LEANDRO BUENO LIMA

**“AFERÊNCIAS HIPOTALÂMICAS PARA A ÁREA TEGMENTAL
VENTRAL, NÚCLEO TEGMENTAL ROSTROMEDIAL E NÚCLEO
DORSAL DA RAFA.”**

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
2015**

LEANDRO BUENO LIMA

**“AFERÊNCIAS HIPOTALÂMICAS PARA A ÁREA TEGMENTAL
VENTRAL, NÚCLEO TEGMENTAL ROSTROMEDIAL E NÚCLEO
DORSAL DA RAFA.”**

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
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Lima, Leandro Bueno.

Aferências hipotalâmicas para a área tegmental ventral, núcleo tegmental rostromedial e núcleo dorsal da rafe. / Leandro Bueno Lima. - São Paulo, 2015.

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: Neuroanatomia.

Versão do título para o inglês: Hypothalamic afferents to the ventral tegmental area, rostromedial tegmental nucleus and dorsal rafe nucleus.

1. Hipotálamo 2. Mesencéfalo 3. Tegmento Mesopontino 4. Aversão
5. Recompensa 6. Rastreamento Neural 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/SBIB051/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leandro Bueno Lima.

Título da Tese: Aferências hipotalâmicas para a área tegmental ventral,
núcleo tegmental rostromedial e núcleo dorsal da rafe.

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

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

Dedico este trabalho à minha esposa.

Agradecimentos

A Deus por ter me dado discernimento, inteligência e sabedoria, por ser a minha fortaleza e proteção, Ele é meu refúgio em tempos de aflição.

A minha esposa, amiga e companheira em todas as horas, me ajudou muito em todas as etapas, ela é o amor da minha vida, me acompanhou nesta trajetória, me dando apoio e conselhos. Agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida.

Ao meu orientador Prof. Martin, muito obrigado pela oportunidade e ensinamento em Neuroanatomia.

Aos amigos do Laboratório de Neuroanatomia Funcional, Prof. Donato, Prof^a Sara, Aline, Tai, Luciano, Isadora, Thais, João, Angie, Dani, Fernanda, Amanda, Vanessa e Lais, agradeço por todo o auxílio, companheirismo e amizade.

A Ana Maria, que está sempre pronta para ajudar, faz tudo com dedicação, carinho e contribuiu muito para a realização deste trabalho.

Aos professores da Banca de Qualificação, Prof^o Jackson, Prof^o Britto e Prof^a Andreia pelas valiosas contribuições que enriqueceram este trabalho.

À minha família, meu pai, minha mãe, meus irmãos, sobrinhos, cunhadas e cunhado pelo incentivo, orando e acreditando em mim. Sou muito abençoado por Deus ter me dado esta família.

Ao CNPQ, CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro para a execução do meu estudo, às bibliotecárias pela atenção e revisão do trabalho, aos secretários da pós-graduação José Maria e Paloma pelas dicas, conselhos e ajuda durante todo doutorado.

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

“Quando chego ao meu limite,
descubro que tenho força para ir além”.

Ayrton Senna

RESUMO

LIMA, LEANDRO BUENO. **AFERÊNCIAS HIPOTALÂMICAS PARA A ÁREA TEGMENTAL VENTRAL, NÚCLEO TEGMENTAL ROSTROMEDIAL E NÚCLEO DORSAL DA RAFA**. 2015. 105 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O hipotálamo está envolvido em diversas funções comportamentais, autonômicas, viscerais e endócrinas. Há fortes evidências de que o hipotálamo também criticamente modula comportamentos relacionados à motivação, recompensa e punição através de projeções descendentes para regiões como a área tegmental ventral (VTA), o núcleo dorsal da rafe (DR) e o recentemente descoberto núcleo tegmental rostromedial (RMTg). Porém, as entradas hipotalâmicas dessas três estruturas nunca têm sido investigadas sistematicamente. Assim, detalhamos e comparamos em uma primeira etapa as aferências hipotalâmicas da VTA, do DR e do RMTg, através de injeções simples de um traçador retrógrado nessas estruturas. Em uma segunda etapa, investigamos através de injeções de dois traçadores retrógrados diferentes no mesmo animal, visando respectivamente a VTA/DR, a VTA/RMTg ou o DR/RMTg, a existência de neurônios hipotalâmicos que inervam via colaterais axônicas mais do que uma dessas estruturas. Finalmente, investigamos uma possível assinatura GABAérgica ou glutamatérgica das projeções hipotalâmicas para o DR e RMTg, através de uma combinação metódica de injeção de um traçador retrógrado no DR ou RMTg com hibridação *in situ* para GAD67 e VGLUT2.

Observamos que a VTA, o DR e o RMTg recebem um padrão bastante semelhante de entradas hipotalâmicas com destaque para as diferentes partes da área pré-óptica e da área hipotalâmica lateral. Por enquanto, as entradas dessas regiões para a VTA parecem mais substanciais que aquelas para o DR e particularmente para o RMTg. Nossos experimentos de injeções duplas revelaram que a maioria de neurônios individuais no hipotálamo inerva somente uma das três estruturas injetadas, com uma minoria (<10%) projetando via colaterais axônicas para mais do que um alvo. Finalmente, nossos experimentos de hibridização *in situ* com sondas radiomarcadas com ³⁵S, combinado com rastreamento retrógrado, mostraram que o DR e RMTg recebem assim entradas hipotalâmicas glutamatérgicas, como também robustas entradas GABAérgicas.

Em conjunto, nossos achados indicam que entradas originárias de distintas regiões hipotalâmicas são importantes fontes de sinais homeostáticos para a VTA, o DR e o RMTg. Ademais, essas aferências hipotalâmicas exibem um alto grau de heterogeneidade, permitindo excitar ou inibir a VTA, o DR e o RMTg de forma independente ou em conjunto.

Palavras-Chave: Hipotálamo. Mesencéfalo. Tegmento Mesopontino. Aversão. Recompensa. Rastreamento Neural.

ABSTRACT

LIMA, LEANDRO BUENO. **HYPOTHALAMIC AFFERENTS TO THE VENTRAL TEGMENTAL AREA, ROSTROMEDIAL TEGMENTAL NUCLEUS AND DORSAL RAPE NUCLEUS**. 2015. 105 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The hypothalamus is involved in several behavioral, autonomic, visceral, and endocrine functions. There is strong evidence that the hypothalamus also critically modulates behaviors related to motivation, reward and punishment via descending projections to brain regions including the ventral tegmental area (VTA), dorsal raphe nucleus (DR), and the recently discovered rostromedial tegmental nucleus (RMTg). However, the hypothalamic afferents to these three structures have never been investigated systematically. Thus, we first specified and compared the hypothalamic afferents to the VTA, DR, and RMTg, by single injections of a retrograde tracer into these structures. As a second step, we investigated by injections of two different retrograde tracers in the VTA/DR, VTA/RMTg or DR/RMTg of the same animal, the existence of hypothalamic neurons that project via axon collaterals to more than one of these structures. Finally, we investigated a possible GABAergic or glutamatergic phenotype of hypothalamic projections to the DR and RMTg by combining injections of a retrograde tracer in the DR or RMTg with *in situ* hybridization for GAD67 and VGLUT2.

We found that VTA, DR, and RMTg receive a very similar set of hypothalamic afferents particularly originating from different parts of the preoptic- and lateral hypothalamic area. However, the inputs from these regions to the VTA were more substantial than those to the DR and particularly RMTg. Our multiple tracing experiments revealed that the majority of individual hypothalamic neurons only innervates one of the three structures injected, with a minority (<10%) projecting via axon collaterals to more than one target. Finally, our *in situ* hybridization experiments with ³⁵S radiolabeled probes combined with retrograde tracing revealed that DR and RMTg receive glutamatergic as well as also substantial GABAergic hypothalamic inputs.

In all, our findings indicate that inputs originating from distinct hypothalamic regions are important sources of homeostatic signals for the VTA, DR, and RMTg. Furthermore, these hypothalamic afferents exhibit a high degree of heterogeneity, permitting to activate or inhibit the VTA, DR, and RMTg either independently or jointly.

Keywords: Hypothalamus. Mesencephalon, Mesopontine Tegmentum. Aversion. Reward. Neuronal Tracing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografias de locais de injeção de CTb na VTA, DR e RMTg assim como detalhes da marcação retrógrada no hipotálamo.	57
Figura 2 - Desenhos esquemáticos de neurônios retrogradamente marcados no hipotálamo rostral resultantes de injeções na VTA, DR e RMTg.....	58
Figura 2 - continuação Desenhos esquemáticos de neurônios retrogradamente marcados no hipotálamo rostral resultantes de injeções na VTA, DR e RMTg.	59
Figura 3 - Fotomicrografias da marcação retrógrada em um nível central da área pré-óptica.	60
Figura 4 - Fotomicrografias da marcação retrógrada em um nível caudal da área pré-óptica	61
Figura 5 - Fotomicrografias da marcação retrógrada em diferentes níveis hipotalâmicos.	62
Figura 6 -Fotomicrografias de locais de injeção em animais que receberam injeções simultâneas de dois traçadores retrógrados.....	63
Figura 7 -Fotomicrografias ilustrando marcação de dupla-imunofluorescência em um nível central da área pré-óptica.....	64
Figura 8 -Fotomicrografias ilustrando marcação de dupla-imunofluorescência em um nível central do hipotálamo lateral.....	65
Figura 9 -Fotomicrografias ilustrando marcação de dupla-imunofluorescência ao nível do núcleo pré-óptico medial.....	66
Figura 10 -Fotomicrografias ilustrando marcação de dupla-imunofluorescência ao nível da área pré-óptica.....	67
Figura 11 -Fotomicrografias da hibridização <i>in situ</i> para GAD67kDA combinado com imunoistoquímica para CTb no hipotálamo	68
Figura 12 -Fotomicrografias da hibridização <i>in situ</i> para GAD67kDA combinado com imunoistoquímica para CTb no hipotálamo	69
Figura 13 -Fotomicrografias da hibridização <i>in situ</i> para VGLUT2 combinado com imunoistoquímica para CTb no hipotálamo.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Casos preparados para o presente estudo.....	33
Tabela 2 -Casos de arquivo, usados no presente estudo.....	34
Tabela 3 -Números absolutos e percentagens dos neurônios duplamente marcados.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3V	terceiro ventrículo
ac	comissura anterior
aca	comissura anterior, parte anterior
AHA	área hipotalâmica anterior, parte anterior
AHC	área hipotalâmica anterior, parte caudal
ANS	núcleo neurosecretor acessório
Aq	aqueduto
Arc	núcleo hipotalâmico arqueado
BST	núcleo intersticial da estria terminal
CLi	núcleo caudal linear
CTb	toxina colérica, subunidade b
DM	núcleo hipotalâmico dorsomedial
DR	núcleo dorsal da rafe
DRC	núcleo dorsal da rafe, parte caudal
f	fórnix
FG	Fluoro Gold
fr	fascículo retroflexo
GAD	glutamato descarboxilase
GP	globo pálido
HDB	núcleo horizontal da banda diagonal
ic	cápsula interna
IF	núcleo interfascicular
IP	núcleo interpeduncular
LH	hipotálamo lateral
LHb	habênula lateral
LPAG	substância cinzenta periaquedutal, parte lateral
LPO	área pré-óptica lateral
MCPO	núcleo pré-óptico magnocelular
MeAD	núcleo amigdalóide medial, parte anterodorsal
ml	lemnisco medial
mlf	fascículo longitudinal medial
MnPO	núcleo pré-óptico mediano

MPA	área pré-óptica medial
MPO	núcleo pré-óptico medial
mt	trato mamilo-talâmico
opt	trato óptico
och	quiasma óptico
Pa	núcleo hipotalâmico paraventricular
PAG	substância cinzenta periaquedutal
PBP	núcleo parabraquial pigmentoso
Pe	núcleo hipotalâmico periventricular
PeFLH	hipotálamo lateral, parte perifornical
PH	núcleo hipotalâmico posterior
PLH	hipotálamo lateral, parte peduncular
PN	núcleo paranigral
RCh	área retroquiasmática
RMTg	núcleo tegmental rostromedial
SIB	substância inominata, parte basal
SNC	substância negra, parte compacta
SNR	substância negra, parte reticular
TuLH	região tuberal do hipotálamo lateral
VL	ventrículo lateral
VL PAG	substância cinzenta periaquedutal, parte ventrolateral
VMH	núcleo hipotalâmico ventromedial
VMPO	núcleo pré-óptico ventromedial
VP	pálido ventral
VTa	área tegmental ventral
xscp	decussação do pedúnculo cerebelar superior
ZI	zona incerta
ZID	zona incerta, parte dorsal
ZIR	zona incerta, parte rostral
ZIV	zona incerta, parte ventral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Hipotálamo	16
1.2 Área tegmental ventral	17
<i>1.2.1 Área tegmental ventral – Funções</i>	<i>18</i>
<i>1.2.2 Área tegmental ventral – Subdivisões</i>	<i>19</i>
<i>1.2.3 Área tegmental ventral – Neuroquímica</i>	<i>20</i>
<i>1.2.4 Área tegmental ventral – Conexões</i>	<i>20</i>
1.3 Núcleo dorsal da rafe	22
<i>1.3.1 Núcleo dorsal da rafe - Funções</i>	<i>22</i>
<i>1.3.2 Núcleo dorsal da rafe – Subdivisões</i>	<i>23</i>
<i>1.3.3 Núcleo dorsal da rafe – Neuroquímica</i>	<i>24</i>
<i>1.3.4 Núcleo dorsal da rafe – Conexões</i>	<i>25</i>
1.4 Núcleo tegmental rostromedial	27
<i>1.4.1 Núcleo tegmental rostromedial – Conexões e Funções</i>	<i>27</i>
2 OBJETIVOS	31
3 MATERIAIS E METODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 Experimentos de Rastreamento Retrógrado	32
3.3 Perfusão e Microtomia	34
3.4 Marcação de Imunoperoxidase	35
3.5 Dupla-marcação de Imunofluorescência	36
3.6 Hibridização <i>in situ</i> com ³⁵S combinado com imunoistoquímica para CTb	36
3.7 Análise e Documentação	37
4 RESULTADOS	39
4.1 Experimentos de Rastreamento Retrógrado:	39
<i>4.1.1 Injeções na VTA</i>	<i>39</i>
<i>4.1.2 Injeções no DR</i>	<i>40</i>
<i>4.1.3 Injeções no RMTg</i>	<i>41</i>
4.2 Experimentos de Dupla-Imunofluorescência	42
<i>4.2.1 Injeções no DR/RMTg</i>	<i>42</i>
<i>4.2.2 Injeções na VTA/DR</i>	<i>42</i>
<i>4.2.3 Injeções na VTA/RMTg</i>	<i>43</i>
4.3 Hibridização <i>in situ</i> com ³⁵S combinado com Rastreamento Retrógrado	45
<i>4.3.1 Hibridização <i>in situ</i> para GAD-67kDa</i>	<i>45</i>
<i>4.3.2 Hibridização <i>in situ</i> para VGLUT2</i>	<i>47</i>
5 DISCUSSÃO	48

5.1	Projeções hipotalâmicas para a VTA	48
5.2	Projeções hipotalâmicas para o DR.....	50
5.3	Projeções hipotalâmicas para o RMTg	50
5.4	Projeções colaterais.....	51
5.5	Assinatura neuroquímica das entradas hipotalâmicas.....	53
6	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipotálamo

O hipotálamo está criticamente envolvido em funções comportamentais, autonômicas, viscerais e endócrinas, formando o principal nodo entre os sistemas endócrino, autonômico e somatomotor. Distintos centros hipotalâmicos têm sido implicados na regulação do sistema cardiovascular, nas respostas termorreguladoras, viscerais, bem como no comportamento agressivo-defensivo e alimentar. Além disto, o hipotálamo é essencial para assegurar a preservação da espécie pelo controle da expressão do comportamento sexual e maternal (BERNARDIS; BELLINGER, 1996; BERTHOUD; MÜNZBERG, 2011; HETTES et al., 2010; KANEMARU et al., 2000; KIPPIN et al., 2004; RINAMAN, 2010; SAPER, 2003; SIEGEL et al., 1999; SIMERLY, 2004; SWANSON, 2000; TOTH et al., 2010; WANG; SWANN, 2006).

O hipotálamo ocupa a metade ventral do diencefalo em ambos os lados do terceiro ventrículo e está situado acima da hipófise. Dorsalmente o hipotálamo está delimitado ao longo do seu comprimento pela zona incerta, a borda medial do pedúnculo cerebral corresponde a sua borda lateral. Caudalmente o hipotálamo faz margem com a substância cinzenta periaquedutal e área tegmental ventral (VTA) do mesencefalo. Em um plano coronal o hipotálamo foi dividido em três grandes regiões no sentido médio-lateral: zona periventricular, zona medial e zona lateral (SIMERLY, 2004).

A zona periventricular contém muitos neurônios que se projetam para a hipófise e está primariamente envolvida na regulação da secreção hormonal desta glândula. A zona medial consiste de distintos grupos celulares que são inervados principalmente por regiões telencefálicas associadas ao sistema límbico. A maioria dos neurônios da zona lateral do hipotálamo está dispersa entre as fibras do fascículo prosencefálico medial. Além disso, o hipotálamo é também dividido em quatro distritos principais ao longo do eixo rostrocaudal, designado área pré-óptica, supra-óptica ou região anterior, intermédia ou tuberal e finalmente mamilar ou posterior. Ao todo o hipotálamo contém doze compartimentos (SIMERLY, 2004).

Estudos mostrando que distintas áreas do hipotálamo são diferencialmente envolvidas no comportamento alimentar fizeram que o hipotálamo ganhasse grande atenção científica. Nesses estudos pioneiros, foi mostrado que lesões na região ventromedial do hipotálamo resultam em obesidade (BROBECK, 1946), enquanto lesões na região do hipotálamo lateral (LH) dramaticamente reduziram a ingestão de alimentos (ANAND; BROBECK, 1951). Assim, o LH foi postulado como o “centro de fome” e o hipotálamo ventromedial como o “centro de saciedade”. Atualmente, o LH é considerado como o principal integrador entre sistemas neurais regulando homeostase e sistemas que regulam comportamentos motivados apetitivos (BERTHOUD; HURLEY; JOHNSON, 2014; MÜNZBERG, 2011). Muitos dos mecanismos centrais e, em particular hipotalâmicos, envolvidos no controle do metabolismo têm sido explorados em grande detalhe (MORTON; MEEK; SCWARTZ, 2014; WILLIAMS; ELMQUIST, 2012), sublinhando papéis importantes para hormônios como a leptina (LEININGER et al., 2009; LEININGER, 2011) ou neuropeptídeos como a orexina (SAKURAI, 2014) e as melanocortinas (MYERS; OLSON, 2012).

