões do AcbSh.....	32
<b>Figura 3-</b> Imunomarcção para GluA2/3 e GluA2 no AcbRP e Acb caudal...	35
<b>Figura 4-</b> Imunofluorescência para TH, GluA2/3 e coloração de Nissl adjacente no AcbRP .....	36
<b>Figura 5-</b> Imunomarcção para DARPP-32 no Acb.....	39
<b>Figura 6-</b> Imunofluorescência para DARPP-32 e GluA2/3 no Acb.....	40
<b>Figura 7-</b> Fotomicrografias da distribuição do DAT no AcbSh.....	42
<b>Figura 8-</b> Fotomicrografias da distribuição de neurônios CTb+ no PFC e hipocampo resultante de uma injeção de CTb centrada no CONE do AcbSh caudal.....	45
<b>Figura 9-</b> Fotomicrografias de um local de injeção de PHA-L na região ACd do PFCm e da marcação resultante desta injeção no Acb.....	49
<b>Figura 10-</b> Fotomicrografias de um local de injeção de PHA-L no PL do PFCm e da marcação resultante desta injeção no Acb.....	50
<b>Figura 11-</b> Fotomicrografias de um local de injeção de PHA-L no IL do PFCm e da marcação resultante desta injeção no Acb.....	51
<b>Figura 12-</b> Fotomicrografias de um local de injeção de PHA-L no IL do PFCm e da marcação resultante desta injeção no Acb.....	52
<b>Figura 13 -</b> Fotomicrografias de dois locais de injeção de PHA-L na divisa entre MO e VO e no MO e da marcação resultante no Acb do rato 25 .....	53
<b>Figura 14-</b> Imunofluorescência para PHA-L e TH no Acb, resultante da injeção de PHA-L no PL do PFC.....	55
<b>Figura 15-</b> Imunofluorescência para PHA-L e TH no Acb, resultante da injeção de PHA-L no IL do PFC.....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Anticorpos primários utilizados nas marcações de imunoperoxidase (IP) e imunofluorescência (IF).....	26
<b>Tabela 2-</b> Anticorpos secundários utilizados nas marcações de imunoperoxidase (IP) e imunofluorescência (IF).....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aca	comissura anterior
Acb	núcleo acumbens
AcbC	núcleo acumbens, subregião “core”
AcbRP	núcleo acumbens, polo rostral
AcbSh	núcleo acumbens, subregião “shell”
ACd	córtex do cíngulo anterior dorsal
Ald	córtex da ínsula agranular dorsal
AMPA	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
AOP	núcleo olfatório anterior, parte posterior
Calb	calbindina D-28K
Calr	calretinina
Cl	claustró
CPu	núcleo caudado-putâmen
CONE	cone do núcleo acumbens shell
DA	dopamina
DAB	tetracloro de diaminobenzidina
DARPP-32	fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc, peso molecular 32kD
DAT	transportador de dopamina
DP	córtex peduncular dorsal

fmi	corpo caloso
Glu	glutamato
ICjM	ínsula magna de Calleja, ínsula maior
iGluRs	subunidades dos receptores ionotrópicos de glutamato
IL	córtex infra-límbico
INT	zona intermediária do núcleo acumbens shell
LAT	zona lateral do núcleo acumbens shell
IC	corredor lateral do núcleo acumbens shell
LTD	depressão de longa duração
LTP	potenciação de longa duração
mC	corredor medial do núcleo acumbens shell
MSNs	neurônios espinhosos de tamanho médio
NMDA	N-metil-D-aspartato
PL	córtex pré-límbico
PrCm	córtex pré-central medial
TH	tirosina hidroxilase
Tu	tubérculo olfatório
VERT	vértex do núcleo acumbens shell
VGLUT(s)	transportador(es) vesicular(es) de glutamato
VLO	córtex orbital ventro-lateral
VO	córtex orbital ventral
VP	pálido ventral

VT            transmissão volumétrica

VTA          área tegmental ventral



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
<b>3.1 Animais</b> .....	22
<b>3.2 Experimentos de rastreamento anterógrado e retrógrado</b> .....	22
<b>3.3 Perfusão e Microtomia</b> .....	23
<b>3.4 Experimentos de Imunoistoquímica</b> .....	24
<b>3.4.1 Marcações de imunoperoxidase</b> .....	25
<b>3.4.2 Marcações de imunofluorescência</b> .....	25
<b>3.5 Análise dos resultados</b> .....	27
<b>3.6 Nomenclatura</b> .....	28
<b>4 RESULTADOS</b> .....	30
<b>4.1 Experimentos de imunohistoquímica</b> .....	30
<b>4.1.1 Organização compartimental do AcbSh caudal</b> .....	30
<b>4.1.2 Marcadores Distribuição das subunidades GluA2/3 e GluA2 e sua relação com os compartimentos do Acb</b> .....	33
<b>4.1.3 Distribuição de DARPP-32 e sua co-localização com GluA2/3</b> .....	37
<b>4.1.4 Marcadores de interneurônios Distribuição do DAT e sua relação com os compartimentos do Acb</b> .....	41
<b>4.2 Experimentos de rastreamento neural</b> .....	43
<b>4.2.1 Experimentos de rastreamento retrógrado</b> .....	43
<b>4.2.2 Experimentos de rastreamento anterógrado</b> .....	46
<b>4.2.3 Experimentos de dupla marcação para PHA-L e TH</b> .....	54
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>5.1 Distribuição das subunidades GluA2/3 e GluA2 no Acb</b> .....	57
<b>5.2 Distribuição de DARPP-32 e sua co-localização com GluA2/3</b> .....	58
<b>5.3 Organização compartimental do núcleo acumbens</b> .....	61
<b>5.4 Considerações funcionais</b> .....	64
<b>6 Conclusões</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68

## 1 INTRODUÇÃO

O núcleo acumbens (Acb) é parte integral do estriado (GROENEWEGEN et al., 1999; HEIMER; WILSON, 1975; VOORN et al., 2004) situado na porção ventromedial dos núcleos da base. Devido ao seu padrão peculiar de conexões (para revisão, ver GROENEWEGEN et al., 1999; IKEMOTO, 2007; SESACK; GRACE, 2010), o Acb tem sido contextualizado como uma interface entre motivação e ação (MOGENSON et al., 1980). O Acb é envolvido em comportamentos governados por reforços naturais (alimentos) e é considerado uma estrutura chave da neurocircuitaria envolvida nas ações de drogas de abuso e adicção (DI CHIARA et al., 2004; KELLEY; BERRIDGE, 2002; KELLEY, 2004 a, b; KOOB; VOLKOW, 2010). Além disso, o Acb, ou suas distintas partes, tem sido implicado em diversos outros aspectos de comportamentos emocionais e motivacionais, assim como em distintas formas de aprendizagem (CARDINAL et al., 2002; DAY; CARELLI, 2007; LANSINK et al., 2008; SALAMONE et al., 2005; SALAMONE, 2010).

Tradicionalmente o Acb é subdividido em duas regiões principais, denominadas core (AcbC) e shell (AcbSh), com o AcbSh localizado nas partes mediais e ventrolaterais e o AcbC ocupando as partes centrais e dorsolaterais do Acb (VOORN et al., 1989; ZABORSKY et al., 1985; ZAHM; BROG, 1992). Essa clássica dicotomia core-shell tem como base a distribuição da proteína ligante de cálcio calbindina (Calb) que destaca o AcbC por sua robusta marcação, enquanto o AcbSh exibe fraca à moderada imunomarcação para Calb (JONGEN-RELO; VOORN; GROENEWEGEN, 1994; ZAHM; BROG, 1992).

Entretanto, durante as últimas décadas apareceram evidências que as divisões do Acb vão além da clássica dicotomia core-shell. Resultados de estudos imunoistoquímicos (HÄRTIG et al., 2003; HERKENHAM; EDLEY; STUART, 1984; JANSSON et al., 1999; JONGEN-RELO; GROENEWEGEN; VOORN, 1993; TODTENKOPF; STELLAR, 2000; VOORN et al., 1986, 1989; ZAHM, 2000), hodológicos (BERENDSE et al., 1988, BERENDSE; GROENEWEGEN; LOHMAN; 1992; WRIGHT; GROENEWEGEN, 1995; ZAHM et al., 2013), e farmacológicos (CARELLI; WIGHTMAN, 2004; IKEMOTO; QIN; LIU, 2005; PECIÑA; BERRIDGE, 2005) indicam que o AcbSh, e principalmente o AcbSh caudal se apresenta como uma estrutura altamente heterogênea, com distintos compartimentos, áreas de transição e microcircuitos (para revisão ver GROENEWEGEN et al., 1999; ZAHM;

BROG, 1992; ZAHM, 1999). Assim, diversas substâncias neuroativas como a acetilcolinesterase, receptores opióides (HERKENHAM; EDLEY; STUART, 1984), e encefalina (VOORN et al., 1989), tem uma distribuição heterogênea no AcbSh que muitas vezes pode ser relacionada aos aglomerados de alta densidade celular que por sua vez são circundados por regiões com baixa densidade celular. Esses característicos aglomerados celulares (“cell clusters”) foram primariamente descritos em detalhe por Herkenham et al. (1984). Entretanto, todas as tentativas de relacionar cada um desses achados à clássica organização bicompartimental patch-matrix descrita no estriado dorsal (GERFEN et al., 1985; GERFEN; BAIMBRIDGE; MILLER, 1985; GRAYBIEL; RAGSDALE, 1978) falharam (VOORN et al., 1989).

É também bem estabelecido que a dopamina (DA) e tirosina hidroxilase (TH) apresentam um padrão de distribuição altamente heterogêneo no AcbSh e que áreas que apresentam baixa imunorreatividade para DA ou TH coincidem com os aglomerados celulares (HERKENHAM; EDLEY; STUART, 1984; VOORN et al., 1986). Por outro lado, demonstrou-se que a baixa imunorreatividade para TH no AcbSh não é exclusivamente relacionada com os aglomerados celulares isolados, mas uma característica de corredores fracamente marcados para TH muito mais extensos dentro do AcbSh, que foram primeiramente descritos de forma independente por dois grupos (JANSSON et al., 1999; SEIFERT et al., 1998). Considerando que, Seifert et al. (1998) distinguiu dois corredores pobres em TH, um grande corredor lateral (IC) e um menor corredor medial (mC), Jansson et al. (1999) propôs que esses corredores são interligados transversalmente em alguns níveis do AcbSh na direção rostro-caudal, com destaque importante no AcbSh caudal. A existência de corredores dentro do AcbSh também tem sido demonstrada com outros marcadores predominantemente axonais, tais como a calretinina (Calr; SEIFERT et al., 1998) e as isoformas VGLUT1 e VGLUT2 dos transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs; HARTIG et al., 2003). Curiosamente, dado que as estruturas corticais e subcorticais usam diferentes isoformas dos VGLUTs para repor as vesículas sinápticas (FREMEAU et al., 2001; HERZOG et al., 2001), a distribuição diferencial destas isoformas pode refletir padrões distintos de aferentação por axônios corticais e subcorticais no AcbSh descritos em uma série de trabalhos do grupo de Groenewegen (por exemplo, BERENDSE; GROENEWEGEN; LOHMAN, 1992; WRIGHT; GROENEWEGEN, 1995, 1996). Em um estudo preliminar (COELHO; METZGER, 2010) observamos através de técnicas de

imunoistoquímica, um padrão de distribuição altamente heterogêneo das subunidades GluA2/3 (anteriormente denominadas GluR2/3, ver COLLINGRIDGE et al., 2009) dos receptores ionotrópicos de glutamato (Glu) do tipo AMPA (iGluRs) no AcbSh.

Para esclarecer se o padrão de distribuição das subunidades GluA2/3 pode estar relacionado com o sistema de corredores descrito no Acb, no presente estudo nós comparamos através de métodos imunoistoquímicos, a distribuição das subunidades GluA2/3 e GluA2 dos iGluRs com a distribuição de marcadores existentes para corredores no Acb como TH e Calr. O fato que, em contraste aos marcadores acima mencionados, a imunorreatividade para GluA2/3 é intensa em corpos celulares, também permitiu comparar nossos achados com a existência de aglomerados celulares. No caso do AcbSh, direcionamos atenção especial à sua parte caudal, visto que a distribuição dos marcadores acima mencionados tem sido descrita heterogênea particularmente nessa região (JANSSON et al., 1999; SEIFERT et al., 1998).

Interações entre DA e Glu são crucialmente implicadas no funcionamento do estriado e foram exploradas detalhadamente no CPu, mas não no Acb (CEPEDA; LEVINE, 1998; DAVID; ANSSEAU; ABRAINI, 2005; SCOTT; APERIA, 2009; SURMEIER et al., 2007; WEST et al., 2003). Para especificar as bases celulares das interações DA-Glu no Acb, considerando que a neurotransmissão dopaminérgica pode ser diferente entre os corredores e as outras áreas do Acb (JANSSON et al., 1999; REBEC et al., 1997), realizamos duplas marcações para GluA2/3 e DARPP-32. DARPP-32 foi descrita primariamente como uma proteína citosólica que é fosforilada por AMPc dependente de uma proteína cinase em resposta à ativação do receptor de DA do tipo D1 (HEMMINGS; GREENGARD, 1986). Atualmente, há evidências de que a fosforilação da DARPP-32 não é apenas regulada pela DA agindo sobre receptores D1 e D2, mas por uma variedade de neurotransmissores e receptores, incluindo os receptores de Glu dos tipos NMDA e AMPA (HALPAIN; GIRAULT; GREENGARD, 1990; NISHI et al., 2002). A maioria das funções e das interações complexas da fosfoproteína DARPP-32 foram desvendadas *in vitro* ou *in vivo* no CPu, onde a DARPP-32 é considerada como integrador importante da neurotransmissão nos neurônios dopaminoreceptivos (GREENGARD; ALLEN; NAIRN, 1999; SVENNINGSON et al., 2004) e é expressa por praticamente todos os

neurônios espinhosos de tamanho médio (MSNs; BERTRAN-GONZALEZ et al., 2008; LANGLEY et al., 1997; OUIMET et al., 1998).

Existem evidências que áreas pobres em TH, coincidem com áreas que exibem baixa imunorreatividade para o receptor D2 e para o transportador de dopamina (DAT) e forte imunorreatividade para o receptor D1 (JANSSON et al., 1999). A falta de colocalização entre TH e o receptor do tipo D1 pode apontar para o fato que a transmissão dopaminérgica nestes corredores não seja estritamente sináptica, mas que ocorra principalmente através de transmissão por volume (VT, ver, AGNATI et al., 1995; FUXE et al., 2005). Para especificar se áreas pobres em DAT são relacionadas aos corredores e se os corredores também estão presentes em outras espécies de roedores, nós adicionalmente, investigamos a distribuição de axônios marcados para o DAT em camundongos geneticamente modificados que expressam a proteína fluorescente tdTomato em corpos celulares e axônios que expressam DAT.

O córtex pré-frontal medial (PFCm) projeta-se de maneira topográfica para todo o estriado, incluindo o Acb (BERENDSE; GROENEWEGEN; LOHMAN; 1992; DING; GABBOTT; TOTTERDELL, 2001; VOORN et al., 2004) e está entre as principais entradas glutamatérgicas do Acb (BRITT et al., 2012). Finalmente, a fim de esclarecer se as projeções de distintas subdivisões do PFCm tem, conforme indicado anteriormente (BERENDSE; GROENEWEGEN; LOHMAN; 1992; WRIGHT; GROENEWEGEN, 1995), relação com o sistema de corredores no AcbSh caudal, reexaminamos as projeções de distintas subáreas do PFCm e orbitomedial para o Acb usando traçadores retrógrados e anterógrados.

## 2 OBJETIVOS

Esclarecer a complexa compartimentalização do AcbSh através de métodos imunohistoquímicos, genéticos e de rastreamento neural. Para esse propósito, exploramos os seguintes objetivos específicos:

Estudar através de métodos imunohistoquímicos uma possível distribuição heterogênea de marcadores como TH, Calr e DARPP-32 e relacionar a distribuição destes marcadores com a distribuição de GluA2/3.

Estudar através de métodos de rastreamento anterógrado se as aferências vindas de distintas subdivisões do PFCm são direcionadas para distintos compartimentos do AcbSh.

Estudar uma possível compartimentalização do AcbSh em uma outra espécie de roedor (camundongo) examinando a distribuição do DAT em camundongos geneticamente modificados que apresentam fluorescência em neurônios e axônios que expressam DAT.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos, com peso entre 220 – 260 g, (Wistar, adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas I, n = 44). Em adição, para avaliar a distribuição do DAT, foram utilizados camundongos geneticamente modificados que expressam a proteína fluorescente (tdTomato) em corpos celulares e axônios que contém DAT, com peso entre 20 – 24 g (cedidos pelo Prof. José Donato Jr, ICB-USP, n = 4). Para evitar diferenças entre os sexos, somente ratos e camundongos machos foram usados nos experimentos. Os animais foram mantidos em grupo, em caixas com temperatura controlada de  $\pm 23$  °C, iluminação com ciclos claro e escuro alternados a cada 12 horas, com água e ração a vontade. Todos os procedimentos seguiram o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB – USP (Protocolo nº 153/2012 e Protocolo nº 8/2012), e os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o “Guia de Uso de Animais em Pesquisas” do National Institute of Health (NIH).

#### **3.2 Experimentos de rastreamento anterógrado e retrógrado**

Os ratos foram inicialmente anestesiados via injeções subcutâneas com coquetel contendo Ketamina (Syntec, Hortolândia, Brasil; 5 mg/100 g de peso corporal), Acepromazina (Univet, São Paulo, Brasil; 0.04 mg/100 g de peso corporal) e Xilazina (Syntec; 1 mg/100 g de peso corporal) diluídos em água destilada. Após comprovado o grau de anestesia, foi realizada tricotomia na região craniana, seguida pelo posicionamento do animal no estereotáxico (Kopf, Tujunga, CA, 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. Em seguida, foi realizado o 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, a altura desses dois pontos foi ajustada, evitando diferença superior a 0,2 mm entre ambos.

A partir do ponto craniométrico Bregma, com auxílio de motor de suspensão com broca odontológica esférica, foi aberta uma pequena janela de aproximadamente 0,5 mm<sup>2</sup> para expor a superfície do encéfalo. O traçador anterógrado *Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin* (PHA-L; a 2.5%, 0.01 M, Vector Laboratories, Burlingame, CA, em tampão fosfato,) e o traçador retrógrado subunidade b da toxina colérica (CTb; *low salt* a 1%, List Biological Laboratories Inc., Campell, CA, USA, em água destilada) foram utilizados no presente estudo. CTb foi injetado visando o AcbSh caudal e PHA-L visando as camadas celulares profundas (V e VI) dos córtices pré-límbico (PL), infralímbico (IL) e orbital medial (MO) do PFC. As coordenadas estereotáxicas foram obtidas no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (2007) e subsequentemente adaptadas.

Ambos os traçadores foram injetados com micropipetas de vidro previamente confeccionadas em estirador de pipetas (Kopf-720, Tujunga, CA, USA) com diâmetro interno de 10-15 µm. Todas as injeções foram feitas iontoforéticamente no hemisfério cerebral direito, utilizando uma fonte de corrente positiva pulsada (7 segundos ligada, 7 segundos desligada), alternando em 5 µA, durante 15 minutos, para as injeções de CTb no AcbSh, e durante 20 minutos para as injeções de PHA-L no PFC. Diante desses parâmetros, um grupo de ratos destinados aos experimentos de rastreamento retrógrado receberam injeções unilaterais simples de CTb no AcbSh (n = 15) e o grupo de ratos destinados aos experimentos de rastreamento anterógrado receberam injeções de PHA-L no PFC (n = 20). Após as injeções, as pipetas foram mantidas em posição durante 3 minutos com corrente contínua negativa de 3 µA para minimizar o escape do traçador durante a retirada da pipeta. Os tecidos foram limpos com solução salina, reposicionados e realizada a sutura na região operada. Para transporte do traçador no tecido nervoso, os ratos permaneceram em período pós-operatório de 8-14 dias.

### **3.3 Perfusão e Microtomia**

Após o período de sobrevivência de 8 dias para as injeções de CTb e 10-14 dias para as injeções de PHA-L, os ratos foram profundamente anestesiados através de injeção de Cloropental (Sigma, St. Louis, MO, 3,3 mg/kg) e submetidos à perfusão cardíaca, via ventrículo esquerdo através de bomba peristáltica (Cole Parmer, Chicago, IL), inicialmente utilizando 80 ml de solução salina (0,9%), seguida por 500



ml de solução de paraformaldeído (PFA) a 4% em 0,1 M de tampão fosfato (PB, pH 7.4). Os encéfalos foram removidos de seus envoltórios ósseos e pós-fixados por 4 horas a 4 °C e crio-protegidos em solução PB com 20% de sacarose a 4°C. Em seguida, os encéfalos foram seccionados em plano coronal em um micrótomo de congelamento, sendo que os cortes de 40 µm de espessura foram coletados em cinco compartimentos. Um desses compartimentos foi processado imunistoquimicamente para CTb ou PHA-L. Outro compartimento foi destinado para coloração de Nissl para avaliação dos limites das regiões imunomarcadas.