Desde os estudos pioneiros de auto-estimulação intra-cranial de Olds e Milner (1954), o hipotálamo também tem sido implicado em mecanismos de recompensa e aversão. Logo em seguida, em outro estudo clássico, (HOEBEL; TEITELBAUM, 1962) já descreveram que os fenômenos de ingestão alimentar e auto-estimulação intra-hipotalâmica são interligados. O envolvimento do hipotálamo em mecanismos de recompensa e aversão pode ser justificado pelas robustas projeções hipotalâmicas para regiões mesencefálicas e mesopontinas diretamente envolvidas nessas funções. Tais estruturas sabidamente incluem a VTA (FADEL; DEUTCH, 2002; GEISLER; ZAHM, 2005; PHILLIPSON, 1979a; WATABE-UCHIDA et al., 2012), o núcleo dorsal da rafe (DR; LEE et al., 2003, 2005; OGAWA et al., 2014; PEYRON et al., 1998a, b) e o núcleo tegmental rostral (RMTg; JHOU et al., 2009b; KAUFLING et al., 2009).

1.2 Área tegmental ventral

A VTA é uma estrutura mesencefálica localizada na região ventromedial do mesencéfalo entre o núcleo interpeduncular, a substância negra compacta e o núcleo rubro (OADES; HALLIDAY, 1987). A VTA contém um dos maiores

contingentes de neurônios dopaminérgicos, contidos no agrupamento A10 (DAHLSTROM; FUXE, 1964). Neurônios dopaminérgicos na VTA têm sido implicados em uma variedade de funções cerebrais incluindo recompensa, aversão, novidade, assim como distintos processos cognitivos (BROMBERG-MARTIN; MATSUMOTO; HIKOSAKA, 2010; GOLDMAN-RAKIC, 1999; GOLDMAN-RAKIC et al., 2004; GRACE et al., 2007; IKEMOTO, 2007, 2010; IKEMOTO; QIN; LIU, 2006; SCHULTZ, 2007; ZANGEN et al., 2006).

1.2.1 Área tegmental ventral – Funções

A VTA é uma das estruturas chave no circuito de recompensa implicado na ação de quase todas as drogas de abuso (MCBRIDE; MURPHY; IKEMOTO, 1999; IKEMOTO; WISE, 2004; IKEMOTO; QIN; LIU, 2006; SESACK; GRACE, 2010) incluindo carbacol, um agonista colinérgico (IKEMOTO; WISE, 2004), a endorfina-1 (ZANGEN et al., 2002), o Δ^9 tetrahydrocannabinol (o composto ativo da maconha; ZANGEN et al., 2006) e o etanol (RODD-HENRICKS et al., 2000, 2002). Mesmo havendo amplo consenso que, em particular, as projeções da VTA para o núcleo accumbens no estriado ventral são um substrato crítico no processamento de recompensas (DI CHIARA; IMPERATO, 1988), estudos recentes de ressonância magnética mostraram que uma ampla gama de estruturas, inclusive todos os alvos do sistema mesocorticolímbico da dopamina, estão envolvidas nas ações de drogas de abuso (SESACK; GRACE, 2010; VOLKOW; FOWLER; WANG, 2003;).

Existem várias teorias sobre o exato tipo de informação que é sinalizada através da liberação de DA pela VTA (BERRIDGE; ROBINSON, 1998; BOLAM, 2004; IKEMOTO, 2007; KELLEY; BERRIDGE, 2002; SPANAGEL; WEISS, 1999; UNGLESS; MAGILL; SCHULTZ, 2007). Através de estudos eletrofisiológicos em primatas, Schultz e colaboradores (1998) propuseram que neurônios dopaminérgicos na VTA exercem um papel chave em processos de aprendizagem relacionados a recompensas e que a função primária desses neurônios seria direcionar a atenção a estímulos que sinalizem recompensas. Eles mostraram que os neurônios dopaminérgicos na VTA respondem particularmente a estímulos chamativos que sinalizam recompensas inesperadas (SCHULTZ; TREMBLAY; HOLLERMAN, 1998; SCHULTZ, 2002, 2007).

1.2.3 Área tegmental ventral – Subdivisões

Embora a VTA seja composta de núcleos citoarquiteticamente distintos, ela é usualmente vista como uma entidade anatômica. Com base nestes estudos, a VTA foi subdividida citoarquiteticamente em 5 núcleos distintos: dois laterais, sendo os núcleos parabraquial pigmentoso e paranigral; e três na linha média, sendo os núcleos rostral linear, interfascicular e caudal linear (OADES; HALLIDAY, 1987; PHILLIPSON, 1979a). Entretanto, alguns autores não incluem os núcleos da linha média como parte da VTA (SWANSON, 1982). Além disto, Ikemoto (2007) dividiu a VTA em região rostral e caudal, onde o marco divisor é o polo rostral do núcleo interpeduncular, e observou que drogas de abuso exercem efeitos reforçadores intensos na VTA posterior e pouco ou nenhum efeito na VTA anterior.

Os neurônios da VTA têm características de cerne isodendrítico (GEISLER; ZAHM, 2005; RAMÓN-MOLLINER; NAUTA, 1966;). Seus dendritos são grossos, longos e pouco ramificados e recebem um grande número de aferências de múltiplos locais (GEISLER; ZAHM, 2005; PHILLIPSON, 1979b), e seus axônios também emitem numerosos colaterais destinados a diversos alvos. Estas características anatômicas são responsáveis pela função integradora do cerne isodendrítico.

O grande interesse que a VTA desperta se deve em grande parte à população de neurônios dopaminérgicos do grupamento A10 (BJORKLUND; DUNNETT, 2007; DAHLSTRÖM; FUXE, 1964). Em um estudo clássico, Dahlstrom e Fuxe (1964) através da técnica de histofluorescência identificaram diferentes grupamentos catecolaminérgicos, denominado A1-A12 no encéfalo de rato. No mesencéfalo ventral foram reconhecidos 3 grandes grupamentos dopaminérgicos denominados A8, A9 e A10, mas não há uma delimitação clara destes três grupamentos. O grupamento A8 está contido na região do núcleo retrorubral, o grupamento A9 na substância negra compacta, e o grupamento A10 na VTA (DAHLSTRÖM; FUXE, 1964; FALLON; MOORE, 1978). Devemos salientar que o distrito mesencefálico que contém o grupamento A10 não pode ser usado como critério para definir com rigor a VTA, pois este grupamento invade rostroventralmente a região supramamilar e dorsocaudalmente, o DR e a substância cinzenta periaquedutal (HÖKFELT et al., 1984).

1.2.4 Área tegmental ventral – Neuroquímica

É importante mencionar que a VTA não é exclusivamente formada por neurônios dopaminérgicos. Assim, estudos imunoistoquímicos e de hibridização *in situ* mostraram que a VTA contém também numerosos neurônios imunorreativos para ácido γ -aminobutírico (GABA; NAIR-ROBERTS et al., 2008; MARGOLIS et al., 2012; OLSON et al., 2005; OLSON; NESTER, 2007), glutamato (KAWANO et al., 2006; NAIR-ROBERTS et al., 2008; YAMAGUCHI; SHEEN; MORALES, 2007), neurotensina, colecistocinina (JAYARAMAN et al., 1990), proteínas ligantes de cálcio (MCRTCHIE; HARDMAN; HALLIDAY, 1996) e óxido nítrico (KLEJBOR et al., 2004). Esses neurotransmissores e neuropeptídeos podem estar co-localizados ou não com neurônios dopaminérgicos (LI et al., 2012). Foi ainda observado que neurônios dopaminérgicos da VTA expressam receptores para leptina e insulina (FIGLEWICZ et al., 2003). A proporção relativa de neurônios GABAérgicos e dopaminérgicos varia na VTA tanto ao longo de sua extensão rostrocaudal como entre seus diferentes núcleos (NAIR-ROBERTS et al., 2008). A maior densidade de células dopaminérgicas está localizada na VTA caudal e diminui progressivamente em direção rostral (SWANSON, 1982). Recentes estudos sublinham que existem vários subtipos de neurônios dopaminérgicos que diferem com respeito às suas propriedades anatômicas, neuroquímicas e eletrofisiológicas (LAMMEL et al., 2008, 2012; LAMMEL; LIM; MALENKA, 2013; LI et al., 2012; MARGOLIS et al., 2008).

1.2.5 Área tegmental ventral – Conexões

A VTA dá origem ao sistema mesocorticolímbico da dopamina innervando principalmente o córtex pré-frontal (PFC) e estruturas associadas ao sistema límbico, enquanto a substância negra compacta dá origem ao sistema mesostriatal tendo o estriado dorsal como alvo principal (BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007; DAHLSTRÖM; FUXE, 1964). As eferências da VTA ascendem no fascículo prosencefálico medial e têm como alvos principais o estriado ventral (IKEMOTO, 2007), a amígdala, a amígdala expandida (HASUE; SHAMMAH-LAGNADO, 2002) o PFC e a área septal (BECKSTEAD et al., 1979; BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007; FALLON; MOORE, 1978; SWANSON, 1982). Há evidências sugerindo que os setores rostr dorsais da

VTA estão mais relacionados com o sistema mesocortical e os setores caudo-ventrais da VTA, com as áreas subcorticais mesolímbicas (SCHEIBNER; TÖRK, 1987). Além disso, a VTA emite projeções descendentes bem mais modestas do que as projeções ascendentes (BECKSTEAD et al., 1979).

A VTA recebe aferências de um grande conjunto de estruturas cerebrais (GEISLER; ZAHM, 2005; PHILLIPSON, 1979a; WATABE-UCHIDA et al., 2012; YETNIKOFF et al., 2014). Estruturas subcorticais contendo neurônios VGLUT2+ constituem a principal fonte excitatória da VTA (GEISLER et al 2007). Omelchenko e Sesack (2007) descreveram que a maioria das sinapses na VTA é formada por axônios VGLUT2+ originando em diferentes distritos do hipotálamo, com destaque para o LH e a LPO. Abundantes aferências hipotalâmicas para a VTA também foram descritas em diversos outros estudos de rastreamento neural (FADEL; DEUTCH, 2002; GEISLER; ZAHM, 2005; PHILLIPSON, 1979a). Outras aferências glutamatérgicas para a VTA têm origem no PFC, na habênula lateral (LHb), no núcleo sub-talâmico, em núcleos do tegmento mesopontino e na substância cinzenta periaquedutal (GEISLER et al., 2007; GEISLER; WISE, 2008; MORALES; PICKEL, 2012).

Além disso, projeções orexinérgicas provenientes do hipotálamo atuam na modulação dos neurônios dopaminérgicos da VTA e são envolvidas em mecanismos de motivação e recompensa (ASTON-JONES, 2005, 2010; FADEL; DEUTCH, 2002; HARRIS; WIMMER; BORGLAND et al., 2006; RICHARDSON; ASTON-JONES, 2012; SAKURAI, 2014). Porém, há evidências que neurônios hipotalâmicos não-orexinérgicos também contribuam na modulação da VTA. Assim, em ratos treinados a auto-administrar cocaína e que receberam injeção de CTb (traçador retrogrado) na VTA, observou-se que muitos neurônios retrogradamente marcados no hipotálamo também eram marcados pela proteína Fos, incluindo no núcleo hipotalâmico dorsomedial (DM), PeFLH, e LH. Entretanto, boa parte destes neurônios Fos+ não eram orexinérgicos (MAHLER; ASTON-JONES, 2012). Outros neuropeptídeos hipotalâmicos como a neurotensina também poderosamente influenciaram a excitabilidade dos neurônios dopaminérgicos da VTA (GEISLER; ZAHM, 2006; KEMPADOO et al., 2012; PATTERSON et al., 2015).

Além das projeções diretas de certos núcleos hipotalâmicos para a VTA, há projeções indiretas que utilizam núcleos relés para poder modular a VTA. Assim, Luo e Aston-Jones (2009) observaram através de métodos de rastreamento retrógrado

trans-sináptico que o núcleo supraquiasmático se projeta indiretamente para a VTA via o núcleo pré-óptico medial (MPO), fazendo com que os neurônios da VTA exibam um ritmo circadiano.

Em adição, várias evidências sugerem a importância da VTA em mecanismos dos comportamentos apetitivos. A administração de leptina na VTA foi capaz de reduzir a ingestão alimentar e diminuir a frequência de disparo dos neurônios dopaminérgicos da VTA, e seguida da deleção do receptor de leptina restrita à VTA (animais knockdown), foi verificado uma ingestão alimentar aumentada (HOMMEL et al., 2006). Em uma revisão recente, Thompson e Borgland (2011) destacaram que ambos, obesidade e dependência de drogas, resultam de comportamentos motivados aberrantes, sugerindo que os substratos neurofisiológicos que conduzem a obesidade e a dependência podem ser os mesmos.

1.3 Núcleo dorsal da rafe

O DR está inserido na parte ventromedial da área cinzenta central do mesencéfalo e se estende em direção rombencéfalo ventral ao aqueduto cerebral e do quarto ventrículo (BAKER; HALLIDAY; TÖRK, 1990). O DR contém um dos maiores contingentes de neurônios serotoninérgicos (STEINBUSCH, 1981) que são contidos nos grupamentos B6 e B7 (DAHLSTRÖM; FUXE, 1964). Neurônios serotoninérgicos do DR têm sido implicados em uma gama extremamente ampla de funções fisiológicas e comportamentais (MICHELSEN; SCHMITZ; STEINBUSCH, 2007; MICHELSEN; PRICKAERTS; STEINBUSCH, 2008), incluindo a regulação do ciclo sono-vigília (JACOBS; AZMITIA, 1992; MONTI et al., 2010; URBAIN; CREAMER; DEBONNEL, 2006), ingestão de alimentos (CARLINI et al., 2004) e modulação da dor (WANG; NAKAI, 1994).

1.3.1 Núcleo dorsal da rafe - Funções

Mecanismos serotoninérgicos no DR são criticamente envolvidos na regulação do humor e têm sido implicados principalmente na etiologia de doenças afetivas como ansiedade e depressão (HALE; LOWRY, 2011; HALE; SHEKHAR; LOWRY, 2012; LOWRY et al., 2008;), no controle do ciclo sono- vigília (GERVASONI et al., 2000;

MONTI 2010; URBAIN; CREAMER; DEBONNEL, 2006;), como também na esquizofrenia (GONZALEZ-MAESO; SEALFON, 2009) e distúrbios alimentares (HOYER; HANNON; MARTIN, 2002). Assim, injeções de grelina no DR em ratos aumentou significativamente a ingestão alimentar, mesmo em ratos saciados (CARLINI et al., 2004). O DR também está envolvido em fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo e distúrbios de pânico, hipertensão arterial, enxaqueca, e hipertensão pulmonar (HOYER; HANNON; MARTIN, 2002).

Os núcleos da rafe também têm sido discutidos em relação aos mecanismos de recompensa e punição (IKEMOTO, 2010; KRANZ; KASPER; LANZENBERGER, 2010; LIU; IKEMOTO 2007; NAKAMURA; MATSUMOTO; HIKOSAKA, 2008; SHIN; IKEMOTO, 2010). Assim, recentes estudos eletrofisiológicos indicaram que uma parte dos neurônios do DR sinaliza o valor concreto de uma recompensa associado com o comportamento em curso (BROMBERG-MARTIN; MATSUMOTO; HIKOSAKA, 2010; INABA et al., 2013; NAKAMURA; MATSUMOTO; HIKOSAKA, 2008). Além disso, o DR é um dos poucos sítios cerebrais, nos quais ratos aprendem a auto administrar muscimol ou baclofen (agonistas GABA_A e GABA_B, respectivamente; LIU; IKEMOTO, 2007; SHIN; IKEMOTO, 2010).

1.3.2 Núcleo dorsal da rafe – Subdivisões

Neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da Rafe no rato aparecem em grupos topograficamente organizados formados por vários tipos de células, incluindo pequenas células redondas, células médias fusiformes, células bipolares e também células grandes fusiformes e multipolares (STEINBUS, 1984). Essa grande variedade morfológica de células também é encontrada no DR de humanos (BAKER et al., 1990).

Atualmente, existe consenso que o DR é uma estrutura altamente heterogênea composta por várias subdivisões, contendo distintos grupamentos de neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos que diferem em suas características morfológicas, propriedades eletrofisiológicas e nos padrões de suas conexões (ABRAMS et al., 2004; BANG et al., 2012; CALIZO et al., 2011; COMMONS; CONNOLLEY; VALENTINO, 2003; CRAWFORD; CRAIGE; BECK, 2011; CRAWFORD; RAHMAN; BECK, 2013; DAY et al., 2004; FU et al., 2010; HALE; LOWRY, 2011; HALE; SHEKHAR; LOWRY, 2012; HIOKI et al., 2010; LOWRY et al.,

2008; SHIKANAI et al., 2012; SOIZA-REILLY; COMMONS, 2011; VASUDEVA et al., 2011; WASELUS et al., 2011).

Existem várias maneiras de subdividir o DR (BAKER et al., 1990; DAHLSTRÖM; FUXE, 1964; STEINBUSCH, 1981;). Atualmente, o DR é subdividido em uma parte rostral, ventral, dorsal, lateral e caudal. A parte lateral muitas vezes também é referida como “asa lateral”. Finalmente, a parte dorsal é formada por duas ou três sub-regiões, o cerne e a concha (ABRAMS et al., 2004; HIOKI et al., 2010; LOWRY et al., 2008), assim como a recentemente descrita parte central (LIMA et al., 2012; SEGO et al., 2014).

1.3.4 Núcleo dorsal da rafe – Neuroquímica

O DR tem chamado a atenção pela presença de neurônios serotonérgicos localizados no grupamento B6 (DAHLSTRÖM; FUXE, 1964). Além de neurônios serotonérgicos, o DR também contém expressivas populações de neurônios que sintetizam outros neurotransmissores, como o GABA (DAY et al., 2004; SHIKANAI et al., 2012), dopamina (DOUGALIS et al., 2012; HOKFELT et al., 1976; STRATFORD; WIRTSHAFTER, 1990) e principalmente glutamato (HERZOG *et. al.*, 2004; HIOKI et al., 2010; SEGO et al., 2014; SOIZA-REILLY; CALIZO, 2011a,b). A presença de glutamato em neurônios do DR é indicada pela ampla distribuição do transportador vesicular de glutamato do tipo 3 (VGLUT3; HERZOG et al., 2004). Assim, estudos recentes de dupla hibridização *in situ* (HIOKI et al., 2010) ou dupla-imunofluorescência (SEGO et al., 2014) esclareceram que cerca de 80% dos neurônios serotonérgicos co-expressam VGLUT3. Exceto na parte da concha do DR, VGLUT3 não é co-expresso em neurônios GABAérgicos. Neurônios tirosina hidroxilase positivos também quase nunca co-expressam VGLUT3, triptofano hidroxilase 2 (enzima crítica na síntese de serotonina), ou GAD67 (HIOKI et al., 2010). Neurônios serotonérgicos e GABAérgicos estão distribuídos ao longo da extensão rostral caudal do núcleo dorsal da rafe, enquanto que os neurônios catecolaminérgicos são restritos à metade rostral do DR. Células GABAérgicas são particularmente frequentes nas asas laterais.

Além disso, o DR contém neurônios expressando vários neuropeptídeos como o fator liberador de corticotropina (CRF; 96% de co-localização com triptofano; COMMONS; CONNOLLEY; VALENTINO, 2003; DAY et al., 2004;) e a neurotensina

(UHL et al., 1979). O DR também é inervado por axônios contendo diversos neuropeptídeos, entre eles β endorfinas (BLOOM et al., 1978), substância P (LACOSTE et al., 2009), neuropeptídeo Y (NPY; DÍAZ-CABIALE et al., 2011), peptídeo intestinal vasoativo (VIP; SIMS et al., 1980), galanina (EL KAFI et al., 1994), colecistocinina (VANDERHAEGHEN et al., 1980).

1.3.5 Núcleo dorsal da rafe – Conexões

O DR é caracterizado por suas vastas projeções ascendentes e é considerado a principal fonte das projeções serotoninérgicas ascendentes (ABRAMS et al., 2004; JACOBS; AZMITIA, 1992; LOWRY, 2002; MICHELSEN; SCHMITZ; STEINBUSCH, 2007; WIKLUND; LEGER; PERSSON, 1981). Assim, o DR fornece grande parte da inervação serotoninérgica para o córtex, tálamo, hipotálamo, núcleos da base e sistema límbico (HIOKI et al., 2010; MICHELSEN; SCHMITZ; STEINBUSCH, 2007; VERTES, 1991), e além disso emite projeções descendentes (VERTES; KOSICS, 1994).

As projeções do DR são organizadas topograficamente no plano rostrocaudal. Assim, os neurônios serotoninérgicos localizados mais rostralmente projetam seletivamente a sítios prosencefálicos específicos, como o caudado putâmen, substância negra e praticamente todas as regiões neocorticais, enquanto que os neurônios serotoninérgicos localizados na parte caudal do DR projetam para outros alvos, incluídos o septo, hipocampo e córtex entorrinal (ABRAMS et al., 2004).

Através de injeções de dois diferentes traçadores retrógrados em alvos diferentes, foi verificada que uma boa parte dos neurônios no DR projeta para mais de um alvo (IMAI; STEINDLER; KITAI, 1986; WASELUS et al., 2011). As projeções colaterais serotoninérgicas permitem a modulação temporalmente coordenada de circuitos neurais específicos, tais como aqueles implicados no controle de centros autonômicos, ansiedade e medo condicionado, que incluem o núcleo central da amígdala e o núcleo paraventricular do hipotálamo (LOWRY, 2002).

Além de projeções serotoninérgicas existem diversas projeções não-serotoninérgicas, incluindo projeções glutamatérgicas (HIOKI et al., 2010; SEGO et al., 2014) ou GABAérgicas (BANG; COMMONS, 2012) originárias do DR. Além disto, os neurônios GABAérgicos localizados no DR estão envolvidos na modulação monossináptica dos neurônios serotoninérgicos do DR. Foi demonstrado pelo

métodos optogenéticos que ao inibir neurônios GABAérgicos no DR os neurônios serotoninérgicos na vizinhança eram desinibidos (CHALLIS et al., 2013)

De forma interessante, o DR é interconectado com muitas estruturas chave que estão implicadas na regulação de comportamentos emocionais. Assim, as principais aferências do DR incluem projeções glutamatérgicas do PFC (GABBOT et al., 2005; GONÇALVES et al., 2009), da LHb (BERNARD; VEH, 2012; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012), núcleo intersticial da estria terminal (PEYRON et al., 1998), hipotálamo (LEE et al., 2003, 2005) e os núcleos medial e central da amígdala (LEE et al., 2007). As projeções hipotalâmicas são provenientes principalmente da MPA, LPO, DM, área hipotalâmica perifornical (PeFLH) e área hipotalâmica lateral (CELADA et al., 2002; GERVASONI et al., 2000; LEE et al., 2003, 2005; PEYRON et al., 1998). Estudos recentes de rastreamento viral retrógrado apontaram para o LH como a maior fonte hipotalâmica para o DR (OGAWA et al., 2014; POLLAK DOROCIC et al., 2014; WEISSBOURD et al., 2014).

Até agora, somente poucos estudos esclareceram a assinatura neuroquímica de distintas projeções para o DR. Por exemplo, as projeções provenientes da área LPO parecem ser, em sua grande maioria, GABAérgicas, sendo responsável pela redução da atividade dos neurônios serotoninérgicos do DR durante o sono de onda lenta. Um grande número de células GABAérgicas retrogradamente marcadas, que projetam para o DR, também foi encontrado no LH (GERVASONI et al., 2000). Outras projeções GABAérgicas para o DR emergem principalmente da substância negra e do RMTg (KIROUAC; LI; MABROUK, 2004; SEGO et al., 2014) e projeções noradrenérgicas do locus coeruleus subcoeruleus (PEYRON et al., 1996).

As projeções de distintos grupos peptidérgicos hipotalâmicos são relativamente bem esclarecidas. Assim, neurônios orexinérgicos provenientes do LH e PeFLH se projetam para o DR influenciando uma variedade de funções cerebrais sujeitas à regulação eferente do núcleo dorsal da rafe, incluindo o comportamento afetivo, controle autonômico, mecanismos de sono e vigília, nocicepção, cognição e integração sensório-motora (LEE et al., 2005; PEYRON et al., 1998). Em concordância, foram encontrados no DR receptores para orexina do tipo 1 e tipo 2 (MARCUS et al., 2001). Sabe-se também que neurônios CART/MCH (transcrito regulador de anfetamina e cocaína/hormônio concentrador de melanina) do LH se projetam para o DR, uma via que pode estar envolvida na regulação alimentar e de estresse (YOON; LEE, 2013).

Através de estudos de rastreamento anterógrado foi esclarecido que a grande maioria das projeções para o DR parece ser recíproca (MUZURELLE et al., 2014; VERTES, 1991). Finalmente, é importante mencionar que atualmente fica cada vez mais evidente que muitas das aferências e eferências do DR são específicas para distintas sub-regiões do DR (PEYRON et al., 1998; MUZURELLE et al., 2014; SEGO et al., 2014; VASUDEVA et al., 2011; WASELUS et al., 2011).

1.4 Núcleo tegmental rostromedial

O RMTg é um núcleo predominantemente GABAérgico que foi descoberto recentemente (JHOU et al., 2009a,b; KAUFILING et al., 2009). O RMTg é localizado dorsolateral à metade caudal do núcleo interpeduncular e estende-se em direção caudal para dentro do tegmento mesopontino com a maioria dos seus neurônios intimamente associados às fibras da decussação do pedúnculo cerebelar superior (GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; JHOU et al., 2009a,b). Inicialmente, o RMTg foi considerado uma extensão caudal da VTA, comumente chamada de polo caudal da VTA (“VTA tail”; FERREIRA et al. 2008; KAUFILING et al., 2009; OLSON; NESTLER, 2007; PERROTTI et al., 2005). Como mencionado acima, a grande maioria dos neurônios no RMTg é formada por neurônios de projeção GABAérgicos (KAUFILING et al., 2009; OLSON; NESTLER, 2007; PERROTTI et al., 2005; SEGO et al., 2014). Além de neurônios GABAérgicos, o RMTg contém axônios imunorreativos para o neuropeptídeo somatostatina, grande número de receptores de opióides do tipo mu e fibras imunorreativas para tirosina hidroxilase (JHOU et al., 2009a, b, 2012).

1.4.1 Núcleo tegmental rostromedial – Conexões e Funções

O principal alvo de projeção do RMTg são neurônios dopaminérgicos na VTA e substância negra (BOURDY et al., 2012; FERREIRA et al., 2008; JHOU et al., 2009a,b; KAUFILING, 2009). Até agora, o RMTg tem sido explorado predominantemente como um centro inibidor da VTA (para revisões ver, BARROT et al., 2012; BOURDY; BARROT, 2012; LAVEZZI; ZAHM, 2011). Projeções da LHb constituem a principal fonte de entradas para o RMTg (ARAKI; MCGEER; KIMURA,

1988; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; HERKENHAM; NAUTA, 1979; KAUFILING et al., 2009). A LHb tem atraído bastante interesse na última década, pelo fato que seus neurônios têm um papel chave em codificar estímulos aversivos e a expectativa de acontecimentos negativos (SHEPARD; HOLCOMB; GOLD, 2006; ULLSPERGER; VON CRAMON, 2003). Assim, estudos eletrofisiológicos inovadores mostraram que os neurônios da LHb são excitados por estímulos aversivos e pela omissão de recompensas, enquanto estímulos de recompensas ou estímulos que predizem recompensas, inibem os mesmos (MATSUMOTO; HIKOSAKA, 2007, 2008). A estimulação elétrica da LHb poderosamente inibe a atividade dos neurônios dopaminérgicos da VTA por curta latência através de um mecanismo modulado por GABA (CHRISTOPH; LEONZIO; WILCOX, 1986; JI; SHEPARD, 2007). Entretanto, parece improvável que esse efeito inibitório da LHb é mediado diretamente por axônios da LHb contatando neurônios dopaminérgicos ou GABAérgicos da VTA. Isso pode ser percebido pelos fatos de que a projeção direta da LHb para a VTA é 1.) glutamatérgica (BRINSCHWITZ et al., 2010) e 2.) relativamente modesta (GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; OMELCHENKO; BELL; SESACK, 2009;). Tudo isso aponta para um importante papel do RMTg como um relé envolvido na sinalização de eventos aversivos. No caso da VTA existem, entretanto, claras evidências anatômicas (BALCITA-PEDICINO et al., 2011; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012) e eletrofisiológicas (HONG et al., 2011; STAMATAKIS; STUBER, 2012a) que a influência inibitória da LHb sobre neurônios dopaminérgicos é principalmente mediada pelo RMTg. Ademais, nosso grupo de pesquisa esclareceu recentemente que o DR, além de receber esparsas projeções diretas da LHb, é alvo de robustas projeções GABAérgicas do RMTg (SEGO et al., 2014), indicando que o RMTg também seja um relé inibitório entre a LHb e o DR.

Além das aferências proveniente da LHb, o RMTg recebe projeções de muitas outras estruturas, incluído do PFC, da amígdala expandida e do hipotálamo. As projeções hipotalâmicas são originárias principalmente da MPA e MPO, área hipotalâmica lateral, núcleo paraventricular, área hipotalâmica posterior e área hipotalâmica dorsal (JHOU et al., 2009b; KAUFILING et al., 2009). Outras importantes entradas para o RMTg têm origem em estruturas do tegmento mesopontino e rombencéfalo, como DR, formação reticular mesencefálica, pontina e bulbar, núcleo tegmental pedúnculo pontino e o núcleo tegmental laterodorsal (JHOU et al., 2009b). Lesões envolvendo o RMTg são acompanhadas por

hiperatividade modesta e reduções acentuadas de comportamentos de congelamento associada ao medo e ansiedade (JHOU, 2005). Trabalhos examinando a expressão do gene Fos no RMTg mostraram um aumento de sua expressão após estímulos condicionados associados com choque nas patas (JHOU et al., 2009a) e após administração de drogas psicoestimulantes como cocaína e anfetamina (GEISLER et al, 2008; PERROTTI et al., 2005, 2008). Os resultados de estudos eletrofisiológicos indicaram que os neurônios do RMTg são, semelhante aos neurônios da LHb, ativados por estímulos aversivos e recompensas negadas (HONG et al., 2011; JHOU et al., 2009a; LECCA et al., 2011, 2012). Entretanto, foi demonstrado em um elegante estudo optogenético que a ativação da via LHb – RMTg promove esquiva ativa, passiva e condicionada (STAMATAKIS; STUBER, 2012b). Em conjunto, todos esses resultados apontam para o fato que o RMTg é provavelmente o principal nodo de integração de informações a respeito de estímulos aversivos e recompensas negadas, capaz de inibir neurônios dopaminérgicos da VTA nesses contextos (BALCITA-PEDICINO et al., 2011; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; JHOU et al., 2009a,b).

Visto que o hipotálamo é uma das maiores fontes de inervação da VTA, do DR e do RMTg, ele constitui provavelmente outra fonte importante para a sinalização de estímulos relacionados aos mecanismos de recompensa e punição para os três centros referidos acima. Na literatura existem somente poucos estudos que investigaram de forma geral as aferências da VTA (BJÖRKLUND; LINDVALL, 1984; GEISLER; ZAHM, 2005; PHILLIPSON, 1979b; ZAHM et al., 2011), RMTg (JHOU et al., 2009a; KAUFILING et al., 2009;) e DR (PEYRON et al., 1998; LEE et al., 2003) e nenhum desses estudos focou as aferências hipotalâmicas para essas estruturas. Além desses estudos gerais, existem alguns estudos detalhados sobre as projeções de distintos grupamentos de neurônios no hipotálamo para a VTA e DR. Assim, foram descritas as projeções de neurônios hipotalâmicos orexinérgicos (BALCITA-PEDICINO; SESACK, 2007; FADEL; DEUTCH, 2002; LEE et al., 2005; LOUIS et al., 2010) ou CART+ (PHILPOT et al, 2005). Porém, pelo fato de esses neuropeptídeos serem principalmente encontrados na zona hipotalâmica lateral, a maioria desses estudos foi focada nessa região.

Entretanto, nossos experimentos assim como dados da literatura (GEISLER; ZAHM, 2005; PEYRON et al., 1998) mostraram que uma parte significativa das projeções hipotalâmicas para a VTA, DR, e RMTg são originadas de distritos rostrais

do hipotálamo como a MPA e aLPO. Esses distritos são pouco explorados na literatura e têm sido implicados em mecanismos de sono e alerta, assim como no comportamento sexual (SHERIN et al., 1996; SRIVIDYA; MALLICK; KUMAR, 2006). Além disso, a LPO manda projeções muito robustas para a LHb (KOWSKI et al., 2008) e assim pode ser envolvida no circuito de aversão (HIKOSAKA, 2010).

Assim, neste trabalho mapeamos e comparamos de forma sistemática as aferências hipotalâmicas para a VTA, DR e RMTg através de experimentos de rastreamento retrógrado. Em uma segunda etapa, investigamos a existência de neurônios de projeção no hipotálamo que projetam via colaterais axônicos para mais de um alvo. Para esse propósito, dois traçadores diferentes, utilizados de forma retrógrada, foram injetados no mesmo animal, visando respectivamente injeções na VTA/DR, na VTA/RMTg ou no DR/RMTg. Essas injeções simultâneas em dois alvos também tiveram como finalidade mostrar, de maneira melhor, a topografia exata das projeções hipotalâmicas para esses alvos.

O papel funcional de neurônios hipotalâmicos com assinatura neuroquímica GABAérgica ou glutamatérgica em comportamentos relacionados com recompensa e aversão tem sido melhor entendido somente recentemente (JENNINGS et al., 2015; NIEH et al., 2015; SCHÖNE; BURDAKOV, 2012). Por isso, em uma terceira etapa, investigamos uma possível assinatura GABAérgica ou glutamatérgica das projeções hipotalâmicas para o DR e RMTg. Isso foi feito através de uma combinação metódica de injeção de um traçador retrógrado (CTb) no DR e RMTg com hibridação *in situ* para a glutamato descarboxilase 67 (GAD67, uma das enzimas limitantes na síntese de GABA) ou o transportador vesicular de glutamato do tipo 2 (VGLUT2). GAD67 e VGLUT2 são marcadores confiáveis para um fenótipo GABAérgico e glutamatérgico, respectivamente. A técnica de hibridização *in situ* foi escolhida para essa finalidade, porque métodos de imunoistoquímica para esses dois marcadores geralmente resultam em uma marcação muito fraca de corpos celulares. Conhecimento detalhados sobre a exata topografia e neuroquímica das projeções para a VTA, o DR e o RMTg, podem contribuir para um melhor entendimento das propriedades funcionais dessas projeções e ajudar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de patologias psiquiátricas que são associadas com estes sistemas.

2 OBJETIVOS

1. Mapear de forma sistemática as aferências do hipotálamo para a área tegmental ventral (VTA), o núcleo dorsal da rafe (DR), assim como para o núcleo rostromedial tegmental (RMTg), através de técnicas de mapeamento retrógrado usando como traçadores neuronal a subunidade b da cólera-toxina (CTb) e o FluoroGold (FG).
2. Investigar, através de injeções de dois traçadores retrógrados diferentes no mesmo animal, a existência de neurônios de projeção no hipotálamo que inervam via colaterais axônicos mais que um alvo. Para esse propósito, serão injetados os traçadores retrógrados CTb e FG na VTA/DR, VTA/RMTg, e DR/RMTg, respectivamente.
3. Investigar uma possível assinatura GABAérgica ou glutamatérgica das projeções do hipotálamo para o DR e RMTg, através de uma combinação metódica de injeção de um traçador retrógrado (CTb) no DR ou RMTg com hibridação *in situ* para GAD67 e VGLUT2. GAD 67 é a enzima limitante na síntese do GABA e VGLUT2 um marcador confiável de neurônios glutamatérgicos em regiões subcorticais, respectivamente.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 46 ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), adultos (peso entre 230-260 gramas), criados no Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas I – USP, mantidos a uma temperatura constante (23 °C) e água e comida ad libitum. Todos os procedimentos seguiram um protocolo já aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB – USP (Protocolo nº 153/2012) e os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelo “Guia de Uso de Animais em Pesquisas” do National Institute of Health (NIH).