Nos experimentos realizados em camundongos, com quatro semanas de vida, os animais foram profundamente anestesiados através de injeção de Cloropental (Sigma, St. Louis, MO, 0,4 mg/100 g) e perfundidos via ventrículo esquerdo com 10 ml de solução salina (0,9%), seguida por 150 ml de solução de paraformaldeído (PFA) a 4% em 0,1 M de tampão fosfato (PB, pH 7.4) durante oito minutos. Após a retirada do encéfalo da caixa craniana ele foi pós-fixado na mesma solução de paraformaldeído por cerca de 2 horas, sendo colocado, em seguida, em uma solução de PB com 20% de sacarose. No dia seguinte o encéfalo foi seccionado em plano coronal em um micrótomo de congelação regulado na espessura de 25 µm e dividido em 5 séries. Os tecidos foram conservados em solução anti-congelante.

### **3.4 Experimentos de Imunoistoquímica**

*Anticorpos:* Os anticorpos primários usados no presente estudo e suas espécies, diluições e fabricantes estão listados na Tabela 1. Todos os anticorpos primários que foram usados no presente estudo foram extensivamente caracterizados e tiveram sua especificidade revelada previamente. Os anticorpos policlonais anti-GluA2 e anti GluA2/3 foram utilizados em estudos prévios em cérebro de rato e foram caracterizados por imunoblotting (PETRALIA; WENTHOLD, 1992; PETRALIA et al.,1997; TSE et al., 2008). O anticorpo monoclonal anti-DARPP-32 foi gentilmente cedido por Hugh C. Hemmings Jr, Cornell University, New York, NY e sua especificidade foi caracterizada por imunoblotting (HEMMINGS; GREENGARD, 1986). O anticorpo monoclonal anti-TH, assim como o anticorpo monoclonal contra Calb e o anticorpo policlonal contra Calr são anticorpos comerciais e também foram caracterizados por imunoblotting. Em nosso estudo, todos os anticorpos marcaram as secções do cérebro do rato de modo consistente com as descrições anteriores.

(HÖFKELT et al., 1984; SEIFERT et al., 1998). Todos os anticorpos primários e secundários (ver Tabela 1), também foram testados em nosso laboratório para determinar sua concentração.

#### **3.4.1 Marcações de imunoperoxidase**

Após a realização das etapas de lavagem e incubação. Os cortes (livremente flutuando) foram pré-tratados com borohidreto de sódio a 1% (Sigma) em PB (15 minutos), seguido de uma lavagem completa em PB e por pré-incubação em 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PB contendo álcool metílico a 10% (10-15 minutos). Após lavagem em PB e pré-incubação em PB contendo 2% de soro normal da espécie hospedeira do anticorpo secundário e 0,3% Triton X-100 (30 minutos), os cortes foram incubados por 40 horas a 4° C em suas respectivas soluções de anticorpo primário em PB (ver Tabela 1) contendo 1% de soro normal da espécie hospedeira do anticorpo secundário e 0,3% Triton X-100. Depois de várias lavagens em PB, os cortes foram incubados por duas horas em seus respectivos anticorpos biotinilados secundários (ver Tabela 2 para suas respectivas espécies hospedeiras, diluições, e fabricantes). Após várias lavagens em PB, os cortes foram então incubados por 2 horas em um complexo avidina-biotina (Vectastain, Elite ABC kit, Vector, 1:200). Os cortes foram lavados novamente em PB e o produto da reação da peroxidase foi visualizado usando o método da glucose oxidase (ITOH et al., 1979) e DAB como cromógeno. Em alguns casos, a reação da DAB foi intensificada com sulfato de níquel a 0,5%. Os cortes foram lavados novamente em PB e montados em lâminas gelatinizadas. A imunomarcação foi intensificada mergulhando-se as lâminas em uma solução de tetróxido de ósmio durante 20 segundos. Finalmente, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas em xilol e cobertas com DPX (Sigma-Aldrich).

#### **3.4.2 Marcações de imunofluorescência**

Os cortes destinados às duplas marcações de imunofluorescência (IF) foram pré-tratados exatamente conforme descrito acima. Todos os cortes foram pré-incubados por 30 min em PB contendo 2% de soro normal da espécie hospedeira do anticorpo secundário e 0,3% Triton X 100 (30 minutos). Os cortes foram então incubados por 72 horas em um coquetel com dois anticorpos primários diluído em PB contendo

0,3% Triton X-100 e 1% de soro normal da espécie hospedeira do anticorpo secundário. Em seguida, os cortes foram lavados em PB e incubados por 50 min em solução de PB contendo anticorpos secundários conjugados ao fluoróforo Alexa Fluor® 488 e 1% de soro normal da espécie hospedeira do anticorpo secundário. Os cortes foram lavados novamente em PB e incubados por 50 minutos em solução de PB contendo anticorpos secundários conjugados ao fluoróforo Alexa Fluor® 594 (ver Tabela 2) e 1% de soro normal da espécie hospedeira do anticorpo secundário. Após várias lavagens em PB, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas revestidas por lamínulas com slow fade (Molecular Probes) e, finalmente, seladas com esmalte de unha.

**Tabela I. Anticorpos primários utilizados nas marcações de imunoperoxidase (IP) e imunofluorescência (IF).**

Antígeno	Diluição		Espécie	Fonte	Endereço
	IP	IF			
GluA2	1:500	1:250	Coelho	Millipore	(1)
GluA2/3	1:500	1:250	Coelho	Millipore	(1)
TH	1:500	1:200	Camundongo	Boehringer	(2)
Calr	1:2.000	1:1.000	Cabra	Millipore	(1)
Calb	1:10.000	1:5.000	Camundongo	Sigma	(3)
DARPP-32	1:10.000	1:1.250	Camundongo	Não-comercial	(4)
CTb	1:10.000		Cabra	List	(5)
PHA-L	1:5.000	1:2.500	Coelho	DAKO	(6)

(1) Millipore, Temecula, CA

(2) Boehringer, Mannheim, Alemanha

(3) Sigma, St Louis, MO

(4) cedido por Hugh C. Hemmings Jr, Cornell Univ, NY

(5) List, Burlingame, CA

(6) DAKO, Carpinteria, CA

**Tabela II. Anticorpos secundários utilizados nas marcações de imunoperoxidase (IP) e imunofluorescência (IF).**

Anticorpos	Diluição		Espécie	Fonte	Endereço
	IP				
Coelho IgG	1:200		Cabra	Vector	(1)
Camundongo IgG	1:200		Cavalo	Vector	(1)
Cabra IgG	1:4.000		Burro	Jackson	(2)
Anticorpos	IF	Fluoróforo	Espécie	Fonte	Endereço
Camundongo IgG	1:250	Alexa 488	Cabra	Molecular Probes	(3)
Coelho IgG	1:250	Alexa 594	Cabra	Molecular Probes	(3)

(1) Vector, Burlingame, CA

(2) Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA

(3) Molecular Probes, Eugene. OR

### 3.5 Análise dos resultados

Os cortes dos encéfalos de rato corados através da reação de imunoperoxidase e os cortes dos camundongos geneticamente modificados que expressam a proteína tdTomato nos axônios DAT+ foram examinados através de um microscópio Zeiss Axioimager A1 (Zeiss, Muenchen, Germany) equipado com uma câmera digital do tipo Zeiss AxioCam HRc (Zeiss). As imagens de dupla marcação de imunofluorescência foram coletadas e analisadas através do software Axiovision (Zeiss), que permite a aquisição de imagens de vários canais de fluorescência e a sobreposição dessas imagens. O mesmo software foi utilizado para contagem de eventos e medições. A identificação e quantificação das células imunomarcadas foi realizada em imagens com tamanho de 1388 x 1040 pixels, adquiridas com objetiva de 40x. Apenas os neurônios com o soma completamente corado e em foco foram considerados para análise e classificados como simples ou duplamente marcados. Todos os dados quantitativos foram obtidos a partir da contagem feita em pelo menos três animais. A contagem dos eventos foi realizada em três níveis ao longo do eixo rostro-caudal do Acb, correspondendo aproximadamente aos níveis 2,80 mm, 2,40 mm e 1,50 mm anterior do Bregma, respectivamente (Fig. 1). A contagem dos eventos nesses níveis foi realizada separadamente no AcbC e AcbSh, exceto no AcbRP, onde não se distingue estes dois grandes territórios. Todos os dados quantitativos obtidos foram analisados com o software Sigmastat (Versão 2.03, Systat Software Inc., Richmond, CA). A análise foi conduzida através de uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de U de Mann-Whitney. Para todos os

testes, um valor-p  $\leq 0,05$  foi considerado como significativo. A montagem das imagens foi realizada através do programa Adobe Photoshop (Versão 7.0, a Adobe Systems Inc., Mountain View, CA). O equilíbrio de cores, contraste e brilho das imagens foram ajustados em um grau variável. O software Canvas (ACD Systems, Victoria, Canadá, versão 9.0) foi utilizado para os desenhos de demarcação dos limites das estruturas.

### 3.6 Nomenclatura

A nomenclatura das estruturas usadas no presente estudo é baseada no atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (2007) salvo algumas importantes exceções em relação ao Acb e PFC. Para as subdivisões do AcbSh utilizamos, quando aplicável, a nomenclatura proposta por Todtenkopf e Stellar (2000) para as diferentes subdivisões presentes no AcbSh. Esses autores, baseados no padrão de distribuição diferencial da TH, propuseram que o AcbSh pode ser subdividido em cinco regiões: o vértex (VERT), arco (ARCH), cone (CONE), assim como as regiões intermediária (INT) e ventrolateral (LAT), sendo que o VERT e o CONE exibem uma maior imunorreatividade para TH se comparado ao ARCH (ver Fig.1 em TODTENKOPF et al., 2002). Em nosso material, nas marcações para TH, observamos que este padrão é altamente reproduzível (Fig 2A). Entretanto, é importante notar que as subregiões propostas são apenas distinguíveis no AcbSh caudal, o qual corresponde aos dois quintos mais caudais desta estrutura. No presente estudo, nós incorporamos, quando aplicável, esta nova proposta com uma modificação. Nós não consideramos o “ARCH” como uma região separada do AcbSh, mas como parte integral de um complexo de corredores fracamente imunorreativos para TH que se estendem ao longo do AcbSh (Ver Resultados e Discussão). Nós também distinguimos no presente estudo o polo rostral do Acb (AcbRP) como uma sub-região separada. Enquanto alguns autores consideram o AcbRP como uma terceira sub-região principal do Acb (ZAHM; HEIMER, 1993) outros argumentam que o AcbRP, devido a sua fraca imunorreatividade por Calb, deveria ser considerada como uma parte integral do AcbSh (JONGEN-RELO; VOORN; GROENEWEGEN, 1994; RIEDEL et al., 2002).

Para as subdivisões do PFCm nós usamos a nomenclatura clássica de Krettek e Price, (1977). Assim distinguimos no PFCm o córtex do cíngulo anterior (ACd), o

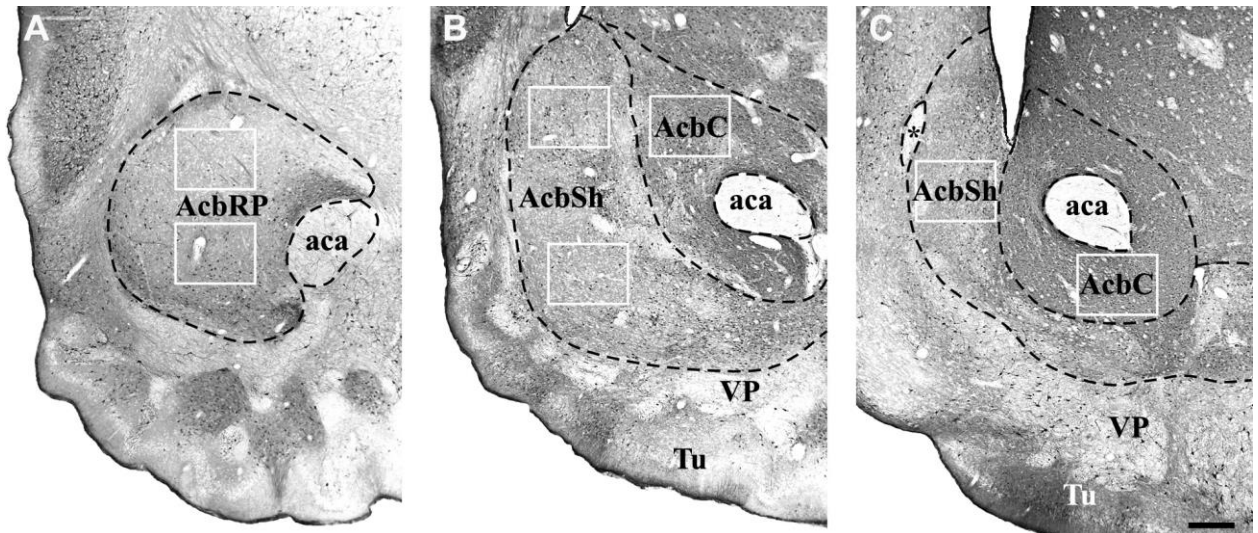
córtex pré-límbico (PL) e infralímbico (IL). Adicionalmente distinguimos no PFC orbitomedial as subdivisões orbital medial (MO) e orbital ventral (VO). Em relação às subunidades dos iGluRs, utilizamos neste estudo a nova nomenclatura proposta por Collingridge et al. (2009) para os canais iônicos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Experimentos de imunistoquímica

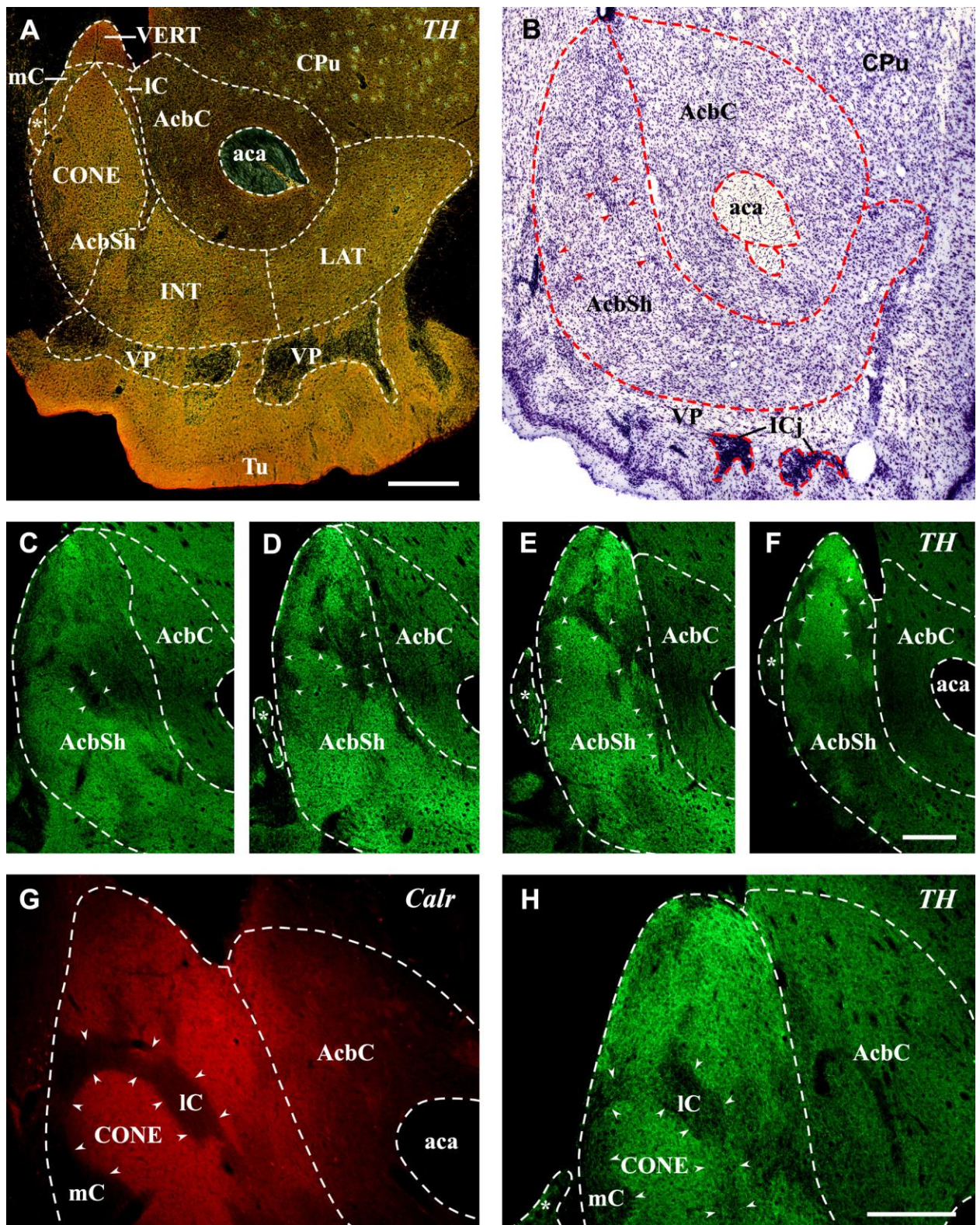
#### 4.1.1 *Compartimentalização do AcbSh caudal*

Conforme revelado pela imunomarcção para TH, o padrão de distribuição deste marcador tornou-se progressivamente mais heterogêneo no AcbSh. No AcbSh médio-rostral, zonas fracamente marcadas para TH aparecem em secções coronais como áreas isoladas de forma e tamanho variáveis (por exemplo, áreas irregulares fracamente marcadas para TH localizadas dorsalmente à insula de Calleja e uma complexa área pobre em TH que prolonga-se na borda lateral com o AcbC, ver Fig.2D). Em paralelo, em secções de Nissl, zonas pobres em TH do AcbSh medial claramente se destacaram como aglomerados de alta densidade celular (comparar Fig. 2B com Fig. 2D).Embora, a primeira vista, os aglomerados de alta densidade celular não parecem ser contínuos, em regiões mais caudais, observa-se que as zonas pobres em TH são contínuas e formam os corredores lateral (IC) e medial (mC), que são interligados em alguns níveis e circundados pela região do CONE (Fig.2E,F). Em adição, o IC e o mC não são somente fracamente inervados por axônios TH+, mas também são extremamente pobres em Calr. Sendo assim, em contraste á região ao CONE ricamente inervada, o IC e mC em torno do CONE, são praticamente desprovidos de axônios Calr+ (Fig.2G). A existência de corredores no AcbSh caudal foi demonstrada por Voorn et al. (1989; ver sua Fig. 9), e o IC e mC foram primeiramente descritos por Seifert et al. (1998) como regiões pobres em TH e Calr (ver sua Fig.4). Finalmente, Jansson et al. (1999) descreveu que zonas pobres em TH no AcbSh são contínuas na direção rostro-caudal e em alguns níveis são conectadas umas as outras por meio de pontes (ver sua Fig.7). Em suma, nossa análise detalhada de séries de secções coronais adjacentes ao longo do AcbSh imunomarcadas para Nissl, TH ou Calr (Fig.2) confirmou a existência de um complexo sistema de corredores tubulares pobres em TH no AcbSh e delineou uma sobreposição deste sistema com zonas que exibem alta densidade celular.



**Figura 1-** Fotomicrografias da marcação de imunoperoxidase para calbindina (Calb) no Acb. São mostrados três níveis consecutivos ao longo do eixo rostro-caudal do Acb, ilustrando as principais subdivisões dessa estrutura (A-C). Note que imunomarcação para Calb é mais robusta e homogênea no acumbens core (AcbC) que no acumbens shell (AcbSh) e no polo rostral (AcbRP). Os retângulos indicam as áreas onde as contagens das células foram realizadas. Para outras abreviações, ver lista. Escala = 200  $\mu$ m





**Figura 2-** Fotomicrografias ilustrativas das subdivisões do AcbSh. (A) Imunomarcagem para tirosina hidroxilase (TH), ao longo do AcbSh incorporando as regiões vertex (VERT), cone (CONE), intermediária (INT) e ventrolateral (LAT)=, assim como os corredores medial (mC) e lateral (IC) delineados no presente estudo. (B) Coloração de Nissl, ilustrando a relação de aglomerados celulares com os corredores (indicados pelas cabeças de seta) no AcbSh. (C-F) Uma série de marcações de imunofluorescência para TH no AcbSh ao longo do eixo rostro-caudal, ilustrando áreas e corredores pobres em TH (delineados pelas cabeças de seta). Note que nos níveis rostrais, áreas pobres em TH aparecem de forma isolada (C,D), enquanto em direção caudal essas áreas tornam-se interconectadas por corredores (E,F). Detalhes da imunomarcagem para calretinina (Calr; G) e TH (H) no mC e IC circundando a região do CONE no AcbSh caudal. Asteriscos indicam a ínsula Magna de Calleja. Para outras abreviações, ver lista. Escala = 400 µm em A (aplicável em A, B); 250 µm em F (aplicável em C-F); 200 µm em H (aplicável em G, H).