3.2 Experimentos de Rastreamento Retrógrado

Os ratos foram anestesiados através de injeção de uma mistura de 10 mg/kg de xylazine (i.p.; Vetbrands, São Paulo, Brasil), acepromazine (Univet, São Paulo, Brasil, 0.04 mg/100 g bw) e 90 mg/kg de cetamina (i.p., Vetbrands, São Paulo, Brasil) diluídas em água destilada. Após a obtenção do plano anestésico adequado, os ratos foram posicionados em um instrumento estereotático (Kopf, California, USA). Pipetas de vidro previamente confeccionadas em estirador de pipetas (Kopf) foram inseridas no tecido cerebral. Foram utilizados os dois traçadores, FluoroGold (FG, Fluorochrome, 1% em PB, pH 7,4) e subunidade b da cólera-toxina (CTb low salt; List Biological Lab, Campell, CA, 1% em água destilada). Trata-se de traçadores muito sensíveis cujo transporte acontece em primeira linha em direção retrógrada. Porém, em particular, CTb também é transportado anterogradamente. Os dois traçadores foram injetados com micropipetas de vidro confeccionadas em estirador de pipetas (Kopf) com diâmetro interno de 10-15µm através de injeções iontoforéticas, o que permite injeções restritas.

Um primeiro grupo de animais recebeu injeções unilaterais de CTb ou FG na VTA, RMTg ou DR. Em um segundo grupo de animais, os dois traçadores foram injetados no mesmo animal, visando como alvos respectivamente a VTA/DR, a VTA/RMTg, e o DR/RMTg. Todos os traçadores foram injetados por meio de uma

corrente elétrica positiva pulsada (10 segundos “on”/10 segundos “off”) de 4 μ A (no caso de FG) e 5 μ A (no caso de CTb) no hemisfério direito por um período de 10 - 15 minutos. As injeções na VTA foram direcionadas para a parte rostral do núcleo parabraquial pigmentoso e as injeções no RMTg e DR para a parte central dessas estruturas. As coordenadas estereotáticas para as injeções foram inicialmente adquiridas do atlas de Paxinos e Watson (1998) e refinadas empiricamente.

Somente 13 de um total de 46 animais injetados no presente estudo, tiveram injeções restritas nos locais desejados e foram usados para a análise (ver Tabela 1).

Tabela 1. Casos preparados para o presente estudo.

Casos	FG	CTb
RL7	VTA	RMTg
RL8	VTA	x
RL10	VTA	x
RL13	x	DR
RL15	VTA	x
RL19	VTA	x
RL20	VTA	x
RL21	VTA	RMTg
RL23	x	DR
RL28	VTA	RMTg
RL30	x	VTA
RL45	x	VTA
RL46	x	VTA

FG, FluoroGold; CTb, subunidade b da cólera-toxina.

Adicionalmente, analisamos cortes de encéfalos de ratos que receberam injeções de traçadores retrógrados em uma ou duas das regiões (ver Tabela 2) em nossos estudos prévios (GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; SEGO et al., 2014).

Tabela 2. Casos de arquivo, usados no presente estudo.

Casos	FG	CTb
49	VTA	DR
62	----	RMTg
64	DR	RMTg
65	DR	RMTg
70	VTA	----
82	VTA	----

FG, FluoroGold; CTb, subunidade b da cólera-toxina

3.3 Perfusão e Microtomia

Após uma sobrevida de 7 dias no caso das injeções de CTb e FG, os ratos foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de uma solução de Equitesin, na dose de 3,3mg/kg de peso corpóreo e perfundidos transcardiacamente com 90 ml de salina a 0,9%, seguida de uma solução de 500 ml formaldeído a 4% (adquirido a partir de paraformaldeído aquecido a 60-65°C) em tampão fosfato de sódio (PB) a 4°C. Os cérebros, removidos dos seus envoltórios, foram pós-fixados por 2 horas e depois crioprotetidos em uma solução de sacarose livre de RNase a 20% em PBS a 4°C. Na manhã seguinte, os encéfalos foram seccionados no plano coronal em micrótomo de congelamento. Os cortes foram cortados em 40 µm e foram coletados em quatro séries em solução anti-congelante livre de RNase. Assim, os cortes de cada série apresentaram espaçamento de 160 µm. Uma série de cortes do hipotálamo até o tegmento mesopontino foi destinada para processamento pelo método de imunoperoxidase, ou para CTb ou para FG. Outra série foi destinada para processamento pela técnica de dupla marcação de imunofluorescência, para ambos os traçadores em animais que receberam duas injeções. Uma terceira série de poucos casos selecionados foi utilizada para hibridização *in situ*, para GAD67 ou VGLUT2.

3.4 Marcação de Imunoperoxidase

Tanto CTb (LUPPI; FORT; JOUVET, 1990) quanto FG foram processados pelo método de imunoperoxidase. No caso de cortes destinados para incubação com anticorpos contra os traçadores FG e CTb, estes foram pré-tratados com 1% boroidreto de sódio (Sigma, Deisenhofen, Alemanha) em PB (10 minutos), seguido de lavagem em PB 5 vezes (x) de 5 minuto e pré-incubação em 1% H₂O₂ em PB contendo 10% metanol (10 – 15 minutos). Os cortes foram lavados novamente (5x de 5 minuto) em PB e depois pré-incubados durante 30 minutos em PB contendo soro normal a 2% (Jackson) proveniente da espécie em que foi gerado o anticorpo secundário. Os cortes foram então incubados durante 48 horas a 4°C com soluções dos respectivos anticorpos primários em PB contendo soro normal a 1% proveniente da espécie em que foi gerado o anticorpo secundário e Triton X-100 a 0,3% (no caso do CTb e FG). Foram utilizadas as seguintes diluições para os diferentes anticorpos primários: Anticorpo cabra anti-CTb (1:10.000; List), coelho anti-FG (1:10.000; Chemicon). Após várias lavagens em PB, os cortes foram incubados por duas horas com um anticorpo secundário biotinilado anti-coelho feito em cabra (Vector Laboratories, Inc.) diluído 1:200 em PB no caso do FG ou com anticorpo secundário biotinilado anti-cabra feito em burro (Jackson Immunochemicals, West Grove, PA) diluído 1:4.000 em PB, no caso do CTb. Após incubação com anticorpo secundário, os cortes foram lavados 5x em PB (5 minutos cada lavagem) e, em seguida, incubados por duas horas em um Kit ABC (ABC Elite Kit, Vector Laboratories), um complexo molecular pré-formado entre a avidina e a enzima biotinilada, que detecta a biotina do anticorpo secundário e se liga a essa. A seguir, foi utilizada a 3,3' diaminobenzidina (DAB) como cromógeno pelo método de glucose oxidase (ITO et al., 1979). Em alguns casos, a reação de DAB foi intensificada com 0,5% de sulfato de níquel. As lâminas foram mergulhadas em uma solução de tetróxido de ósmio a 0,05% por um período de 15 a 20 segundos. Os cortes foram montados em lâminas submersas previamente em uma solução de gelatina alúmen-cromo e finalmente cobertas com DPX e lamínula.

Cortes de animais sem injeções de CTb ou FG ficaram livres de marcação quando imunorreagidos como descrito acima. Especificidade dos anticorpos secundários foi indicada pela ausência de marcação em cortes de animais, com ou sem injeção, no qual o passo da incubação no primeiro anticorpo foi omitido.

3.5 Dupla-marcação de Imunofluorescência

Os cortes destinados para ensaios de imunofluorescência (IF) foram pré-tratados como descrito acima e incubados durante 72 horas a 4°C em um “cocktail” de dois anticorpos primários em PB contendo 1% soro normal de burro (NDS) e 0,3% Triton X-100. Foram usadas as seguintes diluições para os anticorpos primários: Coelho anti-FG diluído 1:2.500 e cabra anti-CTb diluído 1:10.000. Após várias lavagens em PB, os cortes foram incubados por 50 minutos em um segundo “cocktail” contendo os anticorpos secundários anti-coelho IgG feito em burro conjugado com o fluoróforo DYlight488 (Jackson Immunoresearch) e anti-cabra feito em burro conjugado com o fluoróforo DYlight594 (Jackson Immunoresearch) ambos diluídos 1:500 em PB contendo 0,3% Triton X-100. Após várias lavagens finais em Tris-HCL, os cortes foram finalmente montados em lâminas previamente submersas em gelatina alúmen-cromo e cobertas com solução “slow fade” (Molecular Probes).

Vários conjuntos de controles foram realizados, inclusive a omissão de um ou ambos os anticorpos primários, a omissão de um dos anticorpos secundários e a troca dos fluoróforos em relação aos diferentes marcadores.

3.6 Hibridização *in situ* com ^{35}S combinado com Imunoistoquímica para CTb

A técnica de hibridização *in situ* com ^{35}S foi utilizada para localização e quantificação de RNA mensageiros de interesse. Foi tomado cuidado para que todas as soluções utilizadas nesta metodologia estivessem livres de RNase ou tivessem sido preparadas a partir de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e autoclavadas. Cortes de cérebros de ratos que receberam anteriormente injeções de CTB no DR ou RMTg foram lavados com DEPC-PBS, pH 7,0 por uma hora, seguido por incubação em boridreto de sódio (Sigma) em DEPC-PBS por 15 minutos. Secções foram então incubadas por 10 minutos em anidro acético 0,25% (Merck, Darmstadt, Germany) em 0,1M de trietanolamina. A sonda anti-sense ^{35}S -marcada para GAD-67kDA foi gerada a partir de referências de cDNA como descrito previamente (ELIAS et al., 2001). Os plasmídeos contendo o DNA do GAD67 foram gentilmente fornecidos pelos Drs. N. Tillakaratne e J. C. Bittencourt (Universidade da Califórnia, Los Angeles, CA, USA, e Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil).

Aribosonda anti-sense ^{35}S -marcadas para VGLUT2 foi gerada a partir de referências de cDNA como descrito previamente (DONATO Jr. et al., 2010). Ela compreende as posições 2154 a 2526 do número de acesso NM_080853.3 do *GenBank*, incluindo partes dos éxons 11 e 12 do gene *Slc17a6*.

As sondas de cRNA foram diluídas para 10^6 cpm/ml em solução de hibridização e aplicada nos cortes. A solução de hibridização consistiu de 50% formamida, 10 mM Tris-HCl (Fisher Scientific, Fair Lawn, NY), 0,01% DNA de esperma de salmão cisalhada, 0,01% RNase A de levedura (Sigma), 0,05% RNA total de levedura (Sigma), 10 mM de ditiotreitol (Amresco, Solon, OH), 10% de sulfato de dextrano, 0,3M NaCl, 1 mM ácido etilenodiaminetracético (EDTA, pH 8,0) e 1x solução de Denhart (Sigma). Os cortes foram hibridizados por 16 horas à 56°C. No dia seguinte, os tecidos foram lavados quatro vezes em cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) e foram incubados em RNase A à 0,002% (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) diluído em 0,5M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, e 1 mM de EDTA por 30 minutos à 37°C. Os cortes foram submetidos a uma lavagem em 0,1x SSC por 60 minutos em 55°C. Subsequentemente, os cortes foram incubados no anticorpo anti-CTb por 48 horas (1:5,000) como descrito acima, usando DAB com cromógeno. Os cortes foram montados em lâminas SuperFrost Plus (Fisher Scientific) e desidratados em concentrações de etanol crescentes. Depois da secagem, os cortes foram colocados em um filme cassete de raios-X BMR-2 (Kodak, Rochester, NY) por 2 dias. Os cortes foram mergulhados em emulsão fotográfica NTB2 (Kodak) enxugados, guardados em um recipiente para secagem, em caixas envolvidas por papel alumínio a 4°C por 16-20 dias. As lâminas foram reveladas com revelador D-19 (Kodak), e desidratadas, deslipidificadas com xilol e cobertas com DPX e lamínula.

3.7 Análise e Documentação

Cortes revelados pela técnica de imunoperoxidase e hibridização *in situ* foram examinados ao microscópio óptico de campo claro e escuro. (Axioimager A1, Zeiss, Muenchen, Germany). Cortes revelados pela técnica de imunofluorescência foram examinados com o mesmo microscópio sob iluminação de epifluorescência. Fotomicrografias digitais foram adquiridas com uma câmera digital (AxioCam HRC, Zeiss) usando o software Axiovision (Zeiss, versão 4.8.2). Os locais de injeção e a distribuição da marcação retrógrada de alguns casos representativos foram

mapeados usando o programa de desenho AutoCad R13 e uma câmera lúcida acoplada a um microscópio Diaplan (Leitz, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e situada frente a um monitor (Pivot 1700, Portrait Display Labs.).

A quantificação de neurônios simples ou duplamente marcados para CTb e/ou FG em cortes hipotalâmicos processados pela técnica de dupla-imunofluorescência, também foi realizada com o software Axiovision. Esse programa permite a aquisição de imagens de canais de fluorescência separados e uma superposição subsequente destas imagens. A identificação de neurônios simples ou duplamente marcados foi realizada em imagens em um formato de 1388 x 1040 pixels, adquiridas com objetiva 20x e centradas em distintas regiões hipotalâmicas. Quando necessário, as regiões de interesse foram circundadas nas imagens. Todos os neurônios com corpos celulares nitidamente em foco nas regiões de interesse foram considerados para análise, plotados eletronicamente e classificados como simples ou duplamente marcados.

Cortes processados pela técnica de hibridização *in situ* seguido pela imunistoquímica para CTb foram examinados sob iluminação de campo claro e escuro. A classificação de neurônios CTb+ contendo mRNA de GAD-67 ou VGLUT3 foi realizada da seguinte maneira: Fotomicrografias com foco na superfície do corte foram adquiridas com objetiva de 40x ou 100x em um formato de 1388 x 1040 pixels. Considerando que a penetração dos anticorpos primários e secundários para CTb foi muito maior que aquela das partículas de prata indicativo para mRNA, somente neurônios CTb+ em foco na superfície do corte foram considerados para análise. Neurônios CTb+ foram considerados como duplamente marcados, quando a densidade das partículas de prata acima do corpo celular foi três vezes maior (> 10 partículas de prata por neurônio) que a marcação de fundo

As fotomicrografias foram processadas e montadas com o programa Adobe Photoshop (Versão 7.0). A nomenclatura e a posição do RMTg usadas neste trabalho foram baseadas nas descrições de Jhou et al. (2009a, b). A nomenclatura das outras estruturas foi quase exclusivamente conforme o atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1998).

4 RESULTADOS

4.1 Experimentos de Rastreamento Retrógrado:

4.1.1 Injeções na VTA

Foram analisados cinco casos (R49, R70, R 82, R97, RL21) com injeções na VTA. As injeções na VTA visaram o núcleo parabraquial pigmentoso e a maioria delas foi centrada nesse subnúcleo da VTA (Figs. 1A-C). Porém, uma parte das injeções também envolveu perifericamente o subnúcleo paranigral da VTA, a parte medial da substância negra, parte compacta ou o núcleo interpeduncular. Em geral, injeções na VTA resultaram em um grande número de neurônios retrogradamente marcados no hipotálamo e os diferentes casos apresentaram um padrão geral de marcação bastante semelhante. A marcação retrógrada é predominantemente ipsilateral, com um menor número de neurônios marcados em regiões homólogas no hemisfério contralateral. Caso R49, que teve uma injeção centrada na parte rostral do núcleo parabraquial pigmentoso foi escolhido como representativo e a distribuição da marcação retrógrada é mostrada nas figuras 2A-G.

No hipotálamo rostral, toda a extensão rostro-caudal da zona lateral e da região pré-óptica com seus principais componentes MPA, MPO e LPO se destacaram pela sua marcação retrógrada muito robusta (Figs. 3A, 4A). Na zona periventricular e medial, foram encontrados um número reduzido de neurônios retrogradamente marcados. Os núcleos pré-óptico mediano (MnPO) e paraventricular (Pa), situados na zona periventricular, exibiram somente uma marcação moderada. Na zona medial do hipotálamo, os núcleos MPO (Fig. 3A) e DM (Fig. 5A) foram os dois núcleos com a mais robusta marcação retrógrada. De forma interessante, no MPO a marcação retrógrada diminui bastante em direção caudal (Fig. 4A). Na região tuberal do hipotálamo, foi observada uma marcação contínua e bastante característica em forma de arco, originando perto do DM, passando dorsalmente sobre o fórnix e chegando lateralmente à parte peduncular do hipotálamo lateral (PLH, Fig. 5B). O LH juntamente com a LPO se destacou como a região hipotalâmica mais robustamente marcada (Fig. 5A) Um proeminente agregado de neurônios retrogradamente marcados foi tipicamente encontrado nas

regiões caudais do PLH (Fig. 5E). Somente poucos neurônios retrogradamente marcados foram encontrados espalhados no núcleo arqueado e nas diferentes partes do núcleo ventromedial do hipotálamo (Fig. 5A).

4.1.2 Injeções no DR

Foram analisados quatro casos (R49, R64, R65, R97) com injeção de traçador retrógrado no DR. Todas as injeções tiveram como alvo a parte central do DR com o centro da injeção localizado entre a parte dorsal e ventral do DR (Figs. 1D-F). Todas nossas quatro injeções foram restritas ao DR. Como esperado para injeções em estruturas da linha média, a marcação foi bilateral. Caso R64, com uma injeção centrada entre a parte central e ventral do DR, foi escolhido como representativo e a distribuição da marcação retrógrada é mostrada nas figuras 2A'-G'. De um modo geral, injeções no DR resultaram em um padrão de marcação hipotalâmica bastante semelhante daquele descrito para injeções na VTA, com uma clara tendência de uma marcação numericamente reduzida em áreas homólogas (Fig. 2). Assim, semelhante aos casos com injeção na VTA, toda a extensão rostrocaudal da região pré-óptica (Figs. 3C, 4C), assim como a zona lateral, se destacaram como as regiões hipotalâmicas mais robustamente marcadas (Fig. 2A'-G'). Porém, na parte caudal da região pré-óptica, injeções no DR resultaram em um número aumentado de neurônios retrogradamente marcados em comparação com injeções na VTA, enquanto o inverso foi válido para a LPO (compara Figs. 2C e 2C' e Figs. 4A e C). Ademais, uma marcação retrógrada reduzida foi encontrada em alguns núcleos da zona periventricular e medial. Assim, os núcleos MnPO e Pa, situados na zona periventricular apresentaram somente uma marcação modesta. Semelhantemente aos casos da VTA, foi observado que o MPO e DM contêm a maior quantidade de neurônios retrogradamente marcados na zona medial do hipotálamo. Analogamente aos casos da VTA, foi observado na região tuberal a presença de neurônios retrogradamente marcados, que se estenderam de forma característica do DM até o PLH (Fig. 5C), que também apresentou marcação robusta na sua parte caudal. Um número muito pequeno de neurônios retrogradamente marcados foi encontrado no núcleo arqueado ou imediatamente em torno dele.

4.1.3 Injeções no RMTg

Analizamos quatro casos com (R62, R64, R65 e RL21) injeções centradas no RMTg. Todas nossas injeções no RMTg foram localizadas em um nível caudal do núcleo interpeduncular (Figs. 1G-I, Fig. 6D). O padrão geral de marcação hipotalâmica se apresentou muito semelhante nestes quatro casos. Em geral, as injeções no RMTg resultaram em marcação retrógrada nas mesmas regiões hipotalâmicas que injeções na VTA e DR. Porém, o número de neurônios retrogradamente marcados, resultantes de injeções no RMTg, foi consideravelmente menor comparado aos casos com injeções na VTA ou DR (Figs. 2A''-G''). A marcação retrógrada no hipotálamo, proveniente da injeção no RMTg, é predominantemente ipsilateral, com um menor número de neurônios marcados encontrados em regiões homólogas do hemisfério contralateral. O caso R64 que teve uma injeção relativamente grande centrada na parte caudal do RMTg (Fig. 1H) foi escolhido como caso representativo e a distribuição da marcação retrógrada é mostrada nas figuras 2A''-G''. De novo, a maior quantidade de neurônios retrogradamente marcados foi observada na região pré-óptica (Figs. 3B, 4B) e na zona lateral do hipotálamo. Em outras regiões da zona periventricular e medial foram encontrados somente poucos neurônios retrogradamente marcados. Na zona periventricular, apesar de apresentar somente uma marcação esparsa, neurônios retrogradamente marcados foram encontrados principalmente nos núcleos MnPO e Pa. Na zona medial, o MPO foi o local com marcação retrógrada mais acentuada enquanto uma marcação somente esparsa foi observada no DM. Mesmo contendo um número de neurônios retrogradamente reduzido comparados aos casos com injeção na VTA ou no DR, a característica configuração na parte dorsal da região tuberal do hipotálamo, que se estende do DM até o PLH, também foi observada seguida de injeções no RMTg (Fig. 5C).

Em geral, é interessante notar que a VTA, DR e RMTg recebem projeções das mesmas regiões hipotalâmicas. Essa observação claramente deixa especular que neurônios nessas regiões hipotalâmicas podem se projetar através de colaterais axônicos para mais de um alvo. Com a finalidade de testar esta hipótese, injetamos dois traçadores retrógrados no mesmo animal, dividindo-os em três grupos, grupo VTA/DR, VTA/RMTg e DR/RMTg. A marcação retrógrada nesses casos foi revelada por técnicas de dupla-imunofluorescência.

4.2 Experimentos de Dupla-Imunofluorescência

A maioria dos casos analisados no presente estudo recebeu injeções simultâneas de dois traçadores retrógrados (FG e CTb) em duas estruturas alvos. Nestes animais, uma série de cortes foi destinada para processamento pela técnica de dupla-imunofluorescência para investigar a existência de neurônios hipotalâmicos que projetam via colaterais axônicos para mais de um alvo. Somente casos nos quais nós acertamos perfeitamente as duas injeções (injeções restritas e de tamanho comparável) foram escolhidos para a análise de células duplamente marcadas (Fig. 6). Assim, a quantidade de casos e também dos cortes disponíveis para análise é pequena, não permitindo uma análise estatística detalhada.

4.2.1 Injeções no DR/RMTg

O caso R64 que teve uma injeção de FG bem restrita no DR (Fig. 1E) e uma injeção restrita de CTb no RMTg (Fig. 1H) foi escolhido para a análise de células duplamente marcadas. Apesar de essas duas estruturas receberem projeções das mesmas regiões hipotalâmicas, observamos somente uma pequena percentagem de neurônios que projetam para os dois alvos. Assim, de um total de 613 células hipotalâmicas analisadas nesse caso, somente 35 (5,7%) foram duplamente marcadas (Tabela 3), indicando que essas células projetam para ambos os alvos. A LPO apresentou a maior quantidade de células duplamente marcadas ($n = 19$), representando 9,4% de um total de 202 células analisadas. Somente 3,4% de um total de 179 células analisadas no MPO (Fig. 7) foram duplamente marcadas. Finalmente, no LH classificamos 4,3% de um total de 232 células analisadas como duplamente marcadas (Fig. 8).

4.2.2 Injeções na VTA/DR

O caso R97 foi escolhido para a análise de células duplamente marcadas porque ele teve uma injeção de FG bem centrada na parte rostral da VTA (Fig. 6A), junto com uma injeção de CTb restrita a parte dorsal do DR (Fig. 6B). Assim, como detectado no grupo com injeções no DR/RMTg, foi observado que somente poucos

neurônios hipotalâmicos foram duplamente marcados, representando 8,1% de um total de 384 células analisadas (Tabela 3). De forma diferente do caso com injeção no DR/RMTg que apresentou o maior número de neurônios duplamente marcados na LPO, no caso R97, oMPO se destacou por conter a maior quantidade de neurônios hipotalâmicos duplamente marcados. Assim, no MPO, 11,2% de um total de 223 neurônios analisados foram classificados como duplamente marcados (Fig. 9). Somente 5% de um total de 161 células analisadas foram duplamente marcadas no LH.

4.2.3 Injeções na VTA/RMTg

O caso RL21 foi o único caso estudado e analisado com injeções na VTA/RMTg. Isto foi devido à grande dificuldade de obter injeções restritas nessas duas regiões imediatamente adjacentes. Nesse caso, a injeção de FG foi centrada na parte rostral da VTA (Fig. 6C) e assim no máximo possível separada da injeção de CTb no RMTg (Fig. 6D). O caso RL21 apresentou uma percentagem maior de células duplamente marcadas comparado aos casos com injeções no DR/RMTg ou na VTA/DR, totalizando 13,4% de um total de 194 células analisadas (Tabela 3). O caso RL21 teve como principal fonte de projeções colaterais duas áreas hipotalâmicas, a LPO (Fig. 10) e o LH. Curiosamente observamos a mesma percentagem de neurônios duplamente marcados (13,4% de um total de 97 neurônios analisados), tanto na LPO como no LH.

Em resumo, observamos somente um pequeno número total de neurônios duplamente marcados resultantes das injeções no DR/RMTg, VTA/DR e VTA/RMTg. Porém, é importante ressaltar que no caso dos poucos neurônios projetando para o RMTg, um pequeno número total pode ser equivalente a uma percentagem elevada. Assim no caso RL21, os 13 neurônios duplamente marcados na LPO foram equivalentes a 35,1% do número total dos neurônios que se projetam para o RMTg (Tabela 3 – última coluna).

Tabela 3 Números absolutos e percentagens dos neurônios duplamente marcados.

R64 DR/RMTg		Dupla	DR	RMTg
	LPO n = 202	19 (9,4)	155 (12,3)	66 (28,8)
	MPO n = 179	6 (3,4)	148 (4,1)	37 (16,2)
	LH n = 232	10 (4,3)	192 (5,2)	50 (20,0)
R97 VTA/DR		Dupla	VTA	DR
	MPO n = 223	25 (11,2)	150 (16,7)	98 (25,5)
	LH n = 161	8 (5,0)	116 (6,9)	53 (15,1)
RL21 VTA/RMTg		Dupla	VTA	RMTg
	LPO n = 97	13 (13,4)	73 (17,8)	37 (35,1)
	LH n = 97	13 (13,4)	73 (17,8)	37 (35,1)

Os números em parênteses representam as porcentagens

4.3 Hibridização *in situ* com ³⁵S combinado com Rastreamento Retrógrado

Nesses experimentos combinados, foram usados cortes de animais especificamente preparados, nos quais todos os passos pós-cirúrgicos foram executados com soluções livre de RNase. Em estudos pilotos ficou claro que somente o traçador CTb, mas não FG, é perfeitamente compatível com os protocolos usados. Finalmente, ficamos somente com dois casos (RL21, RL23) nos quais nós obtivemos séries completas do hipotálamo hibridizados com sondas de cRNA para GAD-67kDA e para VGLUT2. Caso RL21 teve uma injeção de CTb muito bem restrita ao RMTg (Fig. 6D) junto com uma injeção de FG na VTA e caso RL23 uma injeção de CTb centrada na parte ventral do DR. O padrão geral da marcação retrógrada nesses dois casos foi absolutamente comparável com aquele descrito nos parágrafos 4.1.2 e 4.1.3.

4.3.1 Hibridização *in situ* para GAD-67kDA

Em geral, a sonda de cRNA para GAD-67kDA resultou em uma marcação bastante diferenciada e específica. Neurônios GABAérgicos em todas as regiões cerebrais foram caracterizados pela densa aglomeração de partículas de prata indicativo para GAD-67kDA mRNA. A especificidade da sonda ficou clara examinando núcleos sabidamente GABAérgicos como o núcleo reticular do tálamo (imagem inserida em Fig. 11C), ou pela característica distribuição espalhada de interneurônios GABAérgicos no córtex.

No hipotálamo, detectamos um padrão de distribuição de partículas de prata indicativo para GAD-67kDA mRNA bastante diferenciada (Figs. 11,12). Isso significa, que distintas regiões hipotalâmicas claramente se destacaram por conter um número aumentado de neurônios GABAérgicos, enquanto outras pareceram quase ou completamente livre deles. Assim, na parte rostral do hipotálamo, o MPO, a LPO, bem como todas as partes da área hipotalâmica anterior exibiram robusta marcação indicativo de GAD-67kDA mRNA. Em contraste, a parte ventral da MPA e em particular a parte rostral do PLH assim como o Pa somente contém pouco transcrito de GAD67 (Figs. 11A-C, 12A-C). Caudalmente, a densidade do transcrito de GAD67 aumentou e no nível do PeFLH todas as áreas hipotalâmicas dorsal e em torno do

fórnix e também o TuLH exibiram uma alta densidade de GAD-67kDA mRNA (Fig. 11D). Na parte ventral do hipotálamo, o núcleo ventromedial do hipotálamo se destacou como um núcleo quase completamente livre de GAD-67kDA mRNA (Fig. 11D,E), enquanto o núcleo arqueado foi robustamente marcado (Fig. 11F).

Em muitas regiões hipotalâmicas encontramos números elevados de neurônios com agregados de partículas de prata acumulado sobre o imunoprecipitado de CTb indicativo de neurônios duplamente marcados. Porém, somente em fotomicrografias tirados com um objetivo de 40x ou 100x e com foco na superfície do corte (ver Paragrafo 3.7) se deixou esclarecer certamente se esses neurônios realmente contêm ambos os marcadores. Esse procedimento demorado não permitiu uma análise quantitativa sistemática. Todavia, essa forma de análise proporcionou algumas observações importantes.

Em caso RL21 que recebeu uma injeção grande de CTb no RMTg, observamos que a maior parte dos neurônios CTb+ na LPO também exibiu aglomerações de partículas de prata indicativo para GAD-67kDA mRNA (imagem inserida em Fig. 11A). O mesmo vale para o PLH, onde em muitas fotomicrografias examinadas em detalhe, quase todos os neurônios CTb+ apareceram duplamente marcadas (imagem inserida em Fig. 11D). Porém, nesses dois núcleos também observamos neurônios CTb+ que foram localizados na superfície do corte mas não exibiram partículas de prata. Além disso, no caso RL21 poucos neurônios duplamente marcados foram observados no MPO, na MPA, no PeFLH e núcleo arqueado.

No caso RL23 com uma injeção centrada na parte ventral da DR a distribuição de células duplamente marcadas foi diferente. Nesse caso, o maior número de neurônios CTb+ contendo partículas de prata foi detectado no MPO (imagem inserida em Fig. 12A) e LPO. Semelhante com o caso RL21, uma boa parte dos neurônios CTb+ no PLH foi duplamente marcada (imagem inserida em Fig. 12D). Nos dois casos, os neurônios CTb+ exibindo partículas de prata foram particularmente enriquecidos na parte tuberal do PLH. Enquanto na LPO neurônios duplamente marcados foram tipicamente encontrados lado a lado de neurônios CTb+ sem partículas de prata, no PLH observamos uma clara tendência de neurônios GAD+ projetando para o DR aglomerando-se numa região situada lateralmente do fórnix. Além disso, poucos neurônios duplamente marcados também foram encontrados espalhados na MPA, LPO e ainda mais raramente no PeFLH.

4.3.2 Hibridização *in situ* para VGLUT2

Em geral, a sonda de cRNA para VGLUT2 resultou em uma marcação diferenciada e específica na maioria das áreas cerebrais. A especificidade da sonda ficou óbvia examinando regiões sabidamente glutamatérgicas e com predominância de VGLUT2, como a LHb e o tálamo (Fig. 13C). Nessas regiões, neurônios glutamatérgicos claramente foram caracterizados pela densa aglomeração de partículas de prata indicativo para VGLUT2 mRNA. Infelizmente, em concordância com a literatura (ROSIN et al., 2003; VONG et al., 2011), na maioria das regiões hipotalâmicas o sinal para VGLUT2 foi mais fraco que no tálamo ou em outras áreas subcorticais, dificultando a detecção de neurônios duplamente marcados.

Assim, no hipotálamo, detectamos um padrão de distribuição de partículas de prata indicativo para VGLUT2 mRNA não muito diferenciada (Figs. 13,14). Isso significa que somente poucos núcleos hipotalâmicos como o VMH (Fig. 13A) claramente se destacaram por um sinal forte indicativo para VGLUT2 mRNA. Além disso, uma ampla faixa indo do DM até o PLH apresentou uma marcação homogênea e levemente aumentada para VGLUT2 na parte dorsal do hipotálamo. Em contraste, todas as partes da área hipotalâmica anterior, assim como o núcleo arqueado, exibiram um sinal mais fraco para VGLUT2 que o restante do hipotálamo (Fig. 13A).

Cortes adjacentes daqueles hibridizados com sondas para GAD-67kDA dos dois casos RL 21 (com injeção de CTb no RMTg) e RL 23 (com injeção de CTb no DR) foram hibridizados com sondas para VGLUT2 e analisados para células duplamente marcadas. De novo, somente em fotomicrografias tiradas com um objetivo de 40x ou 100x e com foco na superfície do corte (ver Paragrafo 3.7) se deixou esclarecer certamente se neurônios CTb+ também contêm um número aumentado de partículas de prata indicativo para VGLUT2 mRNA. Outro fator complicador foi o fundo aumentado de partículas de prata em comparação com cortes hibridizados com sondas para GAD-67kDA. Todavia, em ambos os casos analisados, distinguimos uma fração de células CTb+ claramente contendo densas aglomerações de partículas de prata indicativo para VGLUT2 mRNA. Essas células duplamente marcadas, foram principalmente registradas em núcleos como o DM (Fig. 13B), PeFLH e PLH, nos quais o sinal para VGLUT2 foi levemente aumentado comparado ao restante do hipotálamo.

5 DISCUSSÃO

Nossos achados de rastreamento retrógrado reforçaram a noção que o hipotálamo é uma das principais fontes de inervação da VTA, DR e RMTg. Observamos que as mesmas regiões hipotalâmicas emitem projeções para a VTA, o DR e o RMTg. Entretanto, a maioria de neurônios individuais no hipotálamo inerva somente uma das três estruturas injetadas, com uma minoria (<10%) projetando via colaterais axônicos para mais do que um alvo. Finalmente, nossos experimentos de hibridização *in situ* com ³⁵S combinado com rastreamento retrógrado mostram que a VTA, o DR e o RMTg recebem assim entradas hipotalâmicas glutamatérgicas, como também robustas entradas GABAérgicas. Resumido, nossos achados indicam que as projeções hipotalâmicas para núcleos mesencefálicos e mesopontinos envolvidos em mecanismos de recompensa e aversão exibem um altíssimo grau de complexidade, permitindo excitar ou inibir essas estruturas de forma independente ou em conjunto.

5.1 Projeções hipotalâmicas para a VTA

Semelhante aos resultados de estudos anteriores de rastreamento neural que investigaram de uma forma geral as aferências da VTA (FADEL; DEUTCH, 2002; GEISLER; ZAHM, 2005; PHILLIPSON, 1979a), detectamos ricas entradas hipotalâmicas para a VTA que se originam de um amplo conjunto de núcleos diferentes. Já no estudo clássico de Phillipson (1979c) que investigou as aferências para a VTA através de injeções do traçador HRP (um traçador menos sensível que os atuais), o hipotálamo lateral foi descrito como uma das principais entradas da VTA. Esse achado foi depois confirmado através de estudos usando traçadores mais sensíveis, como o FG (GREENWELL et al., 2002; GEISLER; ZAHM 2005) ou, recentemente traçadores virais (NIEH et al., 2015; WATABE-UCHIDA et al., 2012). Em concordância com os trabalhos acima citados, observamos também uma marcação bastante robusta nas diferentes partes do LH. Toda a região pré-óptica foi aqui identificada como outra fonte principal de entradas hipotalâmicas para a VTA. Também esse achado confere plenamente com dados prévios da literatura

(GEISLER; ZAHM 2005; SAITO et al., 2013; SIMERLY; SWANSON, 1988; WATABE-UCHIDA et al., 2012).