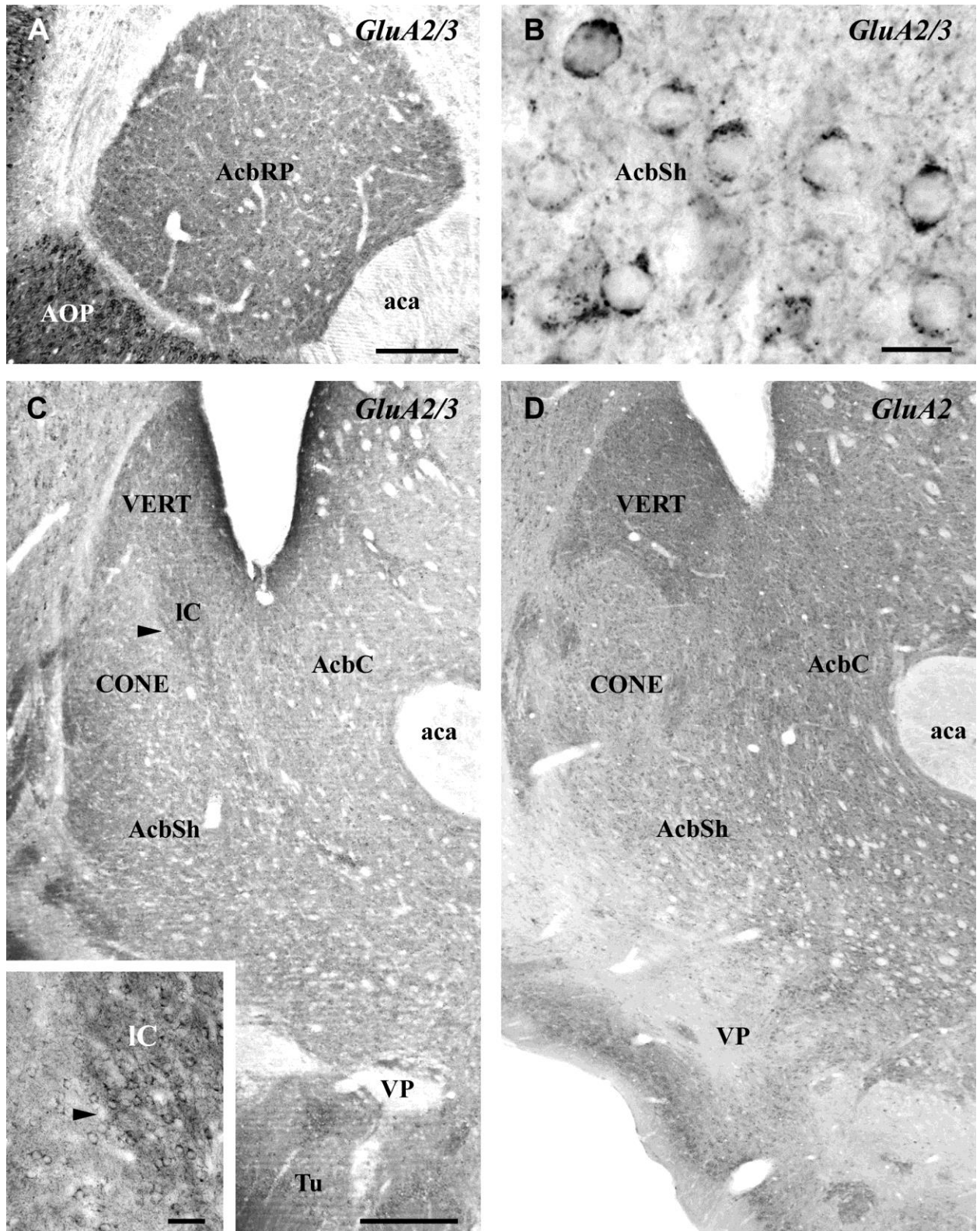
#### **4.1.2 Distribuição das subunidades GluA2/3 e GluA2 e sua relação com os compartimentos do Acb.**

Utilizando um anticorpo que reconhece um epítipo comum das subunidades GluA2 e GluA3 dos iGluRs do tipo AMPA, uma intensa imunorreatividade para GluA2/3 foi observada em todas as regiões do Acb (Fig.3). A imunorreatividade para GluA2/3 foi presente em numerosos corpos celulares, poucos dendritos primários e também em axônios. Muitos dos neurônios GluA2/3+ tem um corpo celular médio de forma redonda ou oval, característica dos MSNs (Fig.3B).

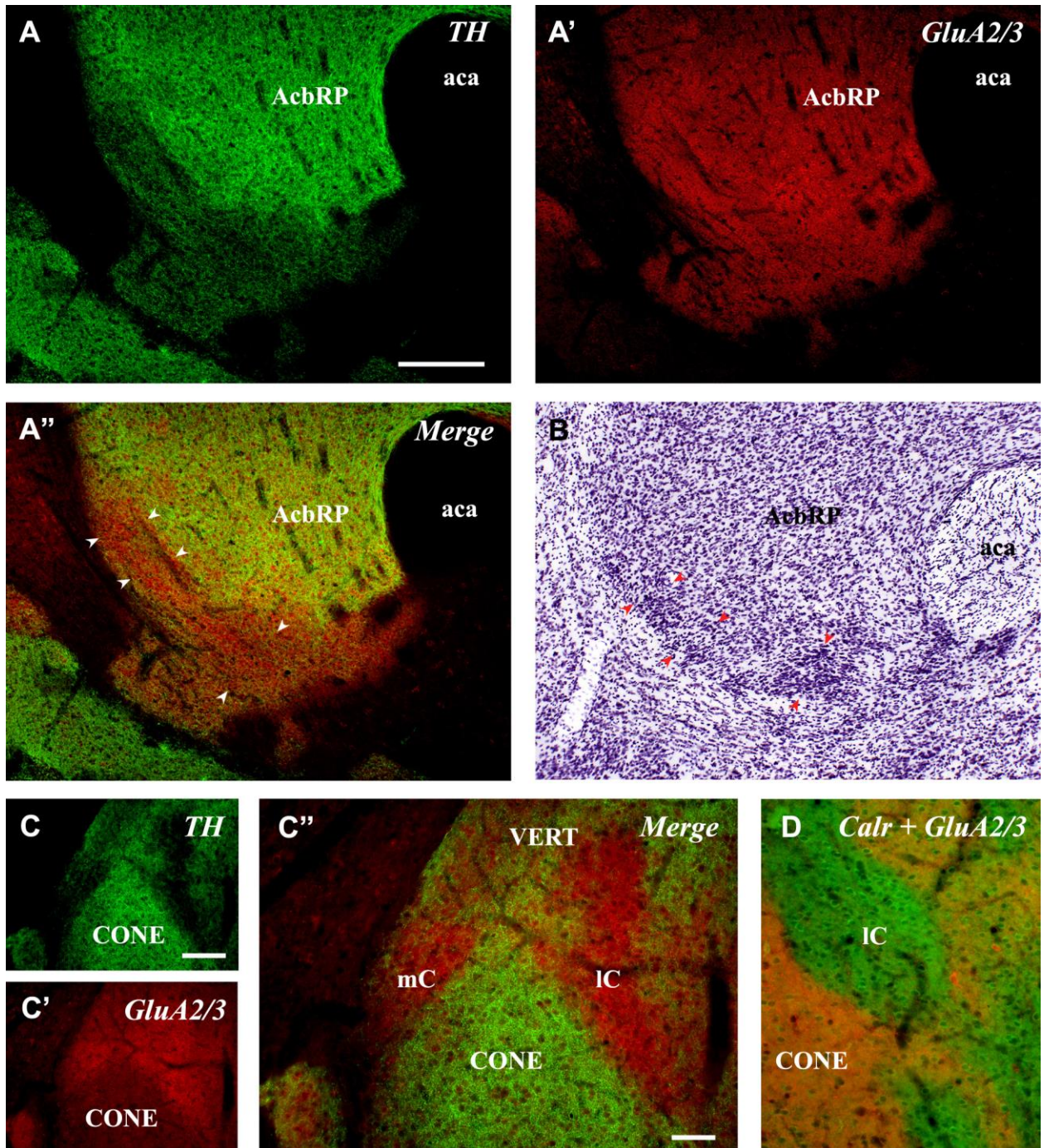
O padrão de marcação para GluA2/3 foi claramente heterogêneo ao longo do eixo rostro-caudal do Acb. Os pericários GluA2/3+ foram uniformemente distribuídos no AcbRP (Fig.3A) e no AcbC (Fig.3C), com exceção de um grupamento neuronal GluA2/3+ que se destacou na parte basal do AcbRP (Fig.4B). No AcbSh a imunomarcação tornou-se progressivamente mais heterogênea e em secções ao longo do AcbSh caudal, os corredores (mC e IC) se destacaram por sua intensa imunorreatividade para GluA2/3 associada a alta densidade celular. De forma similar, o VERT exibiu uma alta densidade de corpos celulares GluA2/3+ quando comparado ao CONE (Fig.3C). Através da utilização de um anticorpo que reconhece seletivamente a subunidade GluA2 nós obtivemos um padrão de distribuição muito similar ao obtido com o anticorpo contra as subunidades GluA2/3, sendo que particularmente o AcbSh caudal também exibiu um padrão de imunomarcação heterogêneo (Fig.3D). A fim de relacionar o padrão heterogêneo de marcação para GluA2/3 com os diferentes compartimentos do Acb, realizamos uma análise detalhada das duplas marcações para GluA2/3 e TH e GluA2/3 e Calr, e também analisamos séries de Nissl adjacentes. Conforme observado nas simples marcações para GluA2/3, na parte basal do AcbRP uma conspícua área com alta densidade celular foi destacada por uma elevada densidade de elementos GluA2/3 + associados à uma baixa imunorreatividade para TH (Fig. 4A-A ", 4B). Esta parte basal do AcbRP foi primariamente descrita por Zahm e Brog (1992) como uma área rica em substância P e desprovida de neurotensina e posteriormente destacada por ser rica em proencefalina, prodinorfina e receptores de DA do tipo D1 (CURRAN, WATSON, 1995).

No AcbSh caudal, a análise detalhada das duplas-marcações para GluA2/3 e TH e GluA2/3 e Calr, revelou que no mC e IC do AcbSh, áreas de alta densidade de

corpos celulares GluA2/3+ coincidem perfeitamente com áreas de baixa imunorreatividade para Calr. (Fig. 4C-C", 4D). Entretanto, estas observações não se aplicam para o VERT, o qual exibe também uma alta densidade de neurônios GluA2/3+, embora seja robustamente, porém não de forma homogênea, innervado por axônios TH+ e Calr+. A análise de marcações de Nissl adjacentes ao longo do AcbSh confirmou a sobreposição de áreas intensamente imunomarcadas para GluA2/3 no mC e IC com os aglomerados celulares, particularmente evidente no IC e nos grandes grupos celulares perto da ICjM, que fazem parte do mC (Fig,2B). É importante ressaltar que as partes estreitas do sistema de corredores muitas vezes não podem ser facilmente identificadas nas marcações de Nissl, entretanto são reconhecíveis como pontes celulares exibindo alta densidade de elementos GluA2/3+.



**Figura 3-** Fotomicrografias da marcação de imunoperoxidase para GluA2/3 (**A-C**) e GluA2 (**D**) no AcbRP (**A**) e Acb caudal (**B-D**). Repare o similar padrão de distribuição heterogêneo de GluA2/3 (**C**) e GluA2 (**D**) no AcbSh caudal. Notar no detalhe em **C** a densa marcação de neurônios GluA2/3+ no IC. As cabeças de seta indicam os mesmos vasos sanguíneos. Escala =200 µm em A; 20 µm em B; 250 µm em C (aplicável também em D); 50 µm no detalhe.

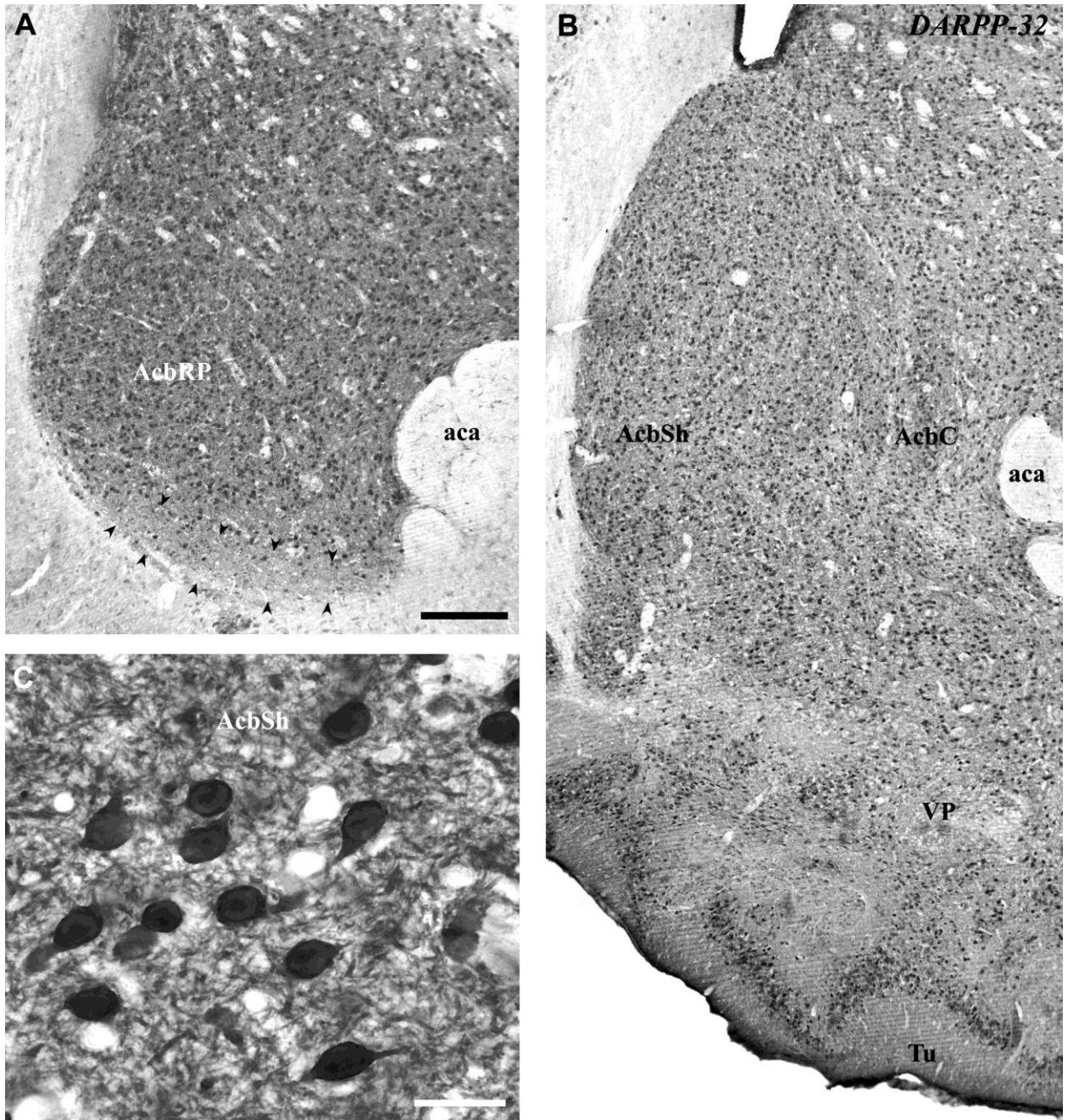


**Figura 4-** Fotomicrografias da dupla marcação de imunofluorescência para TH (**A**, fluorescência verde) e GluA2/3 (**A'**, fluorescência vermelha) e coloração de Nissl adjacente (**B**) ao longo do AcbRP. Note que na parte basal do AcbRP, uma área com alta densidade de neurônios GluA2/3+ (indicada por cabeças de seta brancas em **A''**) é associada com áreas com baixa imunorreatividade para TH e regiões de aglomerados celulares (indicadas por cabeças de seta vermelhas em **B**). Fotomicrografias da dupla marcação de imunofluorescência para TH (**C**, fluorescência verde) e GluA2/3 (**C'**, fluorescência vermelha) e dupla marcação de imunofluorescência para Calr (fluorescência vermelha) e GluA2/3 (fluorescência verde) no AcbSh caudal (**D**). Note que o mC e IC no AcbSh caudal apresentam forte imunorreatividade para GluA2/3 mas fraca imunorreatividade para TH (**C''**) e Calr (**D**). Escala = 250  $\mu$ m em A (aplicável em A-B); 100  $\mu$ m em C (aplicável C'); 50  $\mu$ m em C'' (aplicável também em D).

#### 4.1.3 Distribuição de DARPP-32 e sua co-localização com GluA2/3

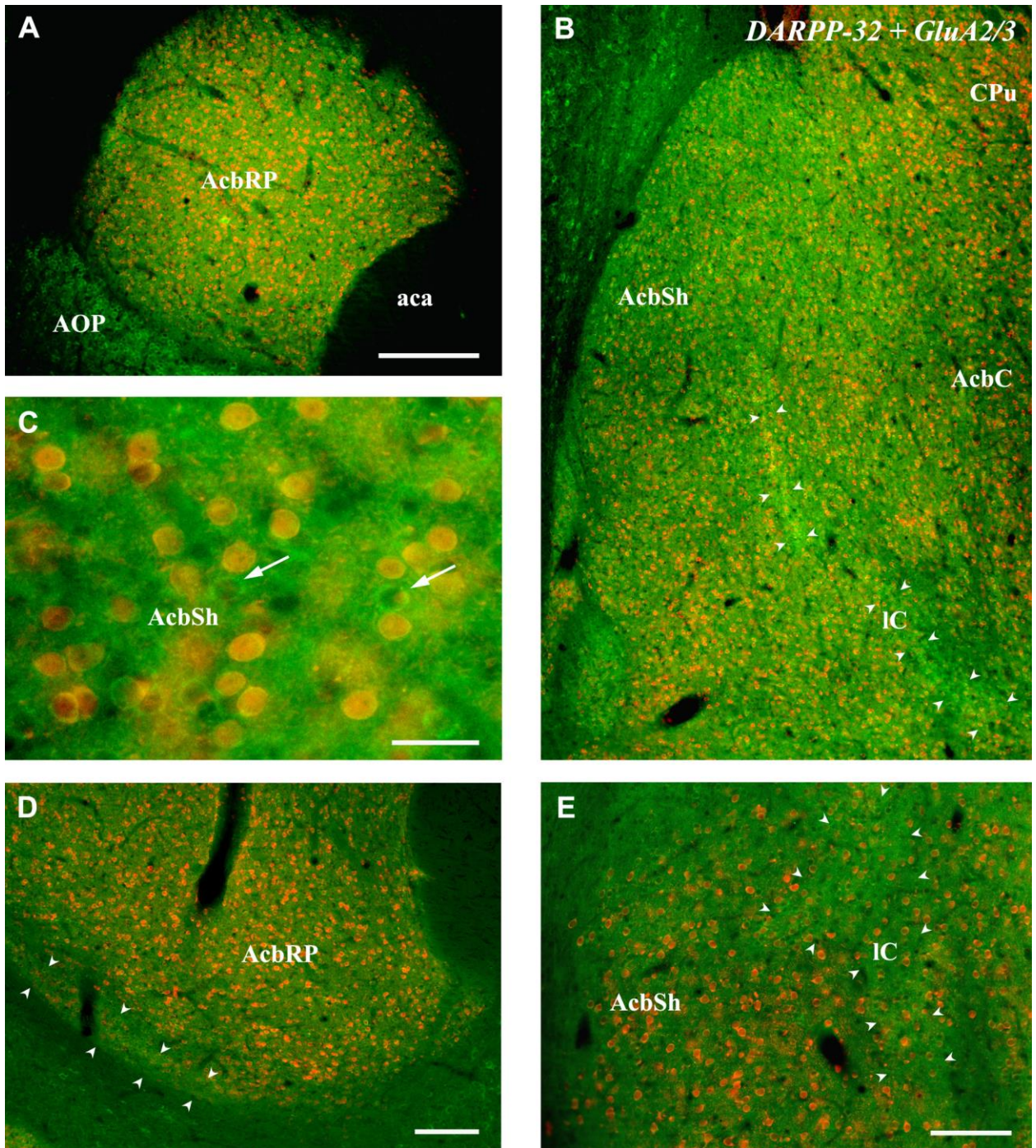
Todas as sub-regiões principais do Acb (AcbRP, AcbC e AcbSh) foram intensamente marcadas para DARPP-32 (Fig. 5A, B). A imunorreatividade para DARPP-32 no Acb foi encontrada em numerosos corpos celulares, dendritos primários, e também axônios. Em geral, os neurônios DARPP-32 + do Acb apresentaram um corpo celular redondo ou oval de tamanho médio, de onde emergiram alguns dendritos primários intensamente marcados (Fig. 5C). Devido ao fato da neurópila ser intensamente imunomarcada para DARPP-32, à primeira vista, estruturas DARPP-32+ apresentaram uma distribuição relativamente homogênea sem diferenças entre o AcbRP, AcbC e AcbSh. Todavia, na parte basal do AcbRP, apenas poucos corpos celulares DARPP-32+ fracamente marcados puderam ser detectados (Fig.5A). No AcbSh caudal, os corpos celulares DARPP-32+ eram mais concentrados nas regiões mediais. Em adição, na parte ventral da região INT, havia pequenas áreas quase desprovidas de corpos celulares DARPP-32+. Na borda ventral do Acb, um padrão diferencial de marcação para DARPP-32, demarcou os elementos estriatais dos elementos palidais dos núcleos da base. Neste último, a imunomarcação para DARPP-32 foi claramente restrita a neurópila intensamente marcada (Fig.3B). A fim de estudar em que grau as amplamente distribuídas subunidades GluA2/3 são expressas em MSNs DARPP-32+, nós realizamos dupla marcação de imunofluorescência para DARPP-32 e GluA2/3. Conforme semi-quantificado nas principais regiões do Acb (AcbRP, AcbC e AcbSh, ver Fig.1), ao longo dos diferentes níveis do eixo rostro-caudal, quase todos neurônios DARPP-32+ no Acb contém as subunidades GluA2/3 (Fig.6). Não há diferenças estatisticamente significativas com relação ao grau de co-localização entre as três sub-regiões principais do Acb e entre os diferentes níveis rostro-caudais do Acb. Nossos resultados indicam que  $99,72 \pm 0,75\%$  de todos os neurônios DARPP-32 + no Acb foram duplamente marcados para GluA2/3. No entanto, uma minoria dos neurônios GluA2/3+ no Acb não continha DARPP-32. Além disso, cerca de 93% ( $92,65 \pm 3,86\%$ ) dos neurônios GluA2/3 + no Acb foram duplamente marcados para DARPP-32. Em suma os respectivos valores foram: AcbRP:  $92.65 \pm 1.34\%$ ; AcbSh:  $92.18 \pm 4.98\%$  e AcbC:  $93.37 \pm 3.99\%$ . Contudo, no AcbSh os campos analisados foram centrados nas subregiões CONE e INT (ver Fig. 1) e assim foram excluídas as regiões de alta densidade celular, uma vez que são localizadas em sua maioria nas

bordas mediais e laterais do AcbSh. Em nossa análise específica das regiões de alta densidade celular, a porcentagem de células simples marcadas para GluA2/3 apresentou um valor consideravelmente maior, alcançando 30% em áreas tradicionalmente descritas por apresentar aglomerados celulares como a parte basal do AcbRP e os aglomerados celulares que fazem parte do IC.