Além do LH, o MPO, a LPO e o DM, há as outras regiões contendo números elevados de neurônios retrogradamente marcados, o que confere perfeitamente com trabalhos anteriores (GEISLER; ZAHM, 2005; GREENWELL et al., 2002). De forma similar, como descrito por Geisler e Zahm (2005), nós também detectamos somente uma marcação moderada no MnPO e poucos neurônios marcados situados na área hipotalâmica dorsal. Contudo, verificamos no Pauma marcação moderada de neurônios retrogradamente marcados, e não somente poucos neurônios espalhados como destacado por Geisler e Zahm (2005). Semelhante como anteriormente descrito por Fadel e Deutch (2002) e Geisler e Zahm (2005), observamos uma característica muito marcante da marcação retrógrada hipotalâmica em nossos casos. Assim, notamos de forma consistente um característico agrupamento de células retrogradamente marcadas em forma de arco que se estendeu do DM, passando pelo PeFLH e sobre o fórnix, até chegar ao PLH. A marcação contínua encontrada aqui nas regiões tuberal, e também pré-óptica do hipotálamo, sublinham observações anteriores (GEISLER; ZAHM, 2005) que a marcação hipotalâmica seguida de injeções na VTA não necessariamente obedece a limites entre distintos núcleos. Outras regiões hipotalâmicas também exibiram neurônios retrogradamente marcados, porém em quantidades muito menores que as áreas mencionadas acima. Em outro estudo hodológico foi notado a presença de neurônios retrogradamente marcados na zona incerta, hipotálamo posterior, área tuberomamilar, núcleo arqueado, e núcleo ventromedial (GREENWELL et al., 2002), porém em nosso material somente notamos uma marcação muito esparsa em todas essas regiões.

Os resultados de vários outros estudos que investigaram as projeções de grupamentos hipotalâmicos com assinatura neuroquímica específica também reforçam os nossos dados, mostrando que o PeFLH, o DM e a zona hipotalâmica lateral, (FADEL; DEUTCH, 2002; GONZALEZ et al, 2012; MAHLER; ASTON-JONES, 2012; RICHARDSON; ASTON-JONES, 2012;), assim como o Pa (RODAROS et al., 2007) se projetam para a VTA.

5.2 Projeções hipotalâmicas para o DR

As projeções aferentes ao núcleo dorsal da rafe foram descritas em detalhe por Peyron e colegas (1998) e Lee e colaboradores (2003, 2005). A grande maioria de nossos achados está em concordância com os resultados de diversos estudos anteriores que investigaram as projeções hipotalâmicas para o DR. Assim, observamos que a zona lateral em toda sua extensão rostrocaudal contém o maior número de neurônios que se projetam para o DR (LEE et al., 2003, 2005; PEYRON et al., 1998; SAPER et al., 1979). Um destaque na zona lateral é uma marcação contínua e bastante característica que se estendeu do DM até chegar lateralmente no PLH (LEE et al., 2003, 2005; PEYRON et al., 1998; SAPER et al., 1979). Como descrito anteriormente em diversos estudos, observamos uma marcação muito robusta no MPO (LEE et al., 2003; PEYRON et al., 1998; SIMERLY; SWANSON, 1988;) e DM (LEE et al., 2005), assim como uma marcação somente moderada no MnPO (PEYRON et al., 1998), área pré-óptica ventrolateral (STEININGER et al., 2001), e Pa (LEE et al., 2003). Em contraste com achados anteriores (LEE et al., 2003; PEYRON et al., 1998), não encontramos uma marcação retrógrada robusta no núcleo arqueado, mas somente poucos neurônios espalhados. Isso igualmente vale para o núcleo ventromedial do hipotálamo, contrastando com a marcação robusta descrita por Peyron e colaboradores (1998).

5.3 Projeções hipotalâmicas para o RMTg

As aferências hipotalâmicas para o RMTg, foram primeiramente investigadas recentemente através de experimentos utilizando os traçadores CTb e FG por Kaufling e colaboradores (2009) e Jhou e colaboradores (2009a). Estes trabalhos tiveram como objetivo analisar as projeções de todo o encéfalo para o RMTg e não detalharam as projeções hipotalâmicas para o RMTg. Em geral, nossos resultados corroboram bastante com os principais resultados desses estudos, mostrando que toda a região pré-óptica (MnPO, MPO, MPA, LPA, núcleo pré-óptico magnocelular) contém neurônios retrogradamente marcados, e junto com o LH e Pa, constitui a principal fonte de entradas hipotalâmicas para o RMTg. De conformidade

com os achados de Kauflinge colaboradores (2009) demonstramos no presente estudo que injeções de traçador retrógrado na VTA e no RMTg, resultam em um padrão geral de marcação hipotalâmica bastante semelhante. Porém, em contraste aos resultados de Kaufling e colaboradores (2009) e também Jhou e colaboradores (2009a), verificamos que injeções restritas ao RMTg resultaram em números de neurônios retrogradamente marcados consideravelmente menores comparados com casos com injeções na VTA. Isso se deve ao fato de que as nossas injeções no RMTg em casos escolhidos para análise, parecem menores e bastante restritas ao RMTg. Precisa ser considerado que o RMTg é localizado imediatamente caudal a VTA. Assim, observamos em casos nossos descartados para análise que já um pequeno envolvimento da VTA nas injeções no RMTg, aumentou de forma significativa a marcação retrógrada no hipotálamo e outras regiões.

ALPO e o LH constituem também duas das principais entradas para a LHb (KOWSKI et al., 2008; POLLER et al., 2013;). Visto que a LHb, em torno, é uma das entradas dominantes do RMTg (GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; HERKENHAM; NAUTA, 1979; JHOU et al., 2009b), isso significa que neurônios na LPO e o LH podem influenciar o RMTg de forma direta e indireta.

Resumido, nós observamos no presente estudo que neurônios retrogradamente marcados no hipotálamo seguidos de injeções na VTA, DR ou RMTg geralmente não são restritos a distintos núcleos, mas constituem uma formação alongada remanescente do “cerne isodendrítico” (RÁMON MOLINER; NAUTA, 1966) que se estende por todo o hipotálamo e outras estruturas. Esse padrão de organização já foi destacado por Geisler e ZAHM (2005) em um trabalho clássico descrevendo as aferências da VTA. Os nossos dados indicam que as projeções hipotalâmicas para o DR e RMTg seguem esse padrão e mostram uma organização bastante semelhante.

5.4 Projeções colaterais

Apesar do fato que as mesmas regiões hipotalâmicas inervam a VTA, DR e RMTg, nossos resultados indicam que o hipotálamo contém somente uma pequena percentagem (<10%) de neurônios que inerva simultaneamente mais do que um desses alvos. Por questões técnicas, a percentagem de neurônios duplamente marcados no presente estudo ainda pode ser superestimada. A primeira causa possível para um resultado falso positivo é a incorporação de traçador por fibras de

passagem lesionados. Porém, os traçadores (FG e CTb) assim como o método de injeção de traçador usados no presente estudo (iontoforese) estão pouco propensos de lesionar fibras de passagem (LUPPI et al., 1990). Necrose acentuada no local de injeção tem sido considerada como a principal causa de captação do traçador por fibras de passagem (LUPPI et al., 1995). No entanto, independente do traçador injetado, raramente encontramos sinais de necrose severa nos locais de injeção em nossos casos. Porém, pela proximidade dos locais de injeção no caso de injeções simultâneas na VTA e no RMTg, um resultado falso positivo pode também resultar de um certo grau de sobreposição dos locais de injeção. Apesar de termos encontrado a maior percentagem de neurônios duplamente marcados em animais que receberam pares de injeções nessas duas estruturas imediatamente adjacente, não podemos completamente excluir essa possibilidade.

Ainda não existem estudos que analisaram o grau de colateralização das projeções hipotalâmicas para a VTA, o DR e o RMTg. Na literatura existente, encontramos somente um trabalho descrevendo entradas hipotalâmicas colateralizadas para o DR e o lócus cerúleo (LEE; KIM; WATERHOUSE, 2005). De forma interessante, em distritos hipotalâmicos como o LH e a LPO, esses autores descreveram percentagens de neurônios duplamente marcadas muito semelhantes àquelas encontradas no nosso estudo. Outro estudo examinou projeções laterais de neurônios hipotalâmicos orexinérgicos para o núcleo ambíguo e o núcleo do trato solitário (CIRIELLO et al., 2003). De novo, esses autores também detectaram somente um número reduzido de neurônios hipotalâmicos (em torno de 3%) que emite laterais para mais de uma das estruturas investigadas. O mesmo vale para um estudo recente que investigou as projeções da LHb para a VTA, o DR e o núcleo mediano da rafe, através de injeções simultâneas de dois traçadores retrógrados em pares dessas estruturas (BERNARD; VEH, 2012). Finalmente, também as projeções da VTA para estruturas corticais e sub-corticais foram descritas como pouco colateralizadas (LOUGHLIN; FALLON, 1984).

Projeções axônicas laterais possibilitam uma coordenação temporal e espacial estreita das respostas dos neurônios pós-sinápticos contatados (CASSELL; SIEGEL; WRIGHT, 1979). Assim o grau reduzido de projeções laterais detectado no presente estudo pode significar que as ações hipotalâmicas sobre regiões envolvidas em mecanismos de recompensa e aversão não necessitam de uma coordenação muito estreita. Também, foi postulado que o grau de colateralização de

projeções diminuí bastante não somente durante a filogênese, mas também durante a ontogênese (SARTER; MARKOWITSCH, 1985), indicando que os restantes neurônios hipotalâmicos duplamente marcados podem ser remanescentes de uma população maior durante a ontogênese. Porém, contestando essa hipótese, existem sistemas de projeção que mesmo em adultos ainda são bastante colateralizados. Assim, um estudo recente de rastreamento neural usando um desenho experimental igual ao nosso, mostrou que as projeções do PFC para a VTA/DR parecem estar bastante ramificadas, com cerca de 50% dos neurônios do PFC projetando para os dois alvos (VÁZQUEZ-BORSETTI et al., 2011). Ademais, no mesmo estudo, esses autores confirmaram a alta percentagem de neurônios do PFC projetando simultaneamente para a VTA e o DR por métodos eletrofisiológicos.

É importante notar que distintos núcleos hipotalâmicos podem usar vias indiretas, além de projeções colaterais diretas, para se comunicar quase simultaneamente com núcleos monoaminérgicos diferentes. Assim como demonstrado por Luo e Aston-Jones (2009), o núcleo supraquiasmático se projeta indiretamente para a VTA via o MPO que também emite, como mostrado no presente trabalho e na literatura (LEE et al., 2003; PEYRON et al., 1998), projeções bastante robustas para o DR.

5.5 Assinatura neuroquímica das entradas hipotalâmicas

Apesar de que os resultados dos nossos experimentos de hibridização *in situ* com sondas radiomarcadas com ³⁵S combinados com injeções de CTb na DR e o RMTg são baseados em somente dois casos, eles sublinham que essas duas regiões recebem assim entradas hipotalâmicas glutamatérgicas, como também robustas entradas GABAérgicas. Em geral, nossos achados sobre a distribuição de GAD67kDA e VGLUT2 mRNA no hipotálamo conferem com os resultados de estudos prévios de hibridização *in situ* (GEISLER et al., 2007; ROSIN et al., 2003). Isso inclusive vale para o sinal relativamente fraco de VGLUT2 descrito no hipotálamo. Porém, os trabalhos citados acima indicam que métodos não-radioativos de hibridização *in situ* para VGLUT2 parecem mais adequados para uma combinação com rastreamento retrógrado. Em conjunto com os resultados de estudos anteriores investigando a assinatura neuroquímica das entradas hipotalâmicas para núcleos envolvidos em mecanismos de recompensa e aversão (GERVASONI et al., 2000; GEISLER et al., 2007; JENNINGS et al., 2015; KARNANI

et al., 2013; NIEH et al., 2015), nossos achados indicam uma heterogeneidade muito grande com respeito à neuroquímica e conectividade dessas entradas.

A maioria dos estudos citados acima se refere às entradas hipotalâmicas para a VTA e quase não existem estudos anteriores focando aquelas do DR e RMTg. Em plena concordância com os achados de um estudo prévio de Gervasoni e colaboradores (2000), identificamos o MPO, a LPO e o PLH como as principais fontes hipotalâmicas GABAérgicas do DR. GABA não é co-localizado com neuropeptídeos como a orexina e MCH (JENNINGS et al., 2015; KARNANI et al., 2013). No entanto, a maioria dos neurônios orexinérgicos no hipotálamo co-expressa VGLUT2 (ROSIN et al., 2003). Assim, os neurônios hipotalâmicos orexinérgicos projetando para o DR e outras estruturas descrito por Peyron e colaboradores (2000) e os neurônios duplamente marcados para GAD67/CTb descrito no presente estudo, devem ser formados por populações diferentes. Esse exemplo mostra que uma co-localização específica de distintos neuropeptídeos com GABA ou glutamato resulta em uma enorme diversidade funcional e morfológica de possíveis subtipos de neurônios hipotalâmicos (SCHÖNE; BURDAKOV, 2012; ATASOY et al., 2012).

No outro lado, todos os neurônios na área hipotalâmica lateral que expressam receptores de leptina foram descritos como GABAérgicos (LEININGER et al., 2009) e experimentos deletando receptores de leptina seletivamente em neurônios glutamatérgicos ou GABAérgicos indicaram que a grande maioria dos efeitos anorexígenos da leptina é mediado por neurônios GABAérgicos (VONG et al., 2011). Além disso, os resultados de recentes estudos optogenéticos delinearam papéis funcionais específicos para neurônios hipotalâmicos GABAérgicos que projetam para a VTA (JENNINGS et al., 2015; NIEH et al., 2015). Assim, a ativação optogenética desses neurônios induz comportamentos apetitivos enquanto lesões genéticas dos mesmos revertam esse quadro (JENNINGS et al., 2015). Esses achados claramente sublinham a enorme importância funcional de projeções hipotalâmicas GABAérgicas para a VTA. Eles também tornam imperativo estudos semelhantes visando as aferências hipotalâmicas GABAérgicas do DR e RMTg. Confirmando nossos achados anatômicos, em um estudo recente usando traçadores virais, foi mostrado que o DR recebe assim entradas hipotalâmicas glutamatérgicas como também proeminentes entradas GABAérgicas. Ademais, no DR esses dois tipos de entradas são direcionados numa proporção muito semelhante para neurônios serotoninérgicos e GABAérgicos (WEISSBOURD et al., 2014).

No caso do DR, nós somente podemos especular sobre o fenótipo dos neurônios alvos das projeções hipotalâmicas glutamatérgicas ou GABAérgicas mostrados no presente estudo. Porém, o fato que nossas injeções no DR foram sempre centradas perto da linha média, indica que os neurônios alvos são na primeira linha neurônios com um fenótipo serotonérgico, glutamatérgico ou serotonérgico/glutamatérgico misto. Podemos assumir isso pelo fato de que neurônios com esses três fenótipos são enriquecidos perto da linha média (HIOKI et al., 2010; SEGO et al., 2014). Em contraste, a grande maioria dos neurônios GABAérgicos do DR é encontrada nas asas laterais (DAY et al., 2004; SHIKANAI et al., 2012; ver também parágrafo 1.3.4) que não foram afetadas pelas nossas injeções. De forma importante, essa enorme diversidade com respeito à neuroquímica dos possíveis neurônios alvos no DR, ainda aumenta o grau da heterogeneidade morfológica, neuroquímica e funcional das entradas hipotalâmicas para o DR.

Considerando o RMTg, ainda não existem estudos prévios sobre entradas hipotalâmicas especificamente GABAérgicas ou glutamatérgicas. Em geral, os resultados de nosso estudo, assim como dados da literatura (KAUFLING et al., 2009), indicam que o RMTg recebe entradas das mesmas regiões hipotalâmicas como a VTA (GEISLER; ZAHM, 2005) porém, em quantidade reduzida. Em concordância, com os resultados de um estudo de GEISLER e colaboradores (2007) investigando as aferências glutamatérgicas para a VTA, encontramos muitos neurônios glutamatérgicos projetando para o RMTg em regiões como o DMD e PLH. De forma importante, o que foi escrito sobre a diversidade dos possíveis neurônios alvos das projeções hipotalâmicas para o DR, não vale da mesma forma para o RMTg. Contrastando com os muitos neurotransmissores presentes no DR, o RMTg contém quase exclusivamente neurônios GABAérgicos (PERROTTI et al., 2005; SEGO et al., 2014). Isso significa que as respectivas entradas hipotalâmicas glutamatérgicas ou GABAérgicas descrito no presente estudo devem exercer um efeito oposto e relativamente previsível sobre os neurônios GABAérgicos do RMTg.

6 CONCLUSÕES

Nossa análise de casos com injeção simples de traçador retrógrado na VTA, DR ou RMTg mostra que essas três regiões recebem um padrão bastante semelhante de entradas hipotalâmicas com destaque para as diferentes partes da área pré-óptica e da área hipotalâmica lateral.

Porém, a marcação hipotalâmica encontrada seguida de injeções na VTA, DR e o RMTg não é necessariamente restrita aos distintos núcleos, mas é muitas vezes formada por bandas alongadas contínuas de neurônios retrogradamente marcados, atravessando o hipotálamo em direção rostral-caudal e medial-lateral.

As aferências hipotalâmicas para a VTA parecem mais substanciais que aquelas para o DR e particularmente para o RMTg.

Nossos achados em casos que receberam simultaneamente injeções de dois traçadores retrógrados mostram que a maioria das aferências hipotalâmicas é direcionada para somente um alvo. Porém, uma minoria dos neurônios hipotalâmicos emite colaterais axônicos para mais que um alvo. Esse achado implica que o hipotálamo é envolvido em circuitos separados e interconectados com a VTA, o DR e o RMTg, permitindo modular essas estruturas de forma independente ou também em conjunto.

Nossos experimentos de hibridização *in situ* com ^{35}S combinado com rastreamento retrógrado mostram que a VTA, o DR e o RMTg recebem assim entradas hipotalâmicas glutamatérgicas, como também robustas entradas GABAérgicas.

Em conjunto, nossos achados indicam que entradas de distintas regiões hipotalâmicas são importantes fontes de sinais homeostáticos para estruturas mesencefálicas e mesopontinas envolvidas em mecanismos de recompensa e aversão. As entradas hipotalâmicas demonstradas aqui exibem um altíssimo grau de complexidade, permitindo excitar ou inibir a VTA, o DR e o RMTg de forma independente ou em conjunto.

Figura 1 - Fotomicrografias de locais de injeção de CTb na VTA, DR e RMTg, assim como detalhes da marcação retrógrada no hipotálamo.

Legenda: A–I Fotomicrografias de locais de injeção de FluoroGold (FG) ou toxina colérica, subunidade b (CTb) na área tegmental ventral (VTA; A–C), núcleo dorsal da rafe (DR; D–F) e no núcleo tegmental rostromedial (RMTg; G–I). J, K Detalhes da marcação retrógrada na parte perifornical do hipotálamo lateral (PeFLH; J) e na área pré-óptica lateral (LPO; K). Note a morfologia característica da maioria dos neurônios retrogradamente marcados, exibindo dendritos, grossos, longos e pouco ramificados. Para outras abreviações, ver a lista. Escala das barras: A–I = 200 µm; J = 50 µm; K = 20 µm.

Figura 2 –Desenhos esquemáticos de neurônios retrogradamente marcados no hipotálamo rostral resultantes de injeções na VTA, DR e RMTg.

Legenda: A-D'' Desenhos esquemáticos de neurônios retrogradamente marcados no hipotálamo rostral (cortes coronais apresentados em sequência rostrocaudal) resultantes de injeções de traçadores retrógrados na VTA (A-C), DR (A'-C') e RMTg (A''-C''), respectivamente. Cada ponto preto representa um neurônio retrogradamente marcado. Para abreviações, ver a lista.

Figura 2 –Desenhos esquemáticos de neurônios retrogradamente marcados continuação no hipotálamo caudal resultantes de injeções na VTA, DR e RMTg.

Legenda:D-G'' Desenhos esquemáticos de neurônios retrogradamente marcados no hipotálamo caudal resultantes de injeções de traçadores retrógrados naVTA (**D-G**), DR (**D'-G'**) e RMTg (**D''-G''**), respectivamente. Para abreviações, ver a lista.

Figura 3 - Fotomicrografias da marcação retrógrada em um nível central da área pré-óptica.

Legenda: **A-C** Fotomicrografias da marcação retrógrada resultante de injeções de traçador retrógrado na VTA (**A**), RMTg (**B**), e DR (**C**) respectivamente. **D** Um corte corado pela técnica de Nissl em um nível central da área pré-óptica. Para abreviações, ver a lista. Escala das barras: **A-D** = 200 μ m.

Figura 4 - Fotomicrografias da marcação retrógrada em um nível caudal da área pré-óptica.

Legenda: A-C Fotomicrografias da marcação retrógrada resultante de injeções de traçador retrógrado na VTA (A), RMTg (B), e DR (C) respectivamente. Note em A o número reduzido de neurônios retrógradamente marcados no MPO comparado com C. D Um corte corado pela técnica de Nissl em um nível caudal da área pré-óptica. Para abreviações, ver a lista. Escala das barras: A-D = 200 μ m.

Figura 5 - Fotomicrografias da marcação retrógrada em diferentes níveis hipotalâmicos.

Legenda: **A-G** Fotomicrografias da marcação retrógrada em diferentes níveis hipotalâmicos resultante de injeções de traçador retrógrado na VTA (**A, B, E**), DR (**C, F**) e RMTg (**D, G**), respectivamente. Note em **A** uma marcação muito robusta nas diferentes regiões do LH. Note em **B-D** a presença de neurônios retrogradamente marcados que se estenderam em forma característica de arco do núcleo paraventricular (Pa) até a parte peduncular do hipotálamo lateral (PLH). Finalmente, note em **E-G** um proeminente agregado de neurônios retrogradamente marcados nas regiões caudais do PLH. Para outras abreviações, ver a lista. Escala das barras: **A** = 250 µm; **B-D** = 200 µm; **E-G** = 100 µm.

Figura 6 - Fotomicrografias de locais de injeção em animais que receberam injeções simultâneas de dois traçadores retrógrados.

Legenda: **A-D** Fotomicrografias de locais de injeção em animais que receberam injeções simultâneas de dois traçadores retrógrados diferentes em dois alvos. **A, B** Par de injeções na VTA (**A**) e DR (**B**) em rato R97. **C, D** Par de injeções no DR (**C**) e RMTg(**D**)em rato RL21. O corte mostrado em D foi imunorreagidos pela técnica de duplo-imunofluorescência para CTb e somatostatina (Som). Note que a injeção é bem centrada no RMTg que pode ser delineado pela sua robusta marcação para Som. Para outras abreviações, ver a lista. Escala das barras: **A-D** = 200 μ m.

Figura 7 - Fotomicrografias ilustrando marcação de dupla-imunofluorescência em um nível central da área pré-óptica.

Legenda: **A, B** Fotomicrografias da marcação retrógrado de dupla-imunofluorescência em um nível central da área pré-óptica em rato R64. Esse caso recebeu uma injeção de FG (fluorescência verde) no DR (ver Fig. 1E) junto com uma injeção de CTb (fluorescência vermelha) no RMTg (ver Fig. 1H). Exemplos de neurônios duplamente marcados são indicados por setas. O asterisco marca o mesmo sítio nas fotografias de baixa e alta amplificação. Para abreviações, ver a lista. Escala das barras: **A** = 200 μ m; **B** = 100 μ m; 20 μ m na **imagem inserida**.

Figura 8 - Fotomicrografias ilustrando marcação de dupla-imunofluorescência em um nível central do hipotálamo lateral.

Legenda: **A, B** Fotomicrografias da marcação retrógrado de dupla-imunofluorescência em um nível central do hipotálamo lateral em rato R64. Esse caso recebeu uma injeção de FG (fluorescência verde) no DR (ver Fig. 1E) junto com uma injeção de CTb (fluorescência vermelha) no RMTg (ver Fig. 1H). Exemplos de neurônios duplamente marcados são indicados por setas. O asterisco marca o mesmo sítio nas fotografias de baixa e alta amplificação. Para abreviações, ver a lista. Escala das barras: **A** = 200 μ m; **B** = 100 μ m; 20 μ m na **imagem inserida**.

Figura 9 - Fotomicrografias ilustrando marcação de dupla-imunofluorescência ao nível do núcleo pré-óptico medial (MPO).

Legenda: **A, B** Fotomicrografias da marcação retrógrado de dupla-imunofluorescência em um nível central da área pré-óptica em rato R97. Esse caso recebeu uma injeção de FG (fluorescência verde) na VTA (ver Fig. 6A) junto com uma injeção de CTb (fluorescência vermelha) no DRD (ver Fig. 6B). Exemplos de neurônios duplamente marcados são indicados por setas. Note que a maioria dos neurônios duplamente marcados é encontrada no MPO. O asterisco marca o mesmo sítio nas fotografias de baixa e alta amplificação. Para abreviações, ver a lista. Escala das barras: **A** = 200 μ m; **B** = 100 μ m; 20 μ m na **imagem inserida**.

Figura 10 - Fotomicrografias ilustrando marcação de dupla-imunofluorescência ao nível da área pré-óptica.

Legenda: **A, B** Fotomicrografias da marcação retrógrado de dupla-imunofluorescência em um nível central da área pré-óptica em rato RL21. Esse caso recebeu uma injeção de FluoroGold (FG; fluorescência verde) na VTA (ver Fig. 6C) junto com uma injeção de toxina colérica, subunidade b (CTb; fluorescência vermelha) centrada no RMTg (ver Fig. 6D). Exemplos de neurônios duplamente marcados são indicados por setas. Note que a maioria dos neurônios duplamente marcados é encontrada na LPO. O asterisco marca o mesmo sítio nas fotografias de baixa e alta amplificação. Para abreviações, ver a lista. Escala das barras: **A** = 200 μ m; **B** = 100 μ m; 20 μ m na **imagem inserida**.

Figura 11—Fotomicrografias da hibridização *in situ* para GAD67kDA combinado com imunistoquímica para CTb no hipotálamo.

Legenda: A-F Fotomicrografias da marcação para CTb (imunoprecipitado/marrom) e GAD67kDA mRNA (partículas de prata/preto) em seis cortes coronais do hipotálamo apresentados em sequência rostrocaudal. A marcação de CTb é resultante de uma injeção no RMTg no caso RL21 (ver, Fig. 6D). A marcação de GAD67kDA é resultante de hibridização *in situ* com sonda radiomarcada com ³⁵S. A especificidade da sonda é indicada pela forte marcação no núcleo reticular do tálamo (RT; imagem inserida em C). Note a distribuição diferenciada do GAD67 em diferentes regiões do hipotálamo. Note também os altos números de neurônios duplamente marcados (indicados pela acumulação de partículas de prata) na LPO e no PLH (imagens inseridas em A e D respectivamente). O asterisco marca o mesmo sítio nas fotografias de baixa e alta amplificação. Para abreviações, ver a lista. Escala das barras: A-F = 500 µm; Imagens inseridas: 20 µm em A, D e 200 µm em C.

Figura 12 - Fotomicrografias da hibridização *in situ* para GAD67kDA combinado com imunistoquímica para CTb no hipotálamo.

Legenda: A-F Fotomicrografias da marcação para CTb (imunoprecipitado/marrom) e GAD67kDA mRNA (partículas de prata/preto) em seis cortes coronais do hipotálamo apresentados em sequência rostrocaudal. A marcação de CTb é resultante de uma injeção no DRno caso RL23. Note os altos números de neurônios duplamente marcados (indicados pela acumulação de partículas de prata) no MPO e no PLH (imagens inseridas em A e D respectivamente). Note também que no MPO, neurônios duplamente marcados (indicado por setas) são encontrados lado a lado com neurônios simples marcados (indicado por ponta de seta). O asterisco marca o mesmo sítio nas fotografias de baixa e alta amplificação. Para abreviações, ver a lista. Escala das barras: A-F = 500 μ m; Imagens inseridas em A, D = 20 μ m.

Figura 13 - Fotomicrografias da hibridização *in situ* para VGLUT2 combinado com imunistoquímica para CTb no hipotálamo.

Legenda: A-C Fotomicrografias da marcação para CTb (imunoprecipitado/marrom) e VGLUT2 mRNA (partículas de prata/preto) no hipotálamo apresentados em sequência rostrocaudal. A marcação de CTb é resultante de uma injeção no RMTg (caso RL21, ver, Fig. 6D). Note a marcação fraca assim como a distribuição pouco diferenciada de VGLUT2 em diferentes regiões do hipotálamo. Note também os altos números de neurônios duplamente marcados (indicados pela acumulação de partículas de prata, setas), encontrados lado a lado com neurônios simples marcados (indicado por ponta de seta), na região do DMD (B). O asterisco marca o mesmo sítio nas fotografias de baixa e alta amplificação. Para abreviações, ver a lista. Note na fotomicrografia de campo escuro em C a marcação elevada para VGLUT2 em núcleos do tálamo (Re, VM,) comparado à marcação mais fraca no hipotálamo (Pa). Escala das barras: A = 200 µm; B = 20 µm; C = 100 µm.

REFERÊNCIAS*

- ABRAMS, J. K.; JOHNSON, P. L.; HOLLIS, J. H.; LOWRY, C. A. Anatomic and Functional Topography of the Dorsal Raphe Nucleus. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1018, p. 46-57, 2004.
- ANAND, B. K.; BROBECK, JR. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. **Yale. J. Biol. Med.**, v. 24, p. 123-140, 1951a.
- ANAND, B. K.; BROBECK, JR. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 77, p. 323-324, 1951b.
- ARAKI, M.; MCGEER, P. L.; KIMURA, H. The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method. **Brain Res.**, v. 441, p. 319-330, 1988.
- ATASOY, D.; BETLEY, J. N.; SU, H. H.; STERNSON, S. M. Deconstruction of a neural circuit for hunger. **Nature**, v. 488, p. 172-177, 2012.
- ASTON-JONES, G.; SMITH, R. J.; SARTOR, G. C.; MOORMAN, D. E.; MASSI, L.; TAHSILI-FAHADAN, P.; RICHARDSON, K. A. Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. **Brain Res.**, v. 1314, p. 74-90, 2010.
- BAKER, K. G.; HALLIDAY, G. M.; TÖRK, I. Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v. 301, p. 147-161, 1990.
- BALCITA-PEDICINO, J. J.; OMELCHENKO, N. BELL R.; SESACK S. R. The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: Ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v. 519, p. 1143-1164, 2011.
- BALCITA-PEDICINO, J. J.; SESACK, S. R. Orexin axons in the rat ventral tegmental area synapse infrequently onto dopamine and gamma-aminobutyric acid neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 503, p. 668-684, 2007.
- BANG, S. J.; JENSEN, P.; DYMECKI, S. M.; COMMONS, K. G. Projections and interconnections of genetically defined serotonin neurons in mice. **Eur. J. Neurosci.**, v. 35, p. 85-96, 2012.
- BARROT, M.; SESACK, S. R.; GEORGES, F.; PISTIS, M.; HONG, S.; JHOU, T. C. Braking dopamine systems: a new GABA master structure for mesolimbic and nigrostriatal functions. **J. Neurosci.**, v. 32, p. 14094-14101, 2012.
- BECKSTEAD, R. M.; DOMESICK, V. B.; NAUTA, W. J. H. Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. **Brain Res.**, v. 175, p. 191-217, 1979.

*De acordo com:

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

BERNARD, R.; VEH, R. W. Individual neurons in the rat lateral habenular complex project mostly to the dopaminergic ventral tegmental area or to the serotonergic raphe nuclei. **J. Comp. Neurol.**, v. 520, p. 2545-2558, 2012.

BERNARDIS, L. L.; BELLINGER, L. L. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. **Neurosci. Biobehav.**, Rev. v. 20, p. 189-287, 1996.

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

BERTHOUD, H. R.; MÜNZBERG, H. The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics. **Physiol. Behav.**, v. 104, p. 29-39, 2011.

BJÖRKLUND, A.; DUNNETT, S. B. Fifty years of dopamine research. **Trends Neurosci.**, v. 30, p. 185-187, 2007.

BJÖRKLUND, A.; LINDVALL, O. Dopamine-containing systems in the CNS. In: BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T. (Ed.). **Handbook of Chemical Neuroanatomy**. Amsterdam: Elsevier Science Publisher. 1984. Cap. 3, p. 55-122.

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

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

BOURDY, R.; BARROT, M. A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail. **Trends Neurosci.**, v. 35, p. 681-690, 2012.

BRINSCHWITZ, K.; DITTGEN, A.; MADAI, V.I.; LOMMEL, R.; GEISLER, S.; VEH, R.W. Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. **Neuroscience**, v. 168, p. 463-476, 2010.

BROBECK, JR. Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. **Physiol. Rev.**, v. 26, p. 541-559, 1946.

BROMBERG-MARTIN, E.S.; MATSUMOTO, M.; HIKOSAKA, O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. **Neuron**, v. 68, p. 815-834, 2010.

CALIZO, L. H.; AKANWA, A.; MA, X.; PAN, Y. Z.; LEMOS, J. C.; CRAIGE, C.; HEEMSTRA, L. A.; BECK, S. G. Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. **Neuropharmacology**, v. 61, p. 524-543, 2011.

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

CASSELL, M. D.; CHITTICK, C. A.; SIEGEL, M. A.; WRIGHT, D. J. Collateralization of the amygdaloid projections of the rat prelimbic and infralimbic cortices. **J. Comp. Neurol.**, v. 279, p. 235-248, 1989.

CELADA, P.; CASANOVAS, J. M.; PAEZ, X.; ARTIGAS, F. Control of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus by the lateral hypothalamus. **Brain Res.**, v. 932, p. 79-90, 2002.

CHALLIS, C.; BOULDEN, J.; VEERAKUMAR, A.; ESPALLERGUES, J.; VASSOLER, F. M.; PIERCE, R. C.; BECK, S. G.; BERTON, O. Raphe GABAergic neurons mediate the acquisition of avoidance after social defeat. **J. Neurosci.**, v. 33, p. 13978-13988, 2013.

CHRISTOPH, G. R.; LEONZIO, R. J.; WILCOX, K. S. Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. **J. Neurosci.**, v. 6, p. 613-619, 1986.

CIRIELLO, J.; MCMURRAY, J. C.; BABIC, T.; DE OLIVEIRA, C. V. Collateral axonal projections from hypothalamic hypocretin neurons to cardiovascular sites in nucleus ambiguus and nucleus tractus solitarius. **Brain Res.**, v. 991, p. 133-141, 2003.

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

CRAWFORD, L. K.; CRAIGE, C. P.; BECK, S. G. Glutamatergic input is selectively increased in dorsal raphe subfield 5-HT neurons: role of morphology, topography and selective innervation. **Eur. J. Neurosci.**, v. 34, p. 1794-1806, 2011.

CRAWFORD, L. K.; RAHMAN, S. F.; BECK, S. G. Social stress alters inhibitory synaptic input to distinct subpopulations of raphe serotonin neurons. **ACS. Chem. Neurosci.**, v. 4, p. 200-209, 2013.

DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiol. Scand.**, v. 62, p. 1-55, 1964. Supplement 232.

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

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

DÍAZ-CABIALE, Z.; PARRADO, C.; NARVÁEZ, M.; PUIGCERVER, A.; MILLÓN, C.; SANTÍN, L.; FUXE, K.; NARVÁEZ, J. A. Galanin receptor/Neuropeptide Y receptor interactions in the dorsal raphe nucleus of the rat. **Neuropharmacology**, v. 61. P. 80-86, 2011.

DONATO, J. JR.; FRAZÃO, R.; FUKUDA, M.; VIANNA, C. R.; ELIAS, C. F. Leptin induces phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase in defined hypothalamic neurons. **Endocrinology**, v. 151, p. 5415-5427, 2010.

DOUGALIS, A. G.; MATTHEWS, G. A.; BISHOP, M. W.; BRISCHOUX, F.; KOBAYASHI K.; UNGLESS, M. A. Functional properties of dopamine neurons and co-expression of vasoactive intestinal polypeptide in the dorsal raphe nucleus and ventro-lateral periaqueductal grey. **Eur. J. Neurosci.**, v. 36, p. 3322-3332, 2012.

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

ELIAS, C. F.; LEE, C. E.; KELLY, J. F.; AHIMA, R. S.; KUCHAR, M.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. **J Comp Neurol.**, v. 432, p. 1-19, 2001.

FADEL, J.; DEUTCH, A. Y. Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. **Neuroscience**, v. 111, p. 37-87, 2002.

FALLON, J. H.; MOORE, R. Y. Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. **J. Comp. Neurol.**, v. 180, p. 545-580, 1978.

FERREIRA, J. G. P.; DEL-FAVA, F; HASUE, R. H.; SHAMMAH-LAGNADO, S. J. Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. **Neuroscience**, v. 153, p. 196-213, 2008.