**Figura 5-** Imunomarcção para DARPP-32 no AcbRP (A) e em um nível medial do Acb (B, C). Note na parte basal do AcbRP (indicada pelas cabeças de seta) um número reduzido de corpos celulares DARPP-32+. Escala = 200  $\mu$ m em A (aplicável também em B); 20  $\mu$ m em C.



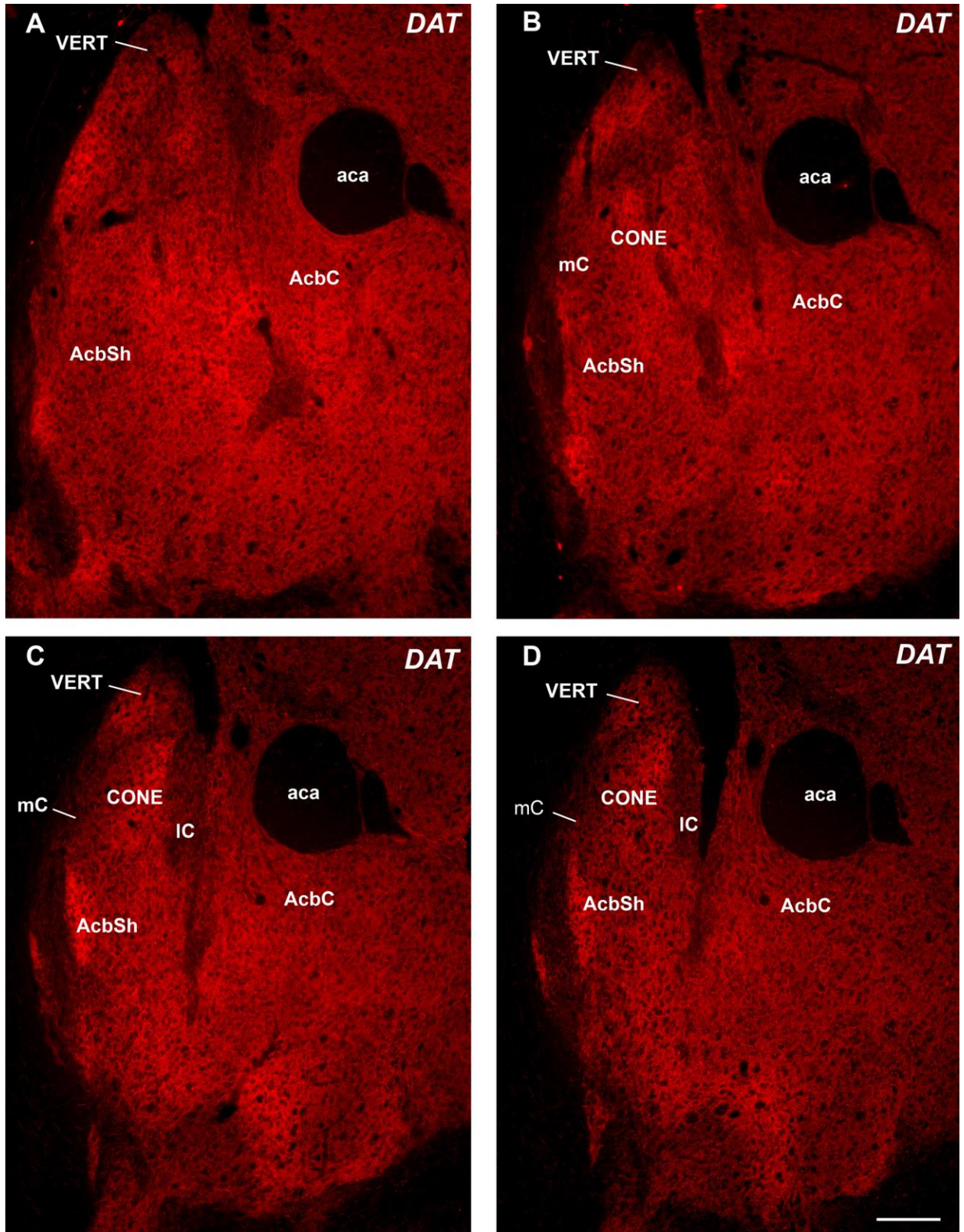


**Figura 6-** Fotomicrografias da dupla marcação de imunofluorescência para DARPP-32 (fluorescência vermelha) e GluA2/3 (fluorescência verde) no AcbRP (**A, D**) e em um nível medial do AcbSh (**B, C, E**). Note que todos os neurônios DARPP-32+ no Acb contém GluA2/3 (indicado pela fluorescência laranja) enquanto uma minoria de neurônios GluA2/3+ no Acb não contém DARPP-32 (indicado pelas setas no detalhe em **B**). Note também que a maioria das células simples marcadas para GluA2/3 estão localizadas na parte basal do AcbRP (**D**) e no IC (indicado pelas cabeças de seta brancas em **B, E**). Escala = 250  $\mu$ m em A (aplicável também em B); 40  $\mu$ m em C; 100  $\mu$ m em D e E.

#### **4.1.4 Distribuição do DAT e sua relação com os compartimentos do Acb**

Visto que DAT é fundamental na regulação do tempo de vida da DA liberada (CRAGG e RICE, 2004; RICE e CRAGG, 2008) e para examinar uma possível compartimentalização do AcbSh em uma outra espécie, examinamos a distribuição de DAT em camundongos geneticamente modificados que seletivamente expressam uma proteína fluorescente (tdTomato) em neurônios e axônios que expressam DAT.

Semelhante ao descrito para a distribuição de TH em ratos, o padrão de distribuição de DAT tornou-se progressivamente mais heterogêneo ao longo do eixo rostro-caudal do AcbSh. Enquanto a distribuição de DAT no AcbRP e AcbC foi bastante homogênea, no AcbSh médio-rostral, zonas fracamente marcadas para DAT apareceram primeiramente em secções coronais como áreas isoladas de forma e tamanho variáveis. Avançando em direção caudal, essas zonas pobres em DAT ficaram cada vez mais proeminentes e no AcbSh caudal o mC e IC foram claramente delineados pela sua fraca expressão de DAT (Fig. 7).



**Figura 7-** Fotomicrografias ilustrativas do padrão de distribuição do DAT ao longo do eixo rostro-caudal do AcbSh (**A-D**), note que áreas com baixa imunorreatividade para DAT delimitam corredores. Escala = 200  $\mu$ m

## 4.2 Experimentos de rastreamento neural

Tendo em vista que as entradas do PFC estão entre as mais importantes e robustas aferências do Acb (BROG et al., 1993; DING et al., 2001; HOOVER, VERTES, 2011; SESACK et al., 1989; VERTES, 2004) e principalmente a fim de esclarecer se as projeções de distintas subregiões do PFCm tem, como indicado anteriormente (BERENDSE; GROENEWEGEN; LOHMAN; 1992; WRIGHT, GROENEWEGEN, 1995), relação com o sistema de corredores no AcbSh caudal, reexaminamos as projeções do PFCm para o Acb usando traçadores retrógrados e anterógrados.

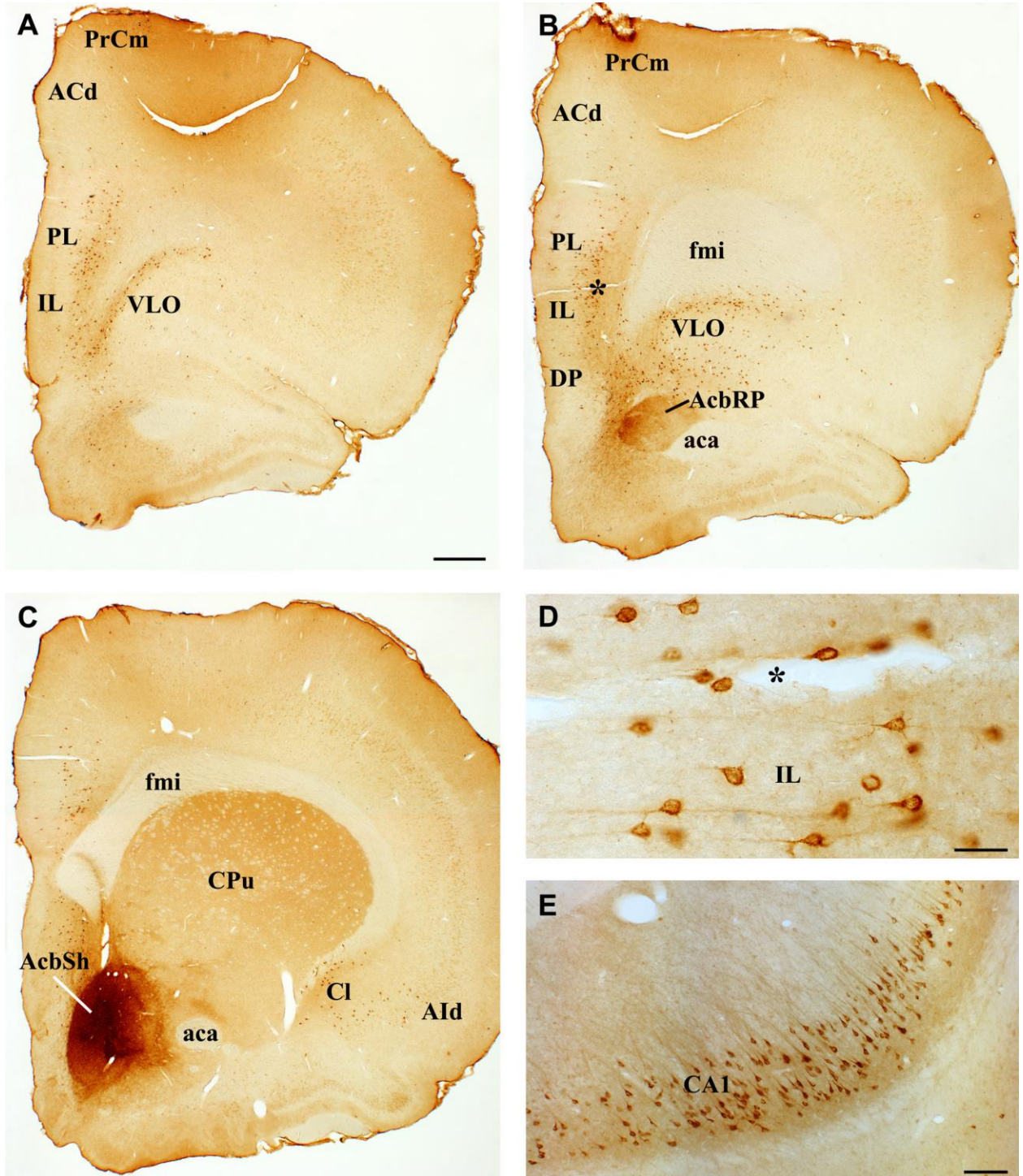
### 4.2.1 Experimentos de rastreamento retrógrado

Primeiramente, para investigar quais regiões do PFCm aferentam o AcbSh caudal, injeções relativamente grandes do traçador retrógrado CTb foram feitas no AcbSh. Em geral, esses experimentos retrógrados permitiram uma caracterização precisa das subáreas e da origem laminar dos neurônios do PFCm que se projetam para o AcbSh caudal. De um total de 15 casos com injeções de CTb no Acb que mostraram transporte satisfatório, 2 casos tiveram injeções principalmente restritas ao AcbSh e foram selecionados para análise. Os resultados são exemplificados em seguida para o caso 14 que teve uma grande injeção de CTb no AcbSh caudal com somente um envolvimento periférico do AcbC (Fig. 8C).

Nesse caso foi observada densa marcação bilateral no PFC que se estendeu do seu polo rostral até sua parte caudal no giro do cíngulo. Em geral a marcação no lado ipsilateral foi maior que o componente contralateral.

Os neurônios retrogradamente marcados foram distribuídos de forma heterogênea nas subáreas do PFCm com destaque para o PL e IL. Nessas duas áreas, a imunomarcação foi muito intensa com grande número de células CTb+ encontradas principalmente nas camadas V e VI (Fig. 8 A-C). Em contraste, somente poucos neurônios CTb+ foram encontrados dorsalmente no ACd e no PrCm. Na camada V a maioria dos neurônios CTb+ foi formada por células piramidais com o dendrito apical posicionado em direção à superfície, enquanto na camada VI prevaleceram neurônios multiformes (Fig. 8D). Em todas as áreas marcadas algumas células CTb+ foram presentes nas camadas superficiais, principalmente na

camada II. Forte marcação de CTb também foi encontrada no córtex dorsal peduncular, em torno do ápice do AcbRP, e lateralmente no córtex ventrolateral orbital e agranular insular. Além disso, as injeções no AcbSh caudal resultaram em grande número de neurônios retrógradamente marcados em distintas áreas do tálamo, amígdala e hipocampo (Fig. 8E), bastante conhecidas como outras fontes importantes de entradas do AcbSh (ver BRITT et al., 2012; BROG et al., 1993).



**Figura 8-** Fotomicrografias da distribuição de neurônios CTb+ em três níveis ao longo do eixo rostro-caudal do PFC (A-C) e na região CA1 do hipocampo (E) resultante de uma injeção de CTb centrada no CONE do AcbSh caudal (ilustrada em C). Note que a maioria das células CTb no PFCm é encontrada nas camadas profundas do PL e IL. Detalhes de neurônios piramidais retrógradamente marcados na camada V do IL (D). Note que a maioria dos neurônios CTb+ é formada por células piramidais. O asterisco indica o mesmo vaso sanguíneo em B e D. Escala = 400  $\mu$ m em A (aplicável também em B e C); 50  $\mu$ m em D, 100  $\mu$ m em E

#### 4.2.2 Experimentos de rastreamento anterógrado

Utilizando os resultados dos experimentos de rastreamento retrógrado, as injeções do traçador anterógrado PHA-L visaram às camadas profundas V e VI da parte ventral do PFCm. De um total de 20 casos de injeções de PHA-L no PFC, 7 foram escolhidas para análise por contemplarem distintas sub-regiões do PFC e mostrarem transporte de traçador satisfatório. Dentre as injeções selecionadas, uma foi centrada e restrita ao ACd (caso R41) e outra no PL (R26). Três injeções envolveram principalmente o IL, uma delas confinada ao IL (R52), e as duas restantes com envolvimento da parte dorsal do PL (R43) ou do córtex dorsal peduncular (R48), respectivamente. Finalmente, duas injeções envolveram principalmente o MO, uma delas quase confinada ao MO (R29), outra com envolvimento do VO (R25).

As injeções de PHA-L foram caracterizadas por um centro contendo um número variável de corpos celulares intensamente impregnados com PHA-L, indicando o centro da injeção, rodeado por um halo difuso mais extenso. Em todos os casos, a marcação anterógrada resultante foi bilateral, porém no lado ipsilateral dominante. No hemisfério contralateral uma área com maior densidade de marcação destacou-se em posição homotópica ao centro da injeção.

Em geral, nossos achados obtidos através dos experimentos de rastreamento anterógrado corroboram perfeitamente com os resultados dos experimentos de rastreamento retrógrado, confirmando que as aferências pré-frontais do AcbSh são principalmente provenientes do PL e IL.

Assim, no caso 41 em que a injeção foi restrita ao ACd (Fig. 9A), localizada dorsalmente ao PL, o AcbSh apresentou somente raríssimas fibras PHA-L+ (Fig. 9B). Nesse caso, a maioria dos axônios PHA-L+ foi encontrada na parte dorsolateral do AcbRP (Fig. 9C). O AcbC apresentou uma inervação modesta por fibras PHA-L+ que foi contínuo com uma faixa de marcação longitudinal bem definida no CPu (Fig. 9B). Cabe ressaltar que faixas longitudinais de marcação anterógrada características foram encontradas no CPu de todos os casos, confirmando a organização topográfica mediolateral peculiar das projeções pré-frontais-estriatais (ver, Berendse et al., 1992; Voorn et al., 2004).

No rato 26, a injeção de PHA-L foi perfeitamente confinada ao PL (Fig. 10A), envolvendo todas suas partes, exceto a parte mais ventral. Essa injeção resultou em

proeminente marcação anterógrada em todas as partes do AcbRP (Fig. 10C) com um plexo de fibras PHA-L+ particularmente denso encontrado na sua parte dorsal. Em contraste à intensa marcação no AcbRP, menos axônios e terminais PHA-L+ foram encontrados no restante do Acb. No AcbC e AcbSh (Fig. 10D) a marcação de PHA-L foi heterogênea e significativamente mais robusta que no caso 41 (injeção no ACd). No AcbC, um denso plexo de axônios PHA-L+ foi contínuo com forte marcação na parte dorsomedial do CPu. No AcbSh, intensa marcação para PHA-L foi encontrada na divisa com o AcbC (Fig. 10D), uma área que faz parte do IC. Outro foco de axônios PHA-L+ foi presente na parte medial do AcbSh. Em adição, fibras dispersas PHA-L+ foram notadas na região do CONE e no VERT. Em geral, em todo o Acb, os axônios PHA-L+ vindos do PFCm foram em sua maioria modestamente ramificados apresentando varicosidades ao longo do seu curso (Fig. 10B). Nos casos das injeções que focaram o IL, o padrão geral de marcação encontrados nas diferentes regiões do Acb foi diferente do encontrado no caso 26 (injeção no PL). Em geral, nesses casos a marcação por fibras PHA-L+ foi menos expressiva no AcbRP e AcbC e em todos os principais setores do Acb (AcbRP, AcbSh, AcbC) centradas em suas partes mediais.

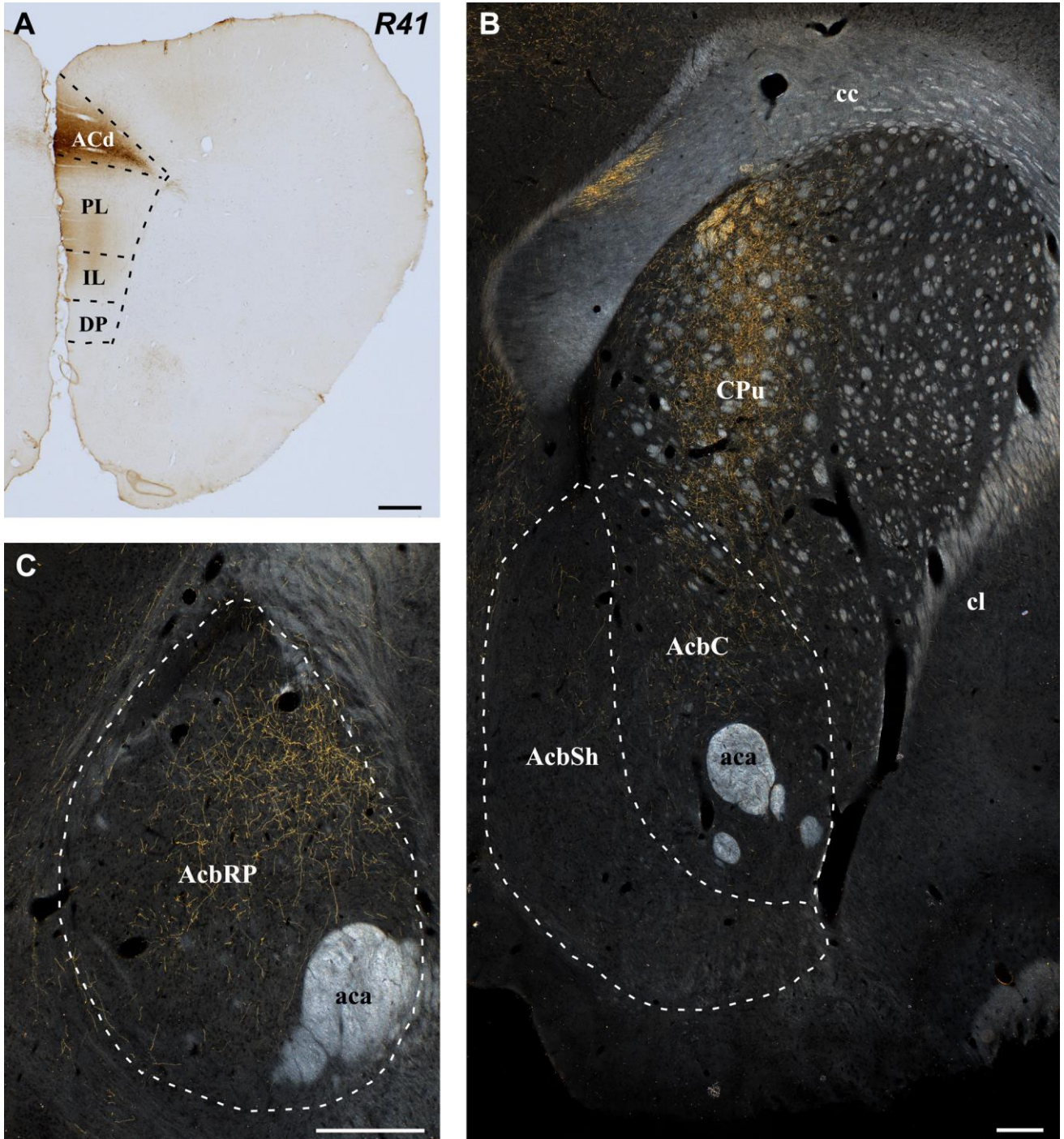
No rato 43, o centro da injeção de PHA-L foi localizado na parte dorsal do IL (Fig. 11A) com envolvimento significativo da parte ventral do PL. Novamente, a distribuição das fibras PHA-L+ foi heterogênea ao longo do Acb. No AcbRP, foi visualizada uma marcação mais intensa na região dorsomedial (Fig. 11C) com menos fibras distribuídas na região ventral. No AcbSh foi notável a grande presença de fibras PHA-L+ na parte ventromedial com destaque para a região INT (Fig. 11B). Outros focos de fibras PHA-L+ foram encontrados na região do CONE e em torno da região do IC do AcbSh. No AcbC, a inervação foi mais intensa nas regiões mais dorsais. De novo, uma densa inervação foi notável no CPu com a faixa intensamente marcada localizada medial da faixa encontrada em caso 26.

O caso 52 teve uma injeção mais restrita ao IL (Fig. 12A) quando comparado com o caso 43, resultando em densa marcação anterógrada principalmente na parte dorsomedial do AcbRP (Fig. 12C). No AcbC e AcbSh a marcação de PHA-L foi heterogênea e mais expressiva no AcbSh que no AcbC. No AcbC, notou-se que as fibras PHA-L+ se concentraram na sua parte dorsomedial. Corroborando com a topografia mediolateral, a faixa de marcação no CPu ficou ainda mais deslocada em direção medial. No AcbSh, as fibras PHA-L+ foram heterogeneamente distribuídas,

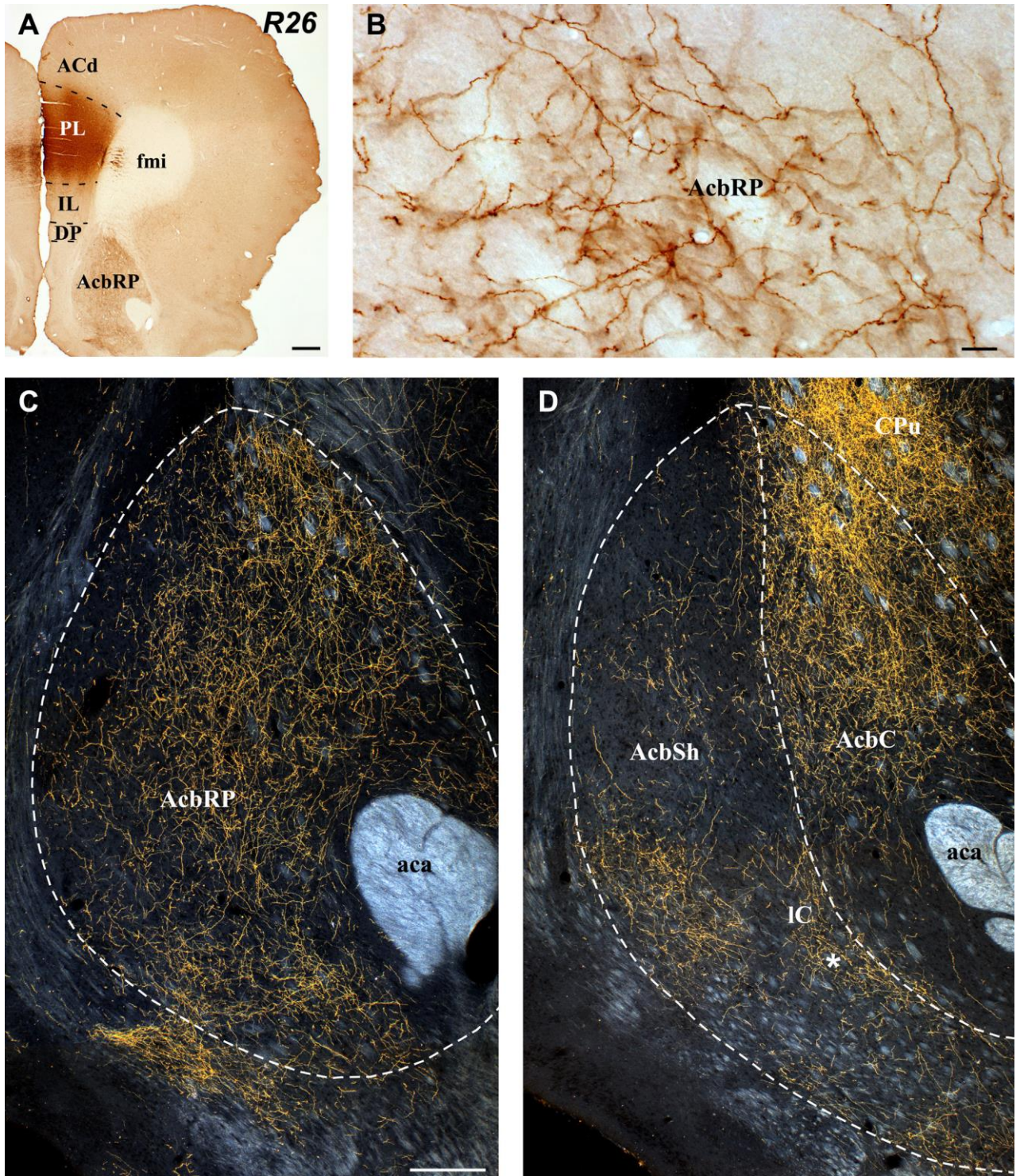


sendo que a marcação foi encontrada em maior proporção nas partes ventromediais com destaque para a região INT. Outros focos de marcação foram presente na parte ventral do CONE, na região de arco e na divisa com o AcbC , correspondente ao IC.

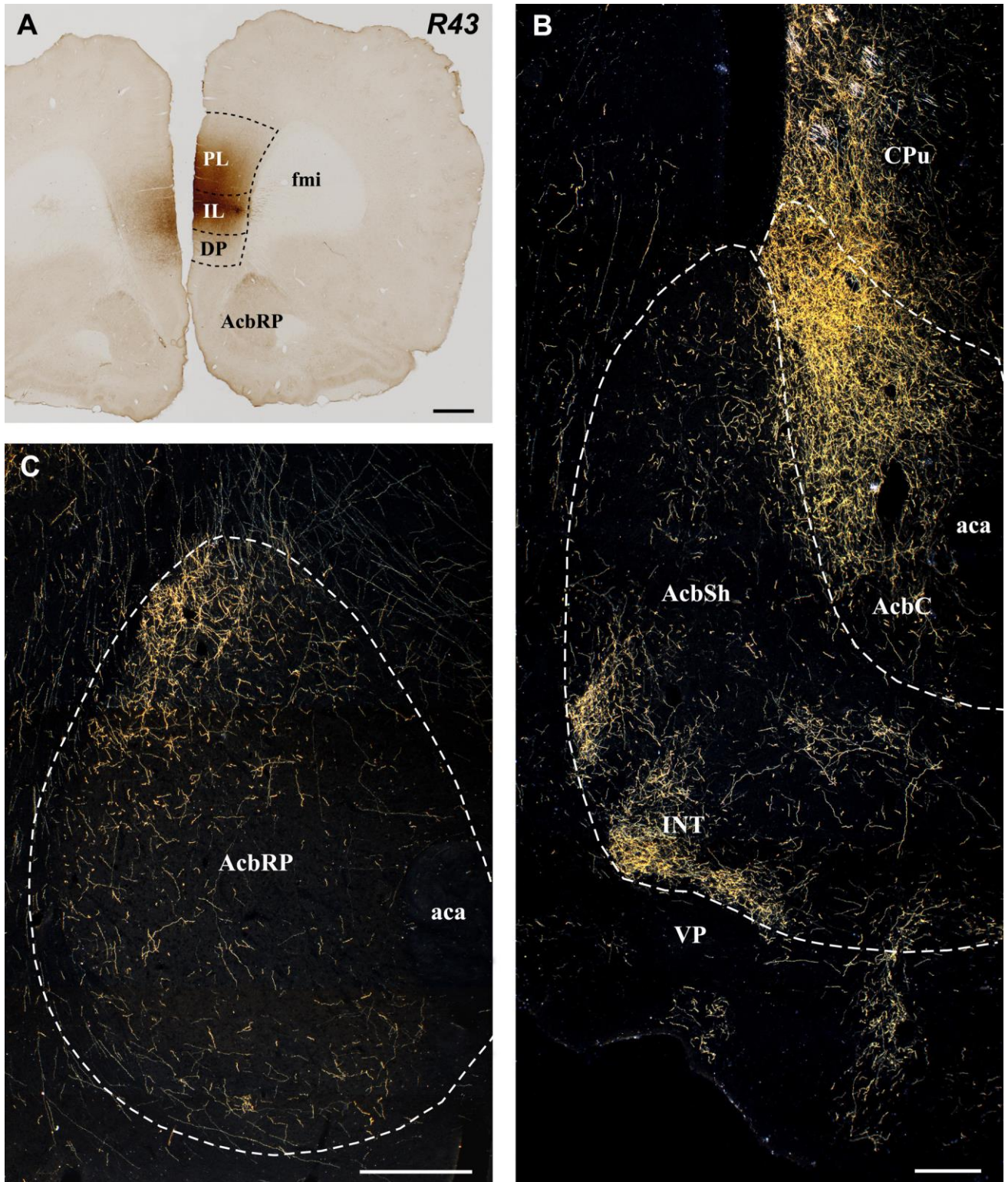
A distribuição de fibras PHA-L+ nos casos em que a injeção principalmente envolveu o MO foi bastante semelhante. O caso 25 teve uma injeção centralizada na parte lateral do MO envolvendo também parcialmente o VO (Fig.13A). O caso 29 teve uma injeção menor e mais restrita ao MO (Fig. 13B). Essas duas injeções resultaram em um padrão de marcação bastante semelhante, com consideravelmente menos axônios anterogradamente marcados em todas as partes do Acb quando comparadas com as injeções centradas no PL e IL. Assim, o AcbRP (Fig. 13C) e o AcbSh apresentaram pouquíssimas fibras imunomarcadas. No AcbSh as fibras PHA-L+ foram quase restritas as suas regiões INT e LAT (). No AcbC um moderado plexo de fibras PHA-L+ foi encontrado na sua parte dorsal, que novamente foi contínuo com uma forte marcação anterógrada no CPu.



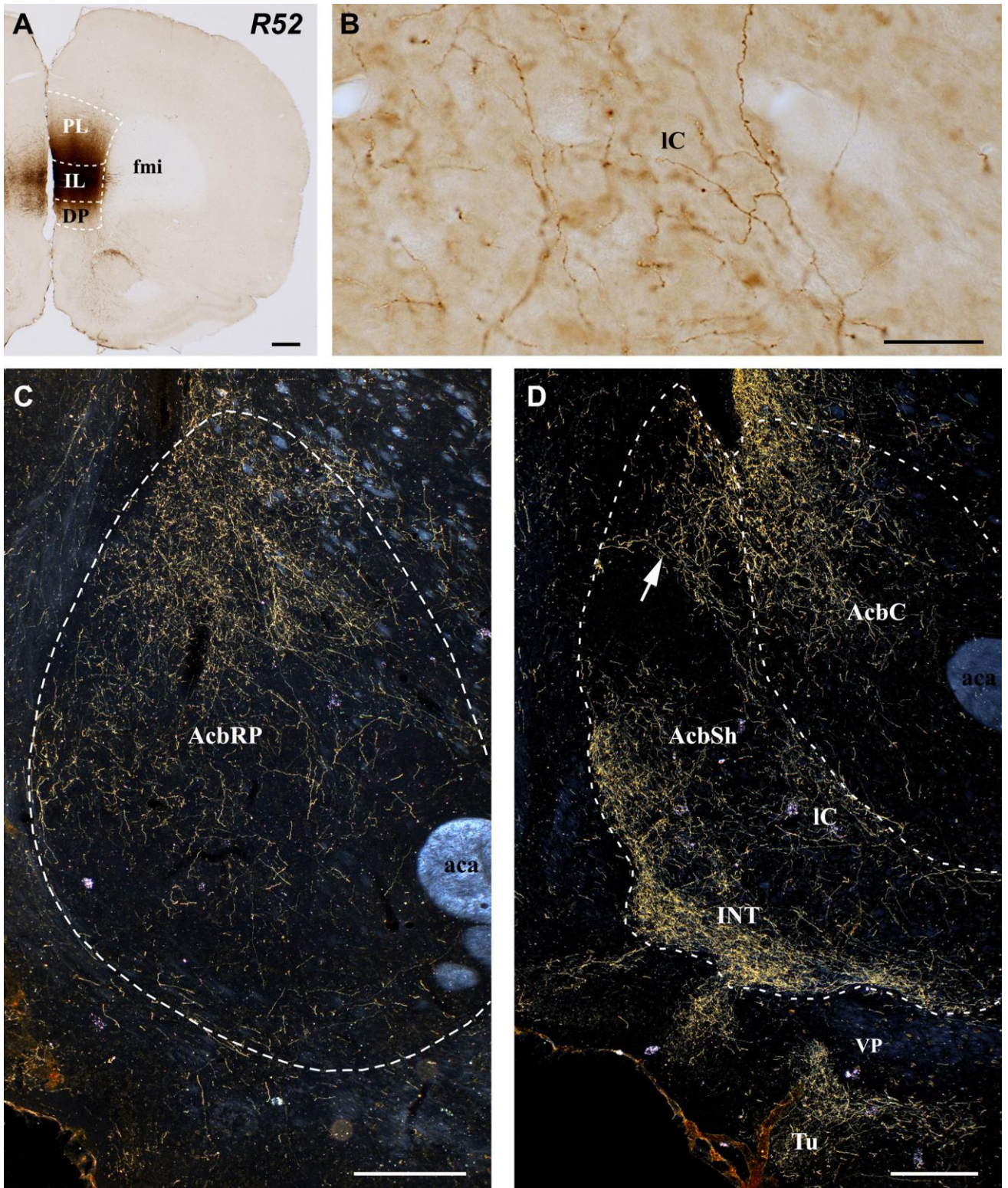
**Figura 9-** Fotomicrografias de um local de injeção de PHA-L centrada na região ACd do PFCm (**A**, **R41**), da marcação resultante desta injeção no AcbRP (**C**) e em um nível caudal do AcbSh e AcbC (**B**). Note que a as projeções do ACd são preferencialmente destinadas às regiões dorsais do AcbRP e AcbC. Notar também a faixa de marcação bem definida no CPU. Escala = 400 µm em A; 200 µm em B, 300 µm em C.



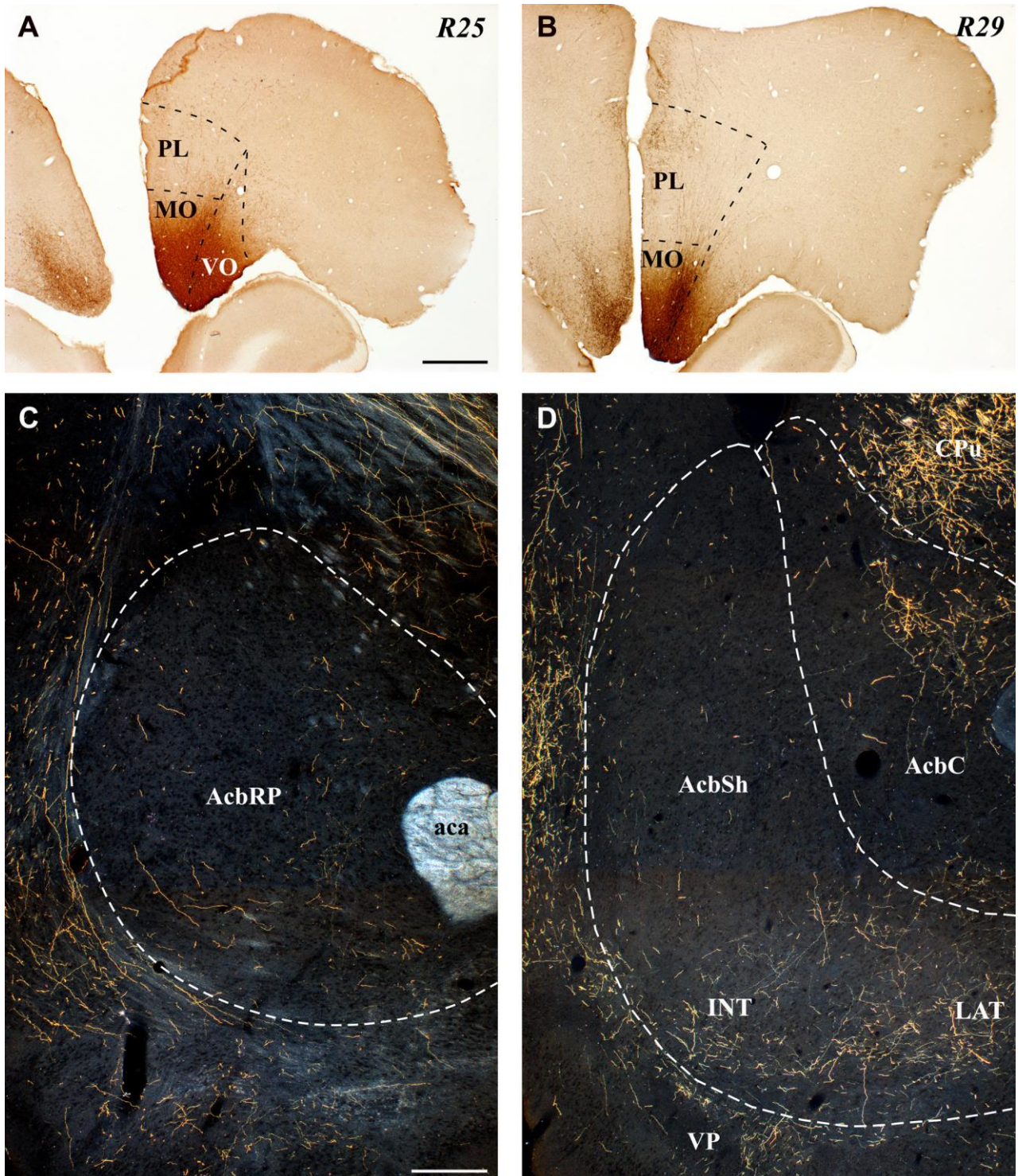
**Figura 10-** Fotomicrografias de um local de injeção de PHA-L, centrada no PL do PFCm (A, R26), da marcação resultante desta injeção no AcbRP (B, C) e em um nível caudal do AcbSh e AcbC (D). Note a densa marcação para PHA-L no AcbRP e no AcbC, assim como na divisa do AbC e AcbSh, região que corresponde ao IC (indicado por asterisco em D). Observe também a densa marcação no distrito medial do CPu em D e a morfologia varicosa dos axônios amplificados em B. Escala = 400  $\mu$ m em A; 20  $\mu$ m em B, 300  $\mu$ m em C (aplicável também em D).



**Figura 11-** Fotomicrografias de um local de injeção de PHA-L, centradas no IL do PFCm com envolvimento do PL (**A**, **R43**), da marcação resultante desta injeção no AcbRP (**C**) e em um nível caudal do AcbSh e AcbC (**B**). Note que as projeções do IL apresentam uma distribuição heterogênea no Acb, sendo que são destinadas principalmente às regiões dorsais do AcbRP e AcbC. Note também a densa marcação no distrito medial do CPu e na sub-região INT do AcbSh. Escala = 400 µm em A; 200 µm em B, 300 µm em C.



**Figura 12-** Fotomicrografias de um local de injeção de PHA-L, centrada no IL do PFCm (**A**, **R52**), da marcação resultante desta injeção no AcbRP (**C**) e em um nível caudal do AcbSh e AcbC (**D**). Note a intensa marcação para PHA-L na região INT do AcbSh, e na divisa entre o AcbC e AcbSh, região que corresponde ao IC. Note também as fibras PHA-L+ na região do “arco” (indicado pela seta branca em **D**) e a morfologia varicosa dos axônios anterógradamente marcados na região do IC em **B**. Escala = 400  $\mu$ m em **A**; 300  $\mu$ m em **B**, 200  $\mu$ m em **C** (aplicável também em **D**).



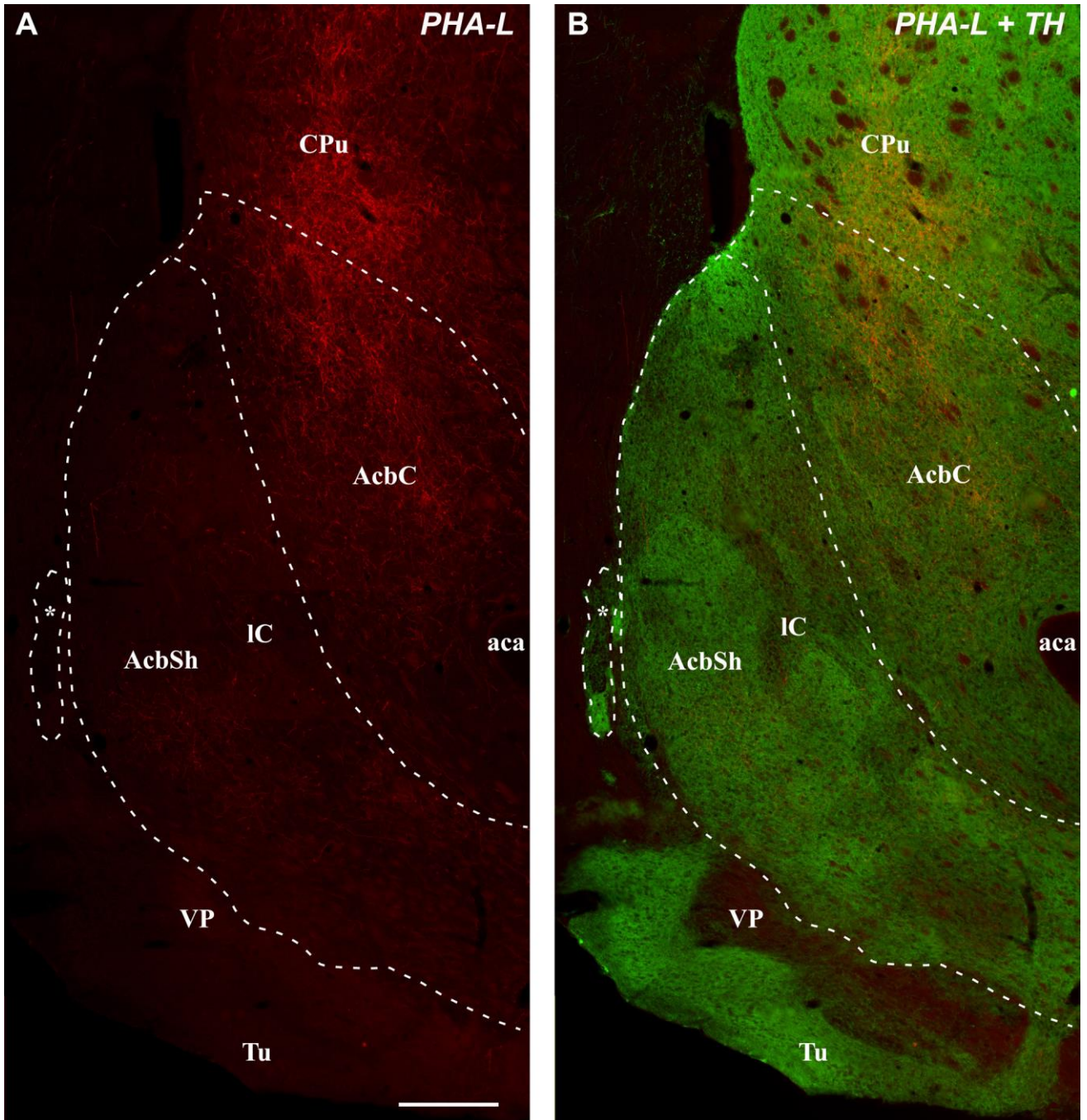
**Figura 13-** Fotomicrografias de dois locais de injeção de PHA-L, centradas na divisa entre MO e VO (A, R25) e no MO (B, R29), respectivamente e da marcação resultante em rato 25 no AcbRP (C) e em um nível caudal do AcbSh e AcbC (D). Note que as projeções do MO/VO apresentam uma distribuição esparsa ao longo do eixo rostro-caudal do Acb, sendo que no AcbSh são preferencialmente direcionadas às regiões INT e LAT. Escala = 400  $\mu$ m em A (aplicável também em B); 300  $\mu$ m em C (aplicável também em D).

### **4.2.3 Experimentos de dupla marcação para PHA-L e TH**

A relação entre axônios pré-frontais corticais e a compartimentalização do Acb foi também estudada em dois casos (*R26* e *R43*) através de dupla-marcações de imunofluorescência para PHA-L e TH. Esses experimentos foram realizados com o intuito de relacionar melhor a inervação vinda do PFC com os corredores delineados em nosso estudo.

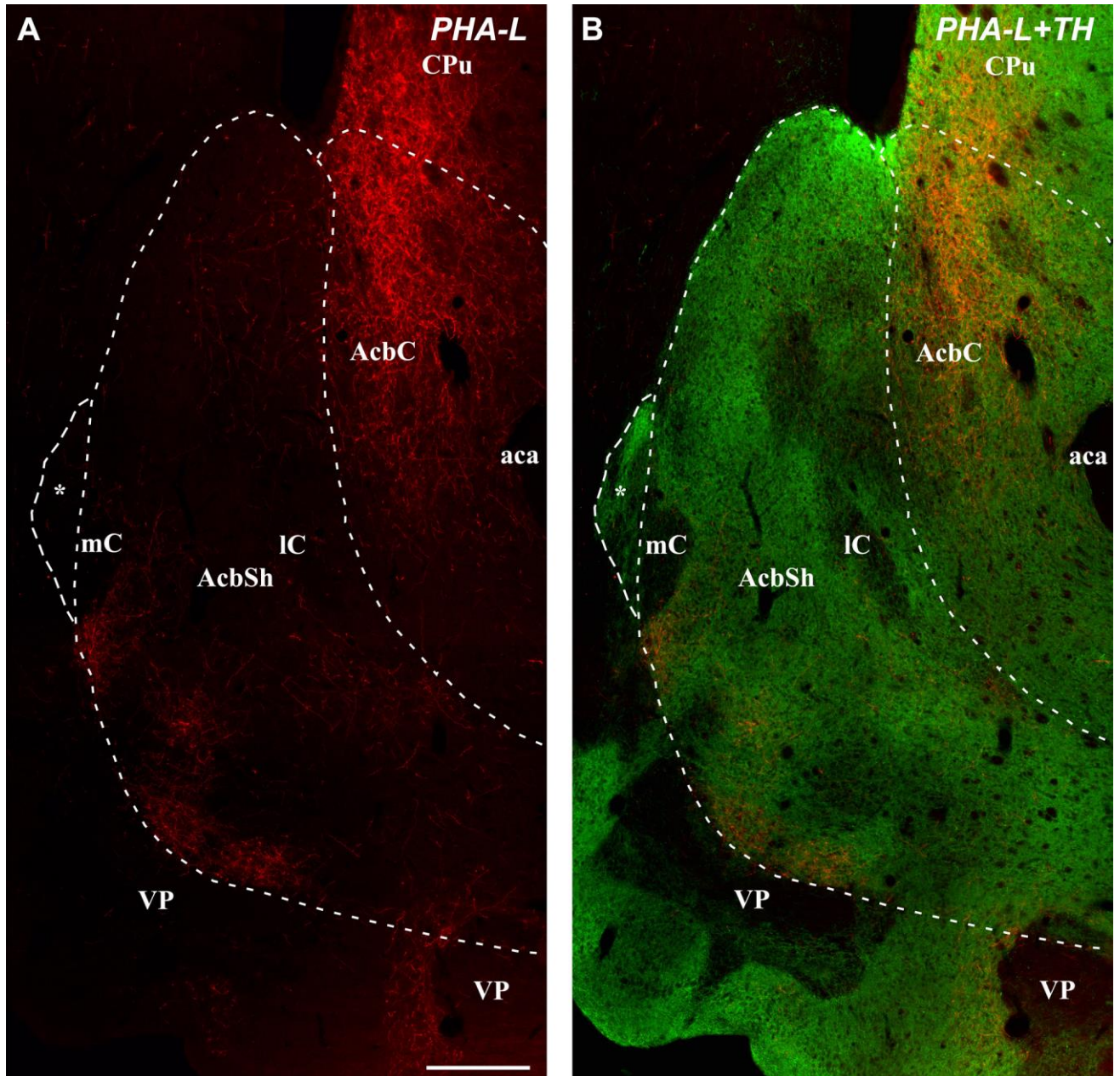
Em geral, os resultados desses experimentos de dupla-marcação acrescentaram pouca informação adicional se comparados com os resultados já obtidos através de marcação simples para PHA-L, confirmando que as aferências pré-frontais apresentam pouca relação com o sistema de corredores.

Os resultados da imunomarcação no caso 26 em qual a injeção de PHA-L foi centrada no PL indicam que as fibras PHA-L+ pouco coincidem com as regiões com fraca imunorreatividade para TH. Nesse caso as fibras PHA-L+ apresentam uma distribuição esparsa no AcbSh sendo preferencialmente destinadas às regiões dorsais do AcbC. O caso 43, no qual a injeção de PHA-L foi centrada no IL do PFC apresentou resultados divergentes. Enquanto, a região do mC foi claramente evitada pelas fibras PHA-L+, algumas delas foram direcionadas ao IC.



**Figura 14-** Fotomicrografias da dupla marcação de imunofluorescência para PHA-L(A, fluorescência vermelha) e TH (fluorescência verde) em um nível caudal do AcbSh e AcbC, resultante da injeção de PHA-L no PL do PFC (**R26**). Notar que as fibras PHA-L+ pouco coincidem com as regiões com fraca imunoreatividade para TH e apresentam uma distribuição esparsa no AcbSh sendo preferencialmente destinadas às regiões dorsais do AcbC. Escala = 200  $\mu$ m em A (aplicável também em B).





**Figura 15-** Fotomicrografias da dupla marcação de imunofluorescência para PHA-L(A, fluorescência vermelha) e TH (fluorescência verde) em um nível caudal do AcbSh e AcbC, resultante da injeção de PHA-L no IL do PFC (**R43**). Notar que as fibras PHA-L+ são preferencialmente destinadas às regiões dorsais do AcbC e à região INT do AcbSh as vezes circundando a área dos corredores. Escala = 200  $\mu$ m em A (aplicável também em B).

## 5 DISCUSSÃO

Tendo em vista o fato que o AcbSh é uma estrutura altamente heterogênea, descrevemos aqui que as regiões intensamente imunomarcadas para GluA2/3 não somente coincidem com aglomerados celulares isolados e com áreas fracamente inervadas por axônios Calr+ e TH+, mas também formam um complexo sistema de corredores no AcbSh caudal. Em adição, enquanto no restante das subáreas do Acb somente uma minoria de neurônios GluA2/3+ não contém DARPP-32, a porcentagem de neurônios que não contém DARPP-32 foi maior nos corredores. Adicionalmente, detectamos que em camundongos, regiões equivalentes aos corredores, são fracamente inervadas por axônios DAT+. No outro lado, os resultados de nossos experimentos de rastreamento anterógrado mostraram que as aferências pré-frontais não são especificamente direcionadas aos corredores. Nossos achados indicam que os corredores aqui descritos são neuroquimicamente bastante distintos dos outros compartimentos do AcbSh e ressaltam a importância das interações DA-Glu no Acb. Esses achados serão discutidos em relação aos resultados de prévios estudos imunistoquímicos e hodológicos que investigaram a compartimentalização do Acb assim como os mecanismos que governam a neurotransmissão dopaminérgica e glutamatérgica nos corredores.

### 5.1 Distribuição das subunidades GluA2/3 e GluA2 no Acb

A distribuição e co-localização das principais subunidades dos iGluRs dos tipos AMPA e NMDA em diferentes populações neuronais estriatais de ratos tem sido descrita em vários estudos anteriores (BERNARD; SOMOGYI; BOLAM,1997; BERNARD; BOLAM, 1998; CHEN; VEENMAN; REINER,1996; DENG et al., 2007; KWOK et al., 1997; TALLAKSEN-GREENE, ALBIN, 1994;). No entanto, quase todos esses estudos foram realizados no CPu sendo que não existe um estudo imunistoquímico abrangente a respeito da distribuição de GluA2/3 e GluA2 no Acb. Em geral, grandes partes dos nossos achados estão em concordância com os estudos citados acima e os estendem em alguns importantes aspectos. As principais descobertas reveladas neste estudo incluem a distribuição diferencial dos corpos celulares GluA2/3+ no AcbSh caudal e o fato que os neurônios GluA2/3+ são particularmente enriquecidos em compartimentos específicos do AcbSh caudal que

correspondem aos corredores. Em todos os estudos acima mencionados, GluA2/3 e/ou GluA2 têm sido descritas similarmente distribuídas por todas as partes do estriado. Dado que encontramos uma distribuição muito semelhante para GluA2 e GluA2/3, os nossos achados acrescentam que a maioria dos MSNs no Acb contém a subunidade GluA2 (ver DENG et al., 2007; LAVERGHETTA et al., 2006). Os receptores de AMPA são tetrâmeros compostos de combinações distintas das subunidades GluA1-4 (KEW; KEMP, 2005; CULL-CANDY; KELLY; FARRANT, 2006). É importante notar que a presença da subunidade GluA2 em tetrâmeros confere baixa permeabilidade ao  $Ca^{2+}$  nestes receptores (GREGER; KHATRI; ZIFF, 2002). A abundância de GluA2 também é indicada por estudos moleculares quantitativos sobre a composição das subunidades de receptores do tipo AMPA (DINGLELINE et al., 1999; HOLLMANN; HARTLEY; HEINEMANN, 1991; REIMERS; MILOVANOVIC; WOLF, 2011). No entanto, os resultados de um recente estudo conduzido em distintas regiões do cérebro envolvidas com a dependência, incluindo o Acb indicam que GluA2 pode parcialmente existir como dímeros no Acb ao invés de receptores funcionais tetraméricos (REIMERS; MILOVANOVIC; WOLF, 2011).

## **5.2 Distribuição de DARPP-32 e sua co-localização com GluA2/3**

Embora nenhum estudo imunistoquímico sobre a distribuição de DARPP-32 tenha focado especificamente o Acb, os atuais resultados estão em linha com as principais conclusões dos prévios estudos imunistoquímicos (OUIMET et al., 1984; OUIMET; GREENGARD, 1990) ou estudos de hibridização in situ (SCHALLING et al., 1990) que descrevem a distribuição e a localização celular de DARPP-32 no cérebro de ratos. Conforme observado nestes estudos, corpos celulares e neurópila DARPP-32+ foram enriquecidos em todas as partes do estriado, incluindo o Acb. Além disso, conforme descrito no CPu (OUIMET; GREENGARD, 1990), neurônios DARPP-32+ no Acb apresentam características morfológicas típicas de MSNs. Dado que existem evidências que quase todos os MSNs do CPu e do Acb, contém DARPP-32, independentemente se eles expressam receptores D1 ou D2, (BERTRAN-GONZALEZ et al., 2008; LANGLEY et al., 1997; MATAMALES et al., 2009; OUIMET et al., 1998), foi utilizada dupla-marcação de imunofluorescência

para DARPP-32 e GluA2/3 para esclarecer, em que grau, as subunidades GluA2/3 estão presentes em MSNs.

Estudos sobre a co-localização de diferentes subunidades dos iGluRs, incluindo GluA2/3, com a fosfoproteína DARPP-32 estão restritos a uma breve descrição generalista no cérebro de ratos (WANG et al., 2004) e uma descrição detalhada nos gânglios da base de aves (LAVERGHETTA et al., 2006). Em geral, os nossos resultados estão de acordo com os principais resultados dos estudos acima mencionados, mostrando que a grande maioria (mais que 99%) dos neurônios DARPP-32+ no Acb também continham GluA2/3. O fato que encontramos uma pequena porcentagem (cerca de 7%) de neurônios GluA2/3+ que não continham DARPP-32, pode ser explicado pela falta da expressão de DARPP-32 em interneurônios do estriado. No estriado dorsal, a grande maioria (cerca de 90-95%) são neurônios GABAérgicos de projeção referidos como MSNs (DIFIGLIA, 1985; GRAVELAND; GERFEN, 2004; KEMP; POWELL, 1971) que são modulados de uma maneira complexa por diferentes tipos de interneurônios, incluindo três tipos de interneurônios GABAérgicos que co-expressam parvalbumina, Calr ou somatostatina, respectivamente, bem como um tipo de interneurônio colinérgico. (KAWAGUCHI et al., 1995; KAWAGUCHI, 1997; TEPPER; BOLAM, 2004; WILSON, 2007). Recentemente, foi demonstrado através de estudos imunoistoquímicos e morfométricos, que esses quatro tipos diferentes de interneurônios não expressam DARPP-32 (BERTRAN-GONZALEZ et al., 2008; MATAMALES, 2009). Todavia, a maior parte, porém não todos os interneurônios no CPu contém GluA2/3 (CHEN; VEENMAN; REINER, 1996; DENG et al., 2007; LAVERGHETTA et al., 2006).

Nós podemos apenas especular sobre o fato que até 30% dos neurônios GluA2/3 no IC/mC e na parte basal do AcbRP não continha DARPP-32. Não se sabe se estes neurônios não expressam DARPP-32, ou se a concentração de DARPP-32 é inferior ao limite de detecção de métodos imunoistoquímicos, ainda não estão esclarecidos. É pouco provável que os neurônios simples marcados para GluA2/3 representam interneurônios, uma vez que nenhum dos diferentes tipos de interneurônios no Acb foi mostrado ser especificamente enriquecido nestas áreas (HUSSAIN; JOHNSON; TOTTERDELL, 1996; MEREDITH et al., 1989; ZAHM et al., 2003). Outra possibilidade intrigante é que os neurônios nas áreas de alta densidade celular não são, ou são apenas em parte de origem estriatal. Nesse sentido, a existência de

células palidais no estriado de aves foi convincentemente documentada com marcadores genéticos (ABELLÁN; MEDINA, 2009).

Em seu estudo pioneiro sobre aglomerados celulares do Acb, Herkenham et al. (1984), argumentaram que estes neurônios poderiam ser considerados como um tipo especializado de MSNs. Esta visão baseou-se em suas observações que os neurônios impregnados por Golgi dos conglomerados celulares exibem uma aparência similar aos MSNs, mas tendem a ser menores que seus homólogos em outras áreas do estriado (ver também MEREDITH et al., 1992). Em suma, com exceção dos aglomerados celulares que parecem estar ausentes no CPu (CURRAN; WATSON, 1995; HERKENHAM; EDLEY; STUART, 1984), nossos resultados sobre a expressão de DARPP-32 e sua co-localização com GluA2/3 apresentam uma evidência adicional (ver BERTRAN-GONZALEZ, 2008) que a composição da população neuronal do Acb é essencialmente semelhante à do CPu. Além disso, a presença de iGluRs do tipo AMPA em praticamente todos os MSNs DARPP-32+ do Acb ressalta a importância das interações DA-Glu no Acb e está em linha com os achados de estudos eletrofisiológicos e de microscopia eletrônica demonstrando a convergência de entradas dopaminérgicas e glutamatérgicas nos MSNs do estriado dorsal e ventral.

Assim, vários estudos ultra-estruturais (FREUND; POWELL; SMITH, 1984; MOSS; BOLAM., 2008; PINTO; JANKOWSKI; SESACK, 2003; SESACK; PICKEL, 1990, 1992; TOTTERDELL; SMITH, 1989) tem mostrado que predominantemente terminais córtico-estriatais e tálamo-estriatais, mas também em menor grau terminais do hipocampo e da amígdala basal convergem com terminais TH+ nos espinhos e hastes dendríticas de MSNs no Acb e CPu (para revisões, ver MORALES; PICKEL, 2012; SESACK et al., 2003). Além disso, desde os estudos pioneiros de Cepeda et al. (1993), uma série de estudos eletrofisiológicos têm demonstrado que a atividade dos MSNs do Acb e do CPu é regulada de forma complexa por entradas glutamatérgicas e dopaminérgicas convergentes. (CALABRESI et al., 2007; NICOLA et al., 2000; O' DONELL; GRACE, 1996; SURMEIER et al., 2007; WEST et al., 2003).

### 5.3 Compartimentalização do núcleo accumbens

Os resultados de prévios estudos histoquímicos e imunoistoquímicos (HARTIG et al., 2003; HERKENHAM; EDLEY; STUART,1984; JANSSON et al., 1999; SEIFERT et al., 1998; TODTENKOPF; STELLAR, 2000; VOORN et al., 1986;. 1989), assim como de estudos de rastreamento neural (BERENDSE; GROENEWEGEN; LOHMAN; 1992; GROENEWEGEN; WRIGHT, 1995; GROENEWEGEN et al., 1999), tem indicado que o AcbSh é uma estrutura altamente complexa, que pode ser subdividida em compartimentos distintos, zonas de transição, e microcircuitos. Em geral, muitos dos nossos achados sobre possíveis subdivisões do AcbSh estão em concordância com os estudos mencionados, e os estendem em vários aspectos. Aqui mostramos pela primeira vez que as áreas de alta densidade celular que contém grande quantidade de corpos celulares GluA2/3+ não apenas colocam com aglomerados celulares isolados, mas formam uma rede contínua de corredores que coincidem com áreas pouco inervadas por axônios TH+ e quase desprovidas de axônios Calr+. A distribuição diferencial de DA ou TH no AcbSh e sua estreita relação com aglomerados celulares isolados fracamente inervados para TH já foram descritas em uma série de estudos anteriores (HERKENHAM; EDLEY; STUART,1984; VOORN et al., 1986, 1989). Seifert et al. (1998) demonstrou que as zonas pobres em TH/Calr no AcbSh caudal não estão restritas aos aglomerados celulares isolados, mas formam dois corredores, denominados IC e mC. Os presentes achados confirmaram seus resultados e indicam que este sistema de corredores é mais complexo e amplo que assumido anteriormente. Assim, em nossa opinião, o IC e mC estão interligados em alguns níveis do AcbSh caudal através da característica região do arco fracamente imunomarcada para TH, formando a interconexão mais proeminente entre eles. Por conseguinte, não consideramos a região do arco uma sub-região separada do AcbSh, conforme proposto por Todtenkopf e Stellar (2000), mas uma parte integral do sistema de corredores ricos em GluA2/3 e pobres em TH e Calr descritos aqui.

Nossa visão de um sistema de corredores contínuo no AcbSh caudal concorda com um estudo imunoistoquímico conduzido por Jansson et al. (1999), que descreveram corredores pobres em TH no AcbSh que são contínuos em direção rostro-caudal e interligados através de pontes celulares. Em adição, a existência de compartimentos distintos em torno da região do CONE do AcbSh também é apoiada

pelos resultados de uma série de estudos de rastreamento neural do grupo do Groenewegen (BERENDSE; GROENEWEGEN; LOHMAN; 1992;. WRIGHT; GROENEWEGEN 1995; WRIGHT et al., 1996). Examinando especificamente os padrões de terminação de aferências corticais, talâmicas e amigdalóides do Acb, os estudos acima mencionados demonstraram que diferentes partes do AcbSh e AcbC têm distintos padrões de entradas e saídas. É importante notar que no AcbSh, foi previamente descrito um conjunto de entradas específicas que são relacionadas ou evitam os corredores descritos aqui. Assim, os resultados de estudos anteriores de rastreamento anterógrado indicaram que os axônios que emergem da parte ventral do PL e da amídala basal parvicelular são preferencialmente direcionados aos aglomerados celulares fracamente imunorreativos para encefalina e áreas em torno da região do CONE do AcbSh (BERENDSE; GROENEWEGEN; LOHMAN; 1992;.WRIGHT et al., 1996;.ver Fig. 12 de WRIGHT e GROENEWEGEN, 1995 para resumo destas conexões).

Para especificar se as aferências do PFC para o Acb são realmente direcionadas ao sistema de corredores, reexaminamos estas projeções através de métodos de rastreamento neural. Em geral, o padrão da marcação anterógrada observado em nossos casos resultante de injeções em distintas sub-áreas do PFCm é bastante semelhante àquele descrito em estudos anteriores examinando as projeções dessas áreas pré-frontais para o Acb (BROG et al., 1993; DING et al., 2001; HOOVER; VERTES, 2011; SESACK et al., 1989; VERTES, 2004). Assim, conforme anteriormente descrito observamos que o AcbRP e AcbC são massivamente inervados pelo PL, enquanto as aferências do IL são seletivamente direcionadas para o setor caudo-medial do AcbSh (ver SESACK et al., 1989; VERTES, 2004). De forma importante, todas as nossas injeções também confirmaram e sublinharam a intrigante topografia médio-lateral das projeções pré-frontais-estriatais descritos anteriormente (BERENDSE; GROENEWEGEN; LOHMAN; 1992; MCGEORGE; FAULL, 1989; VOORN et al., 2004). Por outro lado, nossos dados confirmaram apenas parcialmente os achados de estudos anteriores postulando que parte das aferências oriundas do PFC é seletivamente direcionada ou evita os corredores (BERENDSE; GROENEWEGEN; LOHMAN; 1992; WRIGHT et al., 1996; ver Fig. 12 de Wright e Groenewegen, 1995 para resumo dessas conexões). Nesse sentido, os resultados de Berendse et al. (1992), indicaram que ao longo do AcbSh, fibras provenientes do PL se concentram em áreas de alta densidade celular (equivalente

aos corredores) enquanto fibras oriundas do IL evitam essas áreas. Nossos achados, não corroboram com essa descrição. Assim, observamos que uma parte das aferências vindas do PL inerva o IC, enquanto axônios vindos do IL claramente evitam o mC, porém inervam a região do CONE. Em nossa opinião, não existe uma inervação preferencial dos corredores por distintas sub-áreas do PFC. Nossos achados claramente confirmaram que a inervação do Acb e do estriado dorsal é organizada em uma maneira topográfica intrigante, sendo que o padrão concreto de inervação por fibras pré-frontais parece menos dependente da sub-área injetada que da exata localização e extensão da injeção na direção médio-lateral e dorso-ventral. Por outro lado, foi mostrado anteriormente que os axônios provenientes do tálamo anterior claramente evitam os corredores e preferencialmente terminam no CONE do AcbSh (HERKENHAM; EDLEY; STUART, 1984;. WRIGHT; GROENEWEGEN, 1995). Tendo em vista que o núcleo paraventricular é a principal fonte talâmica do AcbSh (BERENDSE; GROENEWEGEN, 1990; BROG et al., 1993; MOGA et al., 1995) e que tem sido demonstrado que a maioria da inervação calretinérgica do Acb é derivada deste núcleo (BUBSER et al., 2000), uma inervação preferencial por fibras talâmicas é também indicada por nossos resultados da distribuição de axônios Calr+ no AcbSh. Assim, enquanto o IC e mC foram praticamente desprovidos de axônios Calr+, a região do CONE foi fortemente inervada (ver SEIFERT et al., 1998). Estes achados são corroborados pelos resultados de um estudo imunistoquímico que examinou a distribuição de diferentes subtipos de VGLUTs (HARTIG et al., 2003). Neste estudo, a imunorreatividade para VGLUT2 foi bastante alta no CONE, enquanto a imunorreatividade para VGLUT1 delineou o IC e mC. Dado que VGLUT2 é em sua maioria expresso em neurônios do tálamo e do tronco cerebral (FREMEAU et al., 2001), a distribuição diferencial de VGLUT1 deve refletir a distribuição de entradas talâmicas no AcbSh.

Outra possibilidade intrigante, porém altamente possível, é que neurônios glutamatérgicos da área tegmental ventral (VTA) formam outra fonte principal das entradas glutamatérgicas do Acb. Recentemente, foram descritos neurônios puramente glutamatérgicos na VTA que são caracterizados pela expressão de VGLUT2 e são em sua maioria encontrados perto da linha mediana (KAWANO et al., 2006; NAIR-ROBERTS et al., 2008; YAMAGUCHI et al., 2007;). Entretanto, foi demonstrado que esses neurônios VGLUT2+ enviam projeções funcionais excitatórias



para alvos importantes, como o PFC e o Acb (GORELOWA et al., 2012; HNASKO et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2011). De forma interessante, no AcbSh, as projeções provenientes especificadamente de neurônios glutamatérgicos/não-dopaminérgicos da VTA parecem estar direcionadas preferencialmente aos corredores. Assim, numa recente publicação pioneira usando camundongos transgênicos, Hnasko et al. (2012) mostraram em uma das suas figuras (Figura. 4) que no AcbSh caudal, axônios VGLUT2+ provenientes da VTA evitam a região do CONE e inervam preferencialmente os corredores e o VERT. Visto que se trata de uma técnica inovadora (TSAI et al., 2009) que, quando bem feita, é altamente eficiente para marcar todas as projeções de uma população específica de neurônios, esses achados indicam que os corredores são, como o restante do Acb, alvo preferencial de projeções da VTA, porém não de neurônios dopaminérgicos, mas glutamatérgicos.

#### **5.4 Considerações funcionais**

Em suma, nossos resultados sobre a distribuição de GluA2/3 dão uma maior evidência para o conceito que o AcbSh caudal constitui uma coleção de conjuntos neuronais com padrões de conexões, características funcionais e neuroquímicas distintas (GROENEWEGEN et al., 1999; PENNARTZ; GROENEWEGEN; LOPES DA SILVA, 1994). É tentador especular que a neurotransmissão dopaminérgica e glutamatérgica nos corredores possa ser governada por outros mecanismos que no restante do Acb. Baseado nas observações que zonas pobres em TH no AcbSh coincidem com áreas exibindo fraca imunoreatividade para o DAT assim como o receptor D2, mas forte imunoreatividade para o receptor D1. Jansson et al. (1999) sugeriu que a transmissão dopaminérgica nestes corredores pode ocorrer principalmente através de transmissão por volume (VT), baseada na difusão lenta da DA nos corredores pobres em TH (para revisão ver AGNATI et al., 1995; ZOLI et al., 1999). Nossos achados preliminares sobre a distribuição do DAT em camundongos geneticamente modificados, estão plenamente em acordo com os resultados em ratos, mostrando que as regiões correspondentes ao mC e IC são fracamente inervadas por axônios DAT+. De forma importante, esses achados indicam que o sistema de corredores também está presente em outra espécie de roedores e

sublinham um possível papel predominante para a transmissão por volume nos corredores.

No passado, a neurotransmissão no estriado era predominantemente considerada como um fenômeno sináptico. Esta visão era baseada nos resultados de estudos ultraestruturais em que uma configuração de tríade altamente característica de entradas excitatórias nas extremidades dos espinhos dendríticos e entradas dopaminérgicas nos espinhos dendríticos de MSNs tem sido destacadas e discutidas como o substrato morfológico para ações DA espacialmente localizadas em sinapses corticais e tálamoestriatais (para revisão, ver MOSS; BOLAM, 2010). Contudo, atualmente existem fortes evidências que a transmissão por volume pode ser o modo predominante de transmissão dopaminérgica no estriado (para revisão ver, ABUTHNOTT; WICKENS, 2007; DESCARRIES et al., 2008; RICE; CRAGG, 2008; MOSS; BOLAM, 2010; RICE; PATEL; CRAGG, 2011). Esta visão é baseada em resultados de estudos ultra-estruturais, demonstrando uma ampla distribuição extrassináptica de receptores do tipo D1 (YUNG et al., 1995) e D2 (WANG; PICKEL, 2002) no CPu. Outras fortes evidências para um modo de sinalização dopaminérgica não seletiva, e baseada na transmissão por volume, vêm de um recente estudo quantitativo de microscopia eletrônica conduzido no estriado dorsolateral (MOSS; BOLAM, 2008).

Examinando a relação de terminais axonais VGLUT1+ e VGLUT2+ com sinapses e posições TH+, estes autores descreveram: 1) que apenas uma pequena fração (9%) dos espinhos dendríticos contatados por terminais corticais ou talâmicos também recebeu entradas sinápticas de um terminal axônico dopaminérgico e 2.) que a inervação do estriado por axônios dopaminérgicos é tão densa que todas as microestruturas no estriado estão a aproximadamente 1  $\mu$ m de um sítio de liberação da DA, e portanto, ao alcance de concentrações de DA que transbordam da fenda sináptica e são suficientes para estimular receptores de DA de alta e baixa afinidade (RICE; CRAGG, 2008). Apesar destas importantes evidências apontando que a DA age por meio de transmissão por volume em todas as áreas do estriado, os corredores descritos no presente estudo podem, todavia, constituir compartimentos neuroquímicos altamente especializados em que a cinética da liberação e recaptação da DA podem ser diferentes do restante do Acb. Assim, Jansson et al. (1999) relatou uma fraca imunorreatividade para DAT em regiões pobres em TH.

Dado que o DAT não funciona como portão para o excesso de DA nos locais de liberação, mas pode regular o tempo de vida da DA liberada (CRAGG; RICE, 2004; RICE; CRAGG, 2008), uma ação mais persistente de DA pode ocorrer nos corredores. Em favor de tal visão, um estudo voltamétrico mostrou uma lenta e persistente mudança DA em resposta a novidade se comparado ao restante do Acb, principalmente na região da divisa entre o AcbSh e AcbC (REBEC et al., 1997). Esta região, às vezes chamado de Acb “shore” (PRINSSEN et al., 1994), sem dúvida, parcialmente se sobrepõe ao IC.

Podemos apenas especular sobre o aglomerado de corpos celulares GluA2/3+ nos corredores. É tentador especular que as áreas intensamente marcadas para GluA2/3 podem ser interligadas por conexinas, que poderiam sincronizar suas eferências. No entanto, mesmo considerando que agora existem evidências que as conexinas estão presentes no Acb e podem desempenhar um papel em mecanismos de recompensa (KOKAROTSEVA et al., 2009; MC CRACKEN et al, 2005; ONN; GRACE, 2000), esta hipótese ainda necessita de confirmação anatômica e eletrofisiológica. Em suma, nossos resultados esclarecem a compartimentalização do Acb delineando uma rede complexa de corredores neuroquimicamente distintos no AcbSh caudal.

No entanto, estudos hodológicos, farmacológicos, neuroquímicos e de expressão genética que visem especificamente este sistema de corredores são necessários para esclarecer seu exato papel funcional.

## 6 CONCLUSÕES

Em geral, nossos resultados mostram que GluA2/3 é um marcador celular confiável para delinear um sistema complexo de corredores no AcbSh caudal. Nossos dados sobre a distribuição de TH, Calr, DARPP-32 e DAT no AcbSh caudal indicam que esse sistema de corredores provavelmente constitui um compartimento neuroquímico altamente especializado do AcbSh em que a cinética da liberação e recaptação da DA é diferente do restante do Acb. Nossos dados a respeito da terminação das aferências pré-frontais no Acb indicam que o compartimento dos corredores não é preferencialmente inervado por axônios oriundos do PFC.

## REFERÊNCIAS\*

- ABELLAN, A.; MEDINA, L. Subdivisions and derivatives of the chicken subpallium based on expression of LIM and other regulatory genes and markers of neuron subpopulations during development. **J. Comp. Neurol.**, v. 515, n. 4, p. 465-501, 2009.
- AGNATI, L. F.; ZOLI, M.; STRÖMBERG, I.; FUXE, K. Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. **Neuroscience**, v. 69, n. 3, p. 711-726, 1995.
- ARBUTHNOTT, G. W.; WICKENS, J. Space, time and dopamine. **Trends Neurosci.**, v. 30, n. 2, p. 62-69, 2007.
- BERENDSE, H. W.; GROENEWEGEN, H. J. Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. **J. Comp. Neurol.**, v. 299, n. 2, p. 187-228, 1990.
- BERENDSE, H. W.; GROENEWEGEN, H. J.; LOHMAN, A. H. Compartmental distribution of ventral striatal neurons projecting to the mesencephalon in the rat. **J. Neurosci.**, v. 12, n. 6, p. 2079-2103, 1992.
- BERENDSE, H. W.; VOORN, P.; T E KORTSCHOT, A.; GROENEWEGEN, H. J. Nuclear origin of thalamic afferents of the ventral striatum determines their relation to patch/matrix configurations in enkephalin-immunoreactivity in the rat. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 1, n. 1, p. 3-10, 1988.
- BERNARD, V.; BOLAM, J. P. Subcellular and subsynaptic distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor in the neostriatum and globus pallidus of the rat: colocalization at synapses with the GluR2/3 subunit of the AMPA receptor. **Eur. J. Neurosci**, v. 10, n. 12, p. 3721-3736, 1998.
- BERNARD, V.; SOMOGYI, P.; BOLAM, J. P. Cellular, subcellular, and subsynaptic distribution of AMPA-type glutamate receptor subunits in the neostriatum of the rat. **J. Neurosci.**, v. 17, n. 2, p. 819-833, 1997.
- BERTRAN-GONZALEZ, J.; BOSCH, C.; MAROTEAUX, M.; MATAMALES, M.; HERVÉ, D.; VALJENT, E.; GIRAULT, J. A. Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 22, p. 5671-5685, 2008.
- BRITT, J. P.; BENALIOUAD, F.; McDEVITT, R. A.; STUBER, G. D.; WISE, R. A.; BONCI, A. Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. **Neuron**, v. 76, p. 790-803, 2012.

---

\*De acordo com:

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

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

BUBSER, M.; SCRUGGS, J. L.; YOUNG, C. D.; DEUTCH, A. Y. The distribution and origin of the calretinin-containing innervation of the nucleus accumbens of the rat. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, n. 5, p. 1591-1598, 2000.

CALABRESI, P.; PICCONI, B.; TOZZI, A.; DI FILIPPO, M. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. **Trends Neurosci.**, v. 30, n. 5, p. 211-219, 2007.

CARDINAL, R. N.; PARKINSON, J. A.; HALL, J.; EVERITT, B. J. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 26, n. 3, p. 321-352, 2002.

CARELLI, R. M.; WIGHTMAN, R. M. Functional microcircuitry in the accumbens underlying drug addiction: insights from real-time signaling during behavior. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 14, n. 6, p. 763-768, 2004.

CEPEDA, C.; BUCHWALD, N. A.; LEVINE, M. S. Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, n. 20, p. 9576-9580, 1993.

CEPEDA, C.; LEVINE, M. S. Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. **Dev. Neurosci.**, v. 20, n. 1, p. 1-18, 1998.

CHEN, Q.; VEENMAN, C. L.; REINER, A. Cellular expression of ionotropic glutamate receptor subunits on specific striatal neuron types and its implication for striatal vulnerability in glutamate receptor-mediated excitotoxicity. **Neuroscience**, v. 73, n. 3, p. 715-731, 1996.

COELHO, A.; METZGER, M. Anatomical framework of glutamate-dopamine interactions in the nucleus accumbens. In: NEUROSCIENCE 2010, 2010, San Diego. **Soc. Neurosci. Abstr.** p.36:770.3.

COLLINGRIDGE, G. L.; OLSEN, R. W.; PETERS, J. SPEDDING, M. A nomenclature for ligand-gated ion channels. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 1, p. 2-5, 2009.

CRAGG, S. J.; RICE, M. E. DANCING past the DAT at a DA synapse. **Trends Neurosci.**, v. 27, n. 5, p. 270-277, 2004.

CULL-CANDY, S.; KELLY, L.; FARRANT, M. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 16, n. 3, p. 288-297, 2006.

CURRAN, E. J.; WATSON, S. J. J R. Dopamine receptor mRNA expression patterns by opioid peptide cells in the nucleus accumbens of the rat: a double in situ hybridization study. **J. Comp. Neurol.**, v. 361, n. 1, p. 57-76, Oct 9 1995.

DAVID, H. N.; ANSSEAU, M.; ABRAINI, J.H. Dopamine-glutamate reciprocal modulation of release and motor responses in the rat caudate-putamen and nucleus accumbens of "intact" animals. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 50, n. 2, p. 336-360, 2005..

DAY, J. J.; CARELLI, R. M. The nucleus accumbens and Pavlovian reward learning. **Neuroscientist**, v. 13, n. 2, p. 148-159, 2007.

DENG, Y. P.; XIE, J. P.; WANG, H. B.; LEI, W. L.; CHEN, Q.; REINER, A. Differential localization of the GluR1 and GluR2 subunits of the AMPA-type glutamate receptor among striatal neuron types in rats. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 33, n. 4, p. 167-192, 2007.

DESCARRIES, L.; BERUBE-CARRIERE, N.; RIAD, M., BO, G. D.; MENDEZ, J.A.; TRUDEAU L. E. Glutamate in dopamine neurons: synaptic versus diffuse transmission. **Brain Res. Rev.**, v. 58, n. 2, p. 290-302, 2008.

DI CHIARA G.; BASSAREO, V.; FENU, S; DE LUCA, M. A.; SPINA, L., CADONI, C.; ACQUAS, E., CARBONI, E.; VALENTINI, V.; LECCA, D. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. **Neuropharmacology**, v. 47 Suppl 1, p. 227-241, 2004.

DING, D. C.; GABBOTT, P. L.; TOTTERDELL, S. Differences in the laminar origin of projections from the medial prefrontal cortex to the nucleus accumbens shell and core regions in the rat. **Brain Res.**, v. 917, n. 1, p. 81-89, 2001.

DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol. Rev.**, v. 51, n. 1, p. 7-61, 1999.

FREMEAU, R. T. JR; TROYER, M. D.; PAHNER, I.; NYGAARD, G. O.; TRAN, C. H.; REIMER R. J.; BELLOCCHIO, E. E.; FORTIN, D.; STORM-MATHISEN, J.; EDWARDS, R. H. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. **Neuron**, v. 31, n. 2, p. 247-260, 2001.

FREUND, T. F.; POWELL, J. F.; SMITH, A. D. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. **Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 1189-1215, 1984.

GERFEN, C. R. **Basal ganglia**. In: PAXINOS, G. The Rat Nervous System. 3 ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2004. p. 455–508.

GERFEN, C. R. The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. **J Comp Neurol**, v. 236, n. 4, p. 454-476, 1985.

GERFEN, C. R.; BAIMBRIDGE, K. G.; MILLER, J. J. The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A**, v. 82, n. 24, p. 8780-8784, 1985.

GORELOVA, N.; MULHOLLAND, P. J.; CHANDLER, L. J.; SEAMANS, J. K. The glutamatergic component of the mesocortical pathway emanating from different subregions of the ventral midbrain. **Cereb. Cortex**. v.22, n.2, p.327-336, 2012.

GOTO, Y.; GRACE, A. A. Limbic and cortical information processing in the nucleus accumbens. **Trends Neurosci.**, v. 31, n. 11, p. 552-558, 2008.

GRACE, A. A. Gating of information flow within the limbic system and the pathophysiology of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev*, v. 31, n. 2-3, p. 330-341, 2000.

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

GRAVELAND, G. A.; DIFIGLIA, M. The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. **Brain Res**, v. 327, n. 1-2, p. 307-311, 1985.

GRAYBIEL, A. M.; RAGSDALE, C. W. JR. Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 75, n. 11, p. 5723-5726, 1978.

GREENGARD, P.; ALLEN, P.B.; NAIRN, A. C. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. **Neuron**, v. 23, n. 3, p. 435-447, 1999.

GREGER, I. H.; KHATRI, L.; ZIFF, E. B. RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. **Neuron**, v. 34, n. 5, p. 759-772, 2002.

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

HALPAIN, S.; GIRAULT, J. A.; GREENGARD, P. Activation of NMDA receptors induces dephosphorylation of DARPP-32 in rat striatal slices. **Nature**, v. 343, n. 6256, p. 369-372, 1990.

HARTIG, W.; RIEDEL, A.; GROSCHE, J.; EDWARDS, R. H.; FREMEAU, R. T. JR.; HARKANY, T.; BRAUER, K.; ARENDT, T. Complementary distribution of vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the nucleus accumbens of rat: Relationship to calretinin-containing extrinsic innervation and calbindin-immunoreactive neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 465, n. 1, p. 1-10, 2003.



HEMMINGS, H.C. JR.; GREENGARD, P. DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein: regional, tissue, and phylogenetic distribution. **J. Neurosci.**, v. 6, n. 5, p. 1469-1481, 1986.

HERKENHAM, M.; EDLEY, S. M.; STUART, J. Cell clusters in the nucleus accumbens of the rat, and the mosaic relationship of opiate receptors, acetylcholinesterase and subcortical afferent terminations. **Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 561-593, 1984.

HERZOG, E.; BELLENCHI, G. C.; GRAS, C.; BERNARD, V.; RAVASSARD, P.; BEDET, C.; GASNIER, B.; GIROS, B.; EL MESTIKAWY, S. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 22, p. 1-6, 2001.

HNASKO, T.S.; HJELMSTAD, G.O.; FIELDS, H. L.; EDWARDS, R. H. Ventral tegmental area glutamate neurons: electrophysiological properties and projections. **J. Neurosci.** v.32, n.43, p. 15076-15085, 2012.

HÖKFELT, T.; MÅRTENSSON, R.; BJÖRKLUND, A.; KLEINAU, S.; GOLDSTEIN, M. Distributional maps of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat brain. In: Björklund A.; Hökfelt T. (Ed.). Classical transmitters in the CNS. Amsterdam: Elsevier. p. 277-379, 1984.

HOLLMANN, M.; HARTLEY, M.; HEINEMANN, S.  $Ca^{2+}$  permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. **Science**, v. 252, n. 5007, p. 851-853, 1991.

HOOVER, W. B.; VERTES, R. P. Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v.519, p. 3766-3801, 2011.

HUSSAIN, Z.; JOHNSON, L. R.; TOTTERDELL, S. A light and electron microscopic study of NADPH-diaphorase-, calretinin- and parvalbumin-containing neurons in the rat nucleus accumbens. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 10, n. 1, p. 19-39, 1996..

IKEMOTO, S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. **Brain Res. Rev.**, v. 56, n. 1, p. 27-78, 2007.

IKEMOTO, S.; QIN, M.; LIU, Z. H. The functional divide for primary reinforcement of D-amphetamine lies between the medial and lateral ventral striatum: is the division of the accumbens core, shell, and olfactory tubercle valid? **J. Neurosci.**, v. 25, n. 20, p. 5061-5065, 2005.

ITOH, K.; KONISHI, A.; NOMURA, S.; MIZUNO, N.; NAKAMURA, Y.; SUGIMOTO, T. Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. **Brain Res**, v. 175, n. 2, p. 341-346, 1979.

JANSSON, A.; GOLDSTEIN, M.; TINNER, B.; ZOLI, M.; MEADOR WOODRUFF, J. H.; LEW, J. Y.; LEVEY, A. I.; WATSON, S.; AGNATI, L. F.; FUXE, K. On the distribution patterns of D1, D2, tyrosine hydroxylase and dopamine transporter immunoreactivities in the ventral striatum of the rat. **Neuroscience**, v. 89, n. 2, p. 473-489, 1999.

JONGEN-RELO, A. L.; GROENEWEGEN, H. J.; VOORN, P. Evidence for a multi-compartmental histochemical organization of the nucleus accumbens in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 337, n. 2, p. 267-276, 1993.

JONGEN-RELO, A. L.; VOORN, P.; GROENEWEGEN, H. J. Immunohistochemical characterization of the shell and core territories of the nucleus accumbens in the rat. **Eur. J. Neurosci.**, v. 6, n. 8, p. 1255-1264, 1994.

KAWAGUCHI, Y. Neostriatal cell subtypes and their functional roles. **Neurosci. Res.**, v. 27, n. 1, p. 1-8, 1997.

KAWAGUCHI, Y.; WILSON, C. J.; AUGOOD, S. J.; EMSON, P. C. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. **Trends Neurosci**, v. 18, n. 12, p. 527-535, 1995.

KAWANO, M.; KAWASAKI, A.; SAKATA-HAGA, H.; FUKUI, Y.; KAWANO, H.; NOGAMI, H.; HISANO, S. Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. **J Comp Neurol**, v.498, p.581-592, 2006.

KELLEY, A. E. Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 161-179, 2004.

KELLEY, A. E. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 27, n. 8, p. 765-776, 2004.

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

KEMP, J. M.; POWELL, T. P. The connexions of the striatum and globus pallidus: synthesis and speculation. **Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 262, n. 845, p. 441-457, 1971.

KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 179, n. 1, p. 4-29, 2005.

KOKAROVTSOVA, L.; JACIWI-ZURAKIWSKY, T.; ARBOCCO, R. M.; FRANTSEVA, M. V.; PEREZ, J. L. P. Excitability and gap junction-mediated mechanisms in nucleus accumbens regulate self-stimulation reward in rats. **Neuroscience**, v. 159, n. 4, p. 1257-1263, 2009.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217-238, 2010.

- 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, p. 157-191, 1977.
- KWOK, K. H.; TSE, Y. C.; WONG, R. N.; YUNG, K. K. Cellular localization of GluR1, GluR2/3 and GluR4 glutamate receptor subunits in neurons of the rat neostriatum. **Brain Res.**, v. 778, n. 1, p. 43-55, 1997.
- LANGLEY, K. C.; BERGSON, C.; GREENGARD, P.; OUIMET, C. C. Co-localization of the D1 dopamine receptor in a subset of DARPP-32-containing neurons in rat caudate-putamen. **Neuroscience**, v. 78, n. 4, p. 977-983, 1997.
- LANSINK, C. S.; GOLTSTEIN, P. M.; LANKELMA, J. V.; JOOSTEN, R. N.; MCNAUGHTON, B. L.; PENNARTZ, C. M. Preferential reactivation of motivationally relevant information in the ventral striatum. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 6372-6382, 2008.
- LAVERGHETTA, A. V.; TOLEDO, C. A.; VEENMAN, C. L.; YAMAMOTO, K.; WANG, H.; REINER, A. Cellular localization of AMPA type glutamate receptor subunits in the basal ganglia of pigeons (*Columba livia*). **Brain Behav. Evol.**, v. 67, p. 10-38, 2006.
- MATAMALES, M.; BERTRAN-GONZALEZ, J.; SALOMON, L.; DEGOS, B.; DENIAU, J. M.; VALJENT, E.; HERVÉ, D.; GIRAULT, J. A. Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4770, 2009.
- MCCRACKEN, C. B.; HAMBY, S. M.; PATEL, K. M.; MORGAN, D.; VRANA, K. E.; ROBERTS, D. C. Extended cocaine self-administration and deprivation produces region-specific and time-dependent changes in connexin36 expression in rat brain. **Synapse**, v. 58, n. 3, p. 141-150, 2005.
- MCGEORGE, A. J.; FAULL, R. L. The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. **Neuroscience**, v.29, n.3, p. 503-537.1989.
- MEREDITH, G. E.; AGOLIA, R.; ARTS, M. P.; GROENEWEGEN, H. J.; ZAHM, D. S. Morphological differences between projection neurons of the core and shell in the nucleus accumbens of the rat. **Neuroscience**, v. 50, n. 1, p. 149-162, 1992.
- MEREDITH, G. E.; BLANK, B.; GROENEWEGEN, H. J. The distribution and compartmental organization of the cholinergic neurons in nucleus accumbens of the rat. **Neuroscience**, v. 31, n. 2, p. 327-345, 1989.
- MOGA, M. M.; WEIS, R. P.; MOORE, R. Y. Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 359, n. 2, p. 221-238, 1995.
- MOGENSON, G. J.; JONES, D. L.; YIM, C. Y. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. **Prog. Neurobiol.**, v. 14, n. 2-3, p. 69-97, 1980.

MORALES, M.; PICKEL, V. M. Insights to drug addiction derived from ultrastructural views of the mesocorticolimbic system. **Ann N. Y. Acad. Sci.**, v. 1248, p. 71-88, 2012.

MOSS, J.; BOLAM, J. P. A dopaminergic axon lattice in the striatum and its relationship with cortical and thalamic terminals. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 44, p. 11221-11230, 2008.

MOSS, J.; BOLAM, J. P. The relationship between dopaminergic axons and glutamatergic synapses in the striatum: structural considerations. In: IVERSEN, L. L. et al. (Ed.). **Dopamine handbook**. Oxford: Oxford University Press, 2010. p. 49-59.

NAIR-ROBERTS, R. G.; CHATELAIN-BADIE, S. D.; BENSON, E.; WHITE-COOPER, H.; BOLAM, J. P.; UNGLESS, M. A. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. **Neuroscience**, v.152, p.1024-1031, 2008.

NICOLA, S. M.; SURMEIER, J.; MALENKA, R. C. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. **Annu Rev. Neurosci.**, v. 23, p. 185-215, 2000.

NISHI, A.; BIBB, J. A.; MATSUYAMA, S.; HAMADA, M.; HIGASHI, H.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P.. Regulation of DARPP-32 dephosphorylation at PKA- and Cdk5-sites by NMDA and AMPA receptors: distinct roles of calcineurin and protein phosphatase-2A. **J. Neurochem.**, v. 81, n. 4, p. 832-841, 2002.

O'DONNELL, P.; GRACE, A. A. Dopaminergic reduction of excitability in nucleus accumbens neurons recorded in vitro. **Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 1, p. 87-97, 1996.

ONN, S.P.; GRACE, A. A. Amphetamine withdrawal alters bistable states and cellular coupling in rat prefrontal cortex and nucleus accumbens neurons recorded in vivo. **J. Neurosci.**, v. 20, n. 6, p. 2332-2345, 2000.

OUIMET, C. C.; GREENGARD, P. Distribution of DARPP-32 in the basal ganglia: an electron microscopic study. **J. Neurocytol.**, v. 19, n. 1, p. 39-52, 1990.

OUIMET, C. C.; LANGLEY-GULLION, K. C.; GREENGARD, P. Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen. **Brain Res.**, v. 808, n. 1, p. 8-12, 1998.

OUIMET, C. C.; MILLER, P.E.; HEMMINGS, H. C. JR.; WALAAS, S. I.; GREENGARD, P. DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. **J. Neurosci.**, v. 4, n. 1, p. 111-124, 1984.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Amsterdam: Elsevier, 2007.

PECINA, S.; BERRIDGE, K. C. Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? **J. Neurosci.**, v. 25, n. 50, p. 11777-11786, 2005.

PENNARTZ, C. M.; GROENEWEGEN, H. J.; LOPES DA SILVA, F. H. The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. **Prog. Neurobiol.**, v. 42, n. 6, p. 719-761, 1994.

PETRALIA, R. S.; WANG, Y. X.; MAYAT, E.; WENTHOLD, R. J. Glutamate receptor subunit 2-selective antibody shows a differential distribution of calcium-impermeable AMPA receptors among populations of neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 385, n. 3, p. 456-476, 1997.

PETRALIA, R. S.; WENTHOLD, R. J. Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 318, n. 3, p. 329-354, 1992.

PINTO, A.; JANKOWSKI, M.; SESACK, S. R. Projections from the paraventricular nucleus of the thalamus to the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens shell: ultrastructural characteristics and spatial relationships with dopamine afferents. **J. Comp. Neurol.**, v. 459, n. 2, p. 142-155, 2003.

PRINSSSEN, E. P.; BALESTRA, W.; BEMELMANS, F. F.; COOLS, A. R. Evidence for a role of the shell of the nucleus accumbens in oral behavior of freely moving rats. **J. Neurosci.**, v. 14, n. 3, pt. 2, p. 1555-1562, 1994.

REBEC, G. V.; CHRISTENSEN, J. R.; GUERRA, C.; BARDON, M. T. Regional and temporal differences in real-time dopamine efflux in the nucleus accumbens during free-choice novelty. **Brain Res.**, v. 776, n. 1-2, p. 61-67, 1997.

REIMERS, J. M.; MILOVANOVIC, M.; WOLF, M. E. Quantitative analysis of AMPA receptor subunit composition in addiction-related brain regions. **Brain Res.**, v. 1367, p. 223-233, 2011.

RICE, M. E.; CRAGG, S. J. Dopamine spillover after quantal release: rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway. **Brain Res. Rev.**, v. 58, n. 2, p. 303-313, 2008.

RICE, M. E.; PATEL, J. C.; CRAGG, S. J. Dopamine release in the basal ganglia. **Neuroscience**, v. 198, p. 112-137, 2011.

RIEDEL, A.; HÄRTIG, W.; SEEGER, G.; GÄRTNER, U.; BRAUER, K.; ARENDT, T. Principles of rat subcortical forebrain organization: a study using histological techniques and multiple fluorescence labeling. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 23, n. 2, p. 75-104, 2002.

SALAMONE JD. Involvement of nucleus accumbens dopamine in behavioral activation and effort-related functions. *Dopamine Handbook*. Oxford: Oxford University Press, 2010. p. 281-300.

SALAMONE, J. D.; CORREA, M.; MINGOTE, S. M.; WEBER, S. M. Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 5, n. 1, p. 34-41, 2005.

SCHALLING, M.; DJURFELDT, M.; HOKFELT, T.; EHRLICH, M.; KURIHARA, T.; GREENGARD, P. Distribution and cellular localization of DARPP-32 mRNA in rat brain. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 7, p. 139-149, 1990.

SCOTT, L.; APERIA, A. Interaction between N-methyl-D-aspartic acid receptors and D1 dopamine receptors: an important mechanism for brain plasticity. **Neuroscience**, v. 158, n. 1, p. 62-66, 2009.

SEIFERT, U.; HÄRTIG, W.; GROSCHE, J.; BRUCKNER, G.; RIEDEL, A.; BRAUER, K. Axonal expression sites of tyrosine hydroxylase, calretinin- and calbindin-immunoreactivity in striato-pallidal and septal nuclei of the rat brain: a double-immunolabelling study. **Brain Res.**, v. 795, n. 1-2, p. 227-246, 1998.

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 with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **J. Comp. Neurol.**, v.290, p. 213-242, 1989.

SESACK, S. R.; CARR, D. B.; OMELCHENKO, N.; PINTO, A. Anatomical substrates for glutamate-dopamine interactions: evidence for specificity of connections and extrasynaptic actions. **Ann N. Y. Acad. Sci.**, v. 1003, p. 36-52, 2003.

SESACK, S. R.; GRACE, A.A. Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 27-47, 2010.

SESACK, S. R.; PICKEL, V.M. In the rat medial nucleus accumbens, hippocampal and catecholaminergic terminals converge on spiny neurons and are in apposition to each other. **Brain Res.**, v. 527, n. 2, p. 266-279, 1990.

SESACK, S. R.; PICKEL, V. M. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. **J. Comp. Neurol.**, v. 320, n. 2, p. 145-160, 1992.

SURMEIER, D. J.; DING, J.; DAY, M.; WANG, Z.; SHEN, W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. **Trends Neurosci.**, v. 30, n. 5, p. 228-235, 2007.

SVENNINGSSON, P.; NISHI, A.; FISONE, G.; GIRAULT, J. A.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. **Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.** , v. 44, p. 269-296, 2004.

TALLAKSEN-GREENE, S. J.; ALBIN, R. L. Localization of AMPA-selective excitatory amino acid receptor subunits in identified populations of striatal neurons. **Neuroscience**, v. 61, n. 3, p. 509-519, 1994.

TEPPER, J. M.; BOLAM, J.P. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 14, n. 6, p. 685-692, 2004.

TODTENKOPF, M. S.; MIHALAKOPOULOS, A.; STELLAR, J. R. Withdrawal duration differentially affects c-fos expression in the medial prefrontal cortex and discrete subregions of the nucleus accumbens in cocaine-sensitized rats. **Neuroscience**, v. 114, n. 4, p. 1061-1069, 2002.

TODTENKOPF, M. S.; STELLAR, J. R. Assessment of tyrosine hydroxylase immunoreactive innervation in five subregions of the nucleus accumbens shell in rats treated with repeated cocaine. **Synapse**, v. 38, n. 3, p. 261-270, 2000.

TOTTERDELL, S.; SMITH, A. D. Convergence of hippocampal and dopaminergic input onto identified neurons in the nucleus accumbens of the rat. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 2, n. 5, p. 285-298, 1989.

TSAI, H-C., ZHANG, F., ADAMANTIDIS, A., STUBER, G. D., BONCI, A., DE LECEA, L., DEISSEROTH, K. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. **Science**, v.324, p.1080-1084.2009.

TSE, Y. C.; LAI, C. H.; LAI, S. K.; LIU, J. X.; YUNG, K. K.; SHUM, D. K.; CHAN, Y. S. Developmental expression of NMDA and AMPA receptor subunits in vestibular nuclear neurons that encode gravity-related horizontal orientations. **J. Comp. Neurol.**, v. 508, n. 2, p. 343-364, 2008.

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

VOORN, P.; GERFEN, C. R.; GROENEWEGEN, H. J. Compartmental organization of the ventral striatum of the rat: immunohistochemical distribution of enkephalin, substance P, dopamine, and calcium-binding protein. **J. Comp. Neurol.**, v. 289, n. 2, p. 189-201, 1989.

VOORN, P.; JORRITSMA-BYHAM, B.; VAN DIJK, C.; BUIJS, R. M. The dopaminergic innervation of the ventral striatum in the rat: a light- and electron-microscopical study with antibodies against dopamine. **J. Comp. Neurol.**, v. 251, n. 1, p. 84-99, 1986.

VOORN, P.; VANDERSCHUREN, L. J.; GROENEWEGEN, H. J.; ROBBINS, T. W.; PENNARTZ, C. M. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. **Trends Neurosci.**, v. 27, n. 8, p. 468-474, 2004.

WANG, H.; PICKEL, V. M. Dopamine D2 receptors are present in prefrontal cortical afferents and their targets in patches of the rat caudate-putamen nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v. 442, n. 4, p. 392-404, 2002.

WANG, W. W.; CAO, R.; RAO, Z. R.; CHEN, L. W. Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in DARPP-32-containing neurons of the cerebral cortex, hippocampus and neostriatum of rats. **Brain Res.**, v. 998, n. 2, p. 174-183, 2004.

WEST, A. R.; FLORESCO, S. B.; CHARARA, A.; ROSENKRANZ, J. A.; GRACE, A. A. Electrophysiological interactions between striatal glutamatergic and dopaminergic systems. **Ann N. Y. Acad. Sci.**, v. 1003, p. 53-74, 2003.

WIGHTMAN, R. M.; HEIEN, M. L.; WASSUM, K. M.; SOMBERS, L.A.; ARAGONA, B. J.; KHAN, A. S.; ARIANSEN, J. L.; CHEER, J. F.; PHILLIPS, P. E.; CARELLI, R. M. Dopamine release is heterogeneous within microenvironments of the rat nucleus accumbens. **Eur. J. Neurosci.**, v. 26, n. 7, p. 2046-2054, 2007.

WILSON, C. J. GABAergic inhibition in the neostriatum. **Prog. Brain Res.**, v. 160, p. 91-110, 2007.

WRIGHT, C. I.; BEIJER, A. V.; GROENEWEGEN, H. J. Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. **J. Neurosci.**, v. 16, n. 5, p. 1877-1893, 1996.

WRIGHT, C. I.; GROENEWEGEN, H. J. Patterns of convergence and segregation in the medial nucleus accumbens of the rat: relationships of prefrontal cortical, midline thalamic, and basal amygdaloid afferents. **J. Comp. Neurol.**, v. 361, n. 3, p. 383-403, 1995.

YAMAGUCHI, T.; SHEEN, W.; MORALES, M. Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. **Eur. J. Neurosci.**, v.25, p.106-118, 2007.

YAMAGUCHI, T.; WANG, H. L.; LI, X.; NG, T. H.; MORALES, M. Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. **J. Neurosci.**, v.31, p. 8476-8490, 2011.

YUNG, K. K.; BOLAM, J. P.; SMITH, A. D.; HERSCH, S. M.; CILIAUX, B. J.; LEVEY, A. Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. **Neuroscience**, v. 65, n. 3, p. 709-730, 1995.

ZABORSZKY, L.; ALHEID, G. F.; BEINFELD, M. C.; EIDEN, L. E.; HEIMER, L. AND PALKOVITS, M. Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. **Neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 427-453, 1985.

ZAHM, D. S. Functional-anatomical implications of the nucleus accumbens core and shell subterritories. **Ann N. Y. Acad. Sci.**, v. 877, p. 113-128, 1999.

ZAHM, D. S. An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 24, n. 1, p. 85-105, 2000.

ZAHM, D. S.; BROG, J.S. On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. **Neuroscience**, v. 50, n. 4, p. 751-767, 1992.

ZAHM, D. S.; GROSU, S.; IRVING, J.C.; WILLIAMS, E. A. Discrimination of striatopallidum and extended amygdala in the rat: a role for parvalbumin immunoreactive neurons? **Brain Res.**, v. 978, n. 1-2, p. 141-154, 2003.



ZAHM, D. S.; HEIMER, L. Specificity in the efferent projections of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell. **J. Comp. Neurol.**, v. 327, n. 2, p. 220-232, 1993.

ZAHM, D. S.; PARSLEY, K .P.; SCHWARTZ, Z. M.; CHENG, A. Y. On lateral septum-like characteristics of outputs from the accumbal hedonic "hotspot" of Peciña and Berridge with commentary on the transitional nature of basal forebrain "boundaries". **J.Comp.Neurol.**, v. 521, n. 1, p. 50-68, 2013.

ZOLI, M.; JANSSON, A.; SYKOVA, E.; AGNATI, L. F.; FUXE, K. Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, n. 4, p. 142-150, 1999.