FIGLEWICZ, D.P. Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 284, p. R882-892, 2003.

FU, W.; LE MAITRE, E.; FABRE, V.; BERNARD, J. F.; DAVID, XU. Z. Q.; HOKFELT, T. Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 518, p. 3464-3494, 2010.

GABBOTT, P. L.; WARNER, T. A.; JAYS, P. R.; SALWAY, P.; BUSBY, S. J. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. **J. Comp. Neurol.**, v. 492, p. 145-177, 2005.

GEISLER, S.; DERST, C.; VEH, R.W.; ZAHM, D.S. Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. **J. Neurosci.**, v.27, p.5730-5743, 2007.

GEISLER, S.; MARINELLI, M.; DEGARMO, B.; BECKER, M. L.; FREIMAN, A. J.; BEALES, M. MEREDITH, G. E.; ZAHM, D. S. Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 2688-2700, 2008.

GEISLER, S.; ZAHM, D. S. Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. **J. Comp. Neurol.**, v. 490, p. 270-294, 2005.

GEISLER, S.; ZAHM, D. S. Neurotensin afferents of the ventral tegmental area in the rat: [1] re-examination of their origins and [2] responses to acute psychostimulant and antipsychotic drug administration. **Eur. J. Neurosci.**, v. 24, p. 116-134, 2006.

GEISLER, S.; WISE, R. A. Functional implications of glutamatergic projections to the ventral tegmental area. **Rev. Neurosci.**, v. 19, p. 227-244, 2008.

GERVASONI, D.; PEYRON, C.; RAMPON, C.; BARBAGLI, B.; CHOUVET, G.; URBAIN, N.; FORT, P.; LUPPI, P. H. Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 4217-4225, 2000.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. The "psychic" neuron of the cerebral cortex. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 868, p. 13-26, 1999.

GOLDMAN-RAKIC, P. S.; CASTNER, S. A.; SVENSSON, T. H.; SIEVER, L. J.; WILLIAMS, G. V. Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. **Psychopharmacology**, v. 174, p. 3-16, 2004.

GONÇALVES, L.; NOGUEIRA, M. I.; SHAMMAH-LAGNADO, S. J.; METZGER, M. Prefrontal afferents to the dorsal raphe nucleus in the rat. **Brain Res. Bull.**, v. 78, p. 240-247, 2009.

GONÇALVES, L.; SEGO, T.; METZGER, M. Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial tegmental nucleus and ventral tegmental area in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 520, p. 1278-1300, 2012.

GONZÁLEZ, J.A.; JENSEN, L.T.; FUGGER, L.; BURDAKOV, D. Convergent inputs from electrically and topographically distinct orexin cells to locus coeruleus and ventral tegmental area. **Eur. J. Neurosci.**, p. 1-7, 2012.

GONZALEZ-MAESO, J.; SEALFON, S. C. Psychedelics and schizophrenia. **Trends Neurosci.**, v. 32, p. 225-232, 2009.

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, p. 220-227, 2007.

GREENWELL, T. N.; ZANGEN, A.; MARTIN-SCHILD, S.; WISE, R. A.; ZADINA, J. E. Endomorphin-1 and -2 immunoreactive cells in the hypothalamus are labeled by fluoro-gold injections to the ventral tegmental area. **J. Comp. Neurol.**, v. 454, p. 320-328, 2002.

HALE, M. W.; LOWRY, C. A. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. **Psychopharmacology**, v. 213, p. 243-264, 2011.

HALE, M. W.; SHEKHAR, A.; LOWRY, C. A. Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 32, 695-708, 2012.

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

HASUE, R. H.; SHAMMAH-LAGNADO, S. J. Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 454, p. 15-33, 2002.

HERKENHAM, M.; NAUTA, W. J. Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 187 p. 19-47, 1979.

HERZOG, E.; GILCHRIST, J.; GRAS, C.; MUZERELLE, A.; RAVASSARD, P.; GIROS, B.; GASPARD, P.; EL MESTIKAWY S. Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. **Neuroscience**, v. 123, p. 983-1002, 2004.

HETTES, S. R.; GONZAGA, W. J.; HEYMING, T. W.; NGUYEN, J. K.; PEREZ, S.; STANLEY, B. G. Stimulation of lateral hypothalamic AMPA receptors may induce feeding in rats. **Brain Research**, v. 1346, p. 112 – 120, 2010.

HIKOSAKA, O. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 11, p. 503-513, 2010.

HIOKI, H.; NAKAMURA, H.; MA, Y. F.; KONNO, M.; HAYAKAWA, T.; NAKAMURA, K. C.; FUJIYAMA, F.; KANEKO, T. Vesicular glutamate transporter 3-expressing nonserotonergic projection neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei. **J. Comp. Neurol.**, v. 518, p. 668-686, 2010.

HOEBEL, B. G.; TEITELBAUM, P. Hypothalamic control of feeding and self-stimulation. **Science**, v. 135, p. 375-377, 1962.

HÖKFELT, T.; JOHANSSON, O.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M.; PARK, D. Immunohistochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron systems in the rat brain. I. Tyrosine hydroxylase in the mes- and diencephalon. **Med. Biol.**, v. 54, p. 427-53, 1976.

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. 1984. p. 277–379.

HOMMEL, J. D.; TRINKO, R.; SEARS, R. M.; GEORGESCU, D.; LIU, Z. W.; GAO, X. B.; THURMON, J. J.; MARINELLI, M.; DILEONE, R. J. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. **Neuron**, v. 51, p. 801-810, 2006.

HONG, S.; JHOU, T. C.; SMITH, M.; SALEEM, K. S.; HIKOSAKA, O. Negative reward signals from the lateral habenula to dopamine neurons are mediated by rostromedial tegmental nucleus in primates. **J. Neurosci.**, v. 31, p. 11457-11471, 2011.

HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 71, p. 533-554, 2002.

HURLEY, S. W.; JOHNSON, A. K. The role of the lateral hypothalamus and orexin in ingestive behavior: a model for the translation of past experience and sensed deficits into motivated behaviors. **Front. Syst. Neurosci.**, v. 8, p. article. 216, 2014.

IKEMOTO, S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. **Neurosci. Biobehav.**, Rev. v. 35, p. 129-150, 2010.

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

IKEMOTO, S.; QIN, M.; LIU, Z. H. Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area. **J. Neurosci.**, V. 26, p. 723–730, 2006.

IKEMOTO, S.; WISE, R. A. Mapping of chemical trigger zones for reward. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 190–201, 2004.

IMAI, H.; STEINDLER, D. A.; KITAI, S. T. The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 243, p. 363-380, 1986.

INABA, K.; MIZUHIKI, T.; SETOGAWA, T.; TODA, K.; RICHMOND, B. J.; SHIDARA, M. Neurons in monkey dorsal raphe nucleus code beginning and progress of step-by-step schedule, reward expectation, and amount of reward outcome in the reward schedule task. **J. Neurosci.**, v. 33, p. 3477-91, 2013.

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, p. 341-346, 1979.

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

JAYARAMAN, A.; NISHIMORI, T.; DOBNER, P.; UHL, G. R. Colecystokinin and neurotensin mRNAs are differentially expressed in subnuclei of the ventral tegmental area. **J. Comp. Neurol.**, v. 296, p. 291-302, 1990.

JENNINGS, J. H.; UNG, R. L.; RESENDEZ, S. L.; STAMATAKIS, A. M.; TAYLOR, J. G.; HUANG, J.; VELETA, K.; KANTAK, P. A.; AITA, M.; SHILLING-SCRIVO, K.; RAMAKRISHNAN, C.; DEISSEROTH, K.; OTTE, S.; STUBER, G. D. Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. **Cell**, v. 160, p. 516-527, 2015.

JHOU, T. Neural mechanisms of freezing and passive aversive behaviors. **Comp. Neurol.**, v. 493, p. 111-114, 2005.

JHOU, T.; FIELDS, H.; BAXTER, M.; SAPER, C.; HOLLAND, P. The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to Midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. **Neuron**, v. 61, p. 786-800, 2009a.

JHOU, T.; GEISLER, S.; MARINELLI, M.; DEGARMO, B.; ZAHM, D. The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: a structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. **J. Comp. Neurol.**, v. 513 p. 566-596, 2009b.

JHOU, T. C.; XU, S. P.; LEE, M. R.; GALLEN, C. L.; IKEMOTO, S. Mapping of reinforcing and analgesic effects of the mu opioid agonist endomorphin-1 in the ventral midbrain of the rat. **Psychopharmacology**, v. 224, p. 303-312, 2012.

JI, H.; SHEPARD, P. D. Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. **J. Neurosci.**, v. 27, p. 6923-6930, 2007.

KANEMARU, H.; NAKAMURA, H.; ISAYAMA, H.; KAWABUCHI, M.; TASHIRO, N. Efferent connections of the anterior hypothalamic nucleus: a biocytin study in the cat. **Brain Res. Bull.**, v. 51, p. 219-232, 2000.

KARNANI, M. M.; APERGIS-SCHOUTE, J.; ADAMANTIDIS, A.; JENSEN, L. T.; DE LECEA, L.; FUGGER, L.; BURDAKOV, D. Activation of central orexin/hypocretin neurons by dietary amino acids. **Neuron**, v. 72, p. 616-629, 2011.

KAUFLING, J.; VEINANTE, P.; PAWLOWSKI, S. A.; FREUND-MERCIER, M.; BARROT, M. Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the Rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 513, p. 597-621, 2009.

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.; BALDO, B. A.; PRATT, W. E.; WILL, M. J. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. **Physiol. Behav.**, v. 86, p. 773-795, 2005.

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

KEMPADOO, K. A.; TOURINO, C.; CHO, S. L.; MAGNANI, F.; LEINNINGER, G. M.; STUBER, G. D.; ZHANG, F.; MYERS, M. G.; DEISSEROTH, K.; DE LECEA, L.; BONCI, A. Hypothalamic neurotensin projections promote reward by enhancing glutamate transmission in the VTA. **J. Neurosci.** v. 33, p. 7618-7626. 2013

KIM, U. Topographic commissural and descending projections of the habenula in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 513, p. 173-187, 2009.

KIPPIN, T. E.; SOTIROPOULOS, V.; BADIH, J.; PFAUS, J. G. Opposing roles of the nucleus accumbens and anterior lateral hypothalamic area in the control of sexual behaviour in the male rat. **Eur. J. Neurosci.**, v. 19, p. 698-704, 2004.

KIROUAC, G. J.; LI, S.; MABROUK, G. GABAergic projection from the ventral tegmental area and substantia nigra to the periaqueductal gray region and the dorsal raphe nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v. 469, p. 170-184, 2004.

KLEJBOR, I.; DOMARADZKA-PYTEL, B.; LUDKIEWICZ, B.; WÓJCIK, S.; MORYS, J. The relationships between neurons containing dopamine and nitric oxide synthase in the ventral tegmental area. **Folia. Histochem. Cytobiol.**, v. 42, p. 83-87, 2004.

KOWSKI, A. B.; GEISLER, S.; KRAUSS, M.; VEH, R. W. Differential projections from subfields in the lateral preoptic area to the lateral habenular complex of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 507, p. 1465-1478, 2008.

KRANZ, G. S.; KASPER, S.; LANZENBERGER, R. Reward and the serotonergic system. **Neuroscience**, v. 166, p. 1023-1035, 2010.

LACOSTE, B.; RIAD, M.; RATTÉ, M. O.; BOYE, S. M.; LÉVESQUE, D.; DESCARRIES L. LAVEZZI, H. N.; ZAHM, D. S. The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: an integrative modulator of the reward system. **Basal Ganglia**, v. 1, p. 191-200, 2009.

LAMMEL, S.; HETZEL, A.; HÄCKEL, O.; JONES, I.; LISS, B.; ROEPER, J. Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. **Neuron**, v. 57, p. 760-773, 2008.

LAMMEL, S.; LIM, B. K.; MALENKA, R. C. Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 351-359 2013.

LAMMEL, S.; LIM, B. K.; RAN, C.; HUANG, K. W.; BETLEY, M. J.; TYE, K. M.; DEISSEROTH, K.; MALENKA, R. C. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. **Nature**, v. 491, p. 212-217, 2012.

LEINNINGER, G. M.; JO, Y. H.; LESHAN, R. L.; LOUIS, G. W.; YANG, H.; BARRERA, J. G.; WILSON, H.; OPLAND, D. M.; FAOUZI, M. A.; GONG, Y.; JONES, J. C.; RHODES, C. J.; CHUA, S. JR.; DIANO, S.; HORVATH, T. L.; SEELEY, R. J.; BECKER, J. B.; MÜNZBERG, H.; MYERS, M. G. JR. Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. **Cell Metab.**, v. 10, p. 89-98, 2009.

LAVEZZI, H. N.; ZAHM, D. S. The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: an integrative modulator of the reward system. **Basal Ganglia**, v. 1, p. 191-200, 2011.

LECCA, S.; MELIS, M.; LUCHICCHI, A.; ENNAS, M. G.; CASTELLI, M. P.; MUNTONI, A. L.; PISTIS, M. Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p. 589-602, 2011.

LECCA, S.; MELIS, M.; LUCHICCHI, A.; MUNTONI, A. L.; PISTIS, M. Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, p. 1164-76, 2012.

LEE, H. S.; EUM, Y. J.; JO, S. M.; WATERHOUSE, B. D. Projection patterns from the amygdaloid nuclear complex to subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat. **Brain Res.**, v. 1143, p. 116-125, 2007.

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

LEE, H. S.; KIM, M. A.; WATERHOUSE, B. D. Retrograde double-labeling study of common afferent projections to the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 481, p. 179-193, 2005.

LEE, H. S.; PARK, S. H.; SONG, W. C.; WATERHOUSE, B. D. Retrograde study of hypocretin-1 (orexin-A) projections to subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat. **Brain Res.**, v. 1059, p. 35-45, 2005.

LEINNINGER, G. M. Lateral thinking about leptin: a review of leptin action via the lateral hypothalamus. **Physiol. Behav.**, v. 104, p. 572-581, 2011.

LI X, QI J, YAMAGUCHI T, WANG HL, MORALES M. Heterogeneous composition of dopamine neurons of the rat A10 region: molecular evidence for diverse signaling properties. **Brain. Struct. Funct.**, 2012.

LIMA, L. B.; SEGO, C.; GONÇALVES, L.; METZGER, M. Subnuclear origin and transmitter phenotype of dorsal raphe afferents to the ventral tegmental area in the rat. **Soc. Neurosci. Abstr.**, v. 38, p. 605-617, 2012.

LIU, Z. H.; IKEMOTO, S. The midbrain raphe nuclei mediate primary reinforcement via GABA(A) receptors. **Eur. J. Neurosci.**, v. 3, p. 735-743, 2007.

LOUGHLIN, S. E.; FALLON, J. H. Substantia nigra and ventral tegmental area projections to cortex: topography and collateralization. **Neuroscience**, v. 11, p. 425-435, 1984.

LOUIS, G. W.; LEINNINGER, G. M.; RHODES, C. J.; MYERS, M. G. JR. Direct innervation and modulation of orexin neurons by lateral hypothalamic LepRb neurons. **J. Neurosci.**, v. 30, p. 11278-11287, 2010.

LOWRY, C. A. Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **J. Neuroendocrinol**, v. 14, p. 911-923, 2002.

LOWRY, C. A.; HALE, M. W.; EVANS, A. K.; HEERKENS, J.; STAUB, D. R.; GASSER, P. J.; SHEKHAR, A. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. **Ann. NY. Acad. Sci.**, v. 1148, p. 86-94, 2008.

LUO, A. H.; ASTON-JONES, G. Circuit projection from suprachiasmatic nucleus to ventral tegmental area: a novel circadian output pathway. **Eur. J. Neurosci.**, v. 29, p. 748-760, 2009.

LUPPI, P. H.; ASTON-JONES, G.; AKAOKA, H.; CHOUVET, G.; JOUVET, M. Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **Neuroscience**, v.65, p.119-160, 1995.

LUPPI, P. H.; FORT, P.; JOUVET, M. Ionophoretic application of unconjugated cholera toxin B subunit (CTb) combined with immunohistochemistry of neurochemical substances: a method for transmitter identification of retrogradely labeled neurons. **Brain Res.**, v. 534, p. 209–224, 1990.

MAHLER, S. V.; ASTON-JONES, G. S. Fos activation of selective afferents to ventral tegmental area during cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. **J. Neurosci.**, v. 32, p. 13309-13326, 2012.

MARCUS, J. N.; ASCHKENASI, C. J.; LEE, C. E.; CHEMELLI, R. M.; SAPER, C. B.; YANAGISAWA, M.; ELMQUIST, J. K. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 435, p. 6-25, 2001.

MARGOLIS, E. B.; MITCHELL, J. M.; ISHIKAWA, J.; HJELMSTAD, G. O, FIELDS, H. L. Midbrain dopamine neurons: projection target determines action potential duration and dopamine D(2) receptor inhibition. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 8908-8913, 2008.

MARGOLIS, E. B.; TOY, B.; HIMMELS, P.; MORALES, M.; FIELDS, H. L. Identification of rat ventral tegmental area GABAergic neurons. **PLoS. One.**, v. 7, p.e42365, 2012.

MATSUMOTO, M.; HIKOSAKA, O. Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. **Nature**, v. 447, p. 1111-1115, 2007.

MATSUMOTO, M.; HIKOSAKA, O. Negative motivational control of saccadic eye movement by the lateral habenula. **Prog. Brain Res.**, v. 171, p. 399-402, 2008.

MCBRIDE, W. J.; MURPHY, J. M.; IKEMOTO, S. Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. **Behav. Brain Res.**, v. 101, p. 129-152, 1999.

MCRITCHIE, D. A.; HARDMAN, C. D.; HALLIDAY, G. M. Cytoarchitectural distribution of calcium binding proteins in midbrain dopaminergic regions of rats and humans. **J. Comp. Neurol.**, v. 364, p. 121-150, 1996.

MICHELSSEN, K. A.; SCHMITZ, C.; STEINBUSCH, H. W. The dorsal raphe nucleus- from silver stainings to a role in depression. **Brain Res., Rev.**, v. 55, p. 329-342, 2007.

MICHELSSEN, K. A.; PRICKAERTS, J.; STEINBUSCH, H. W. The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. **Prog. Brain Res.**, v. 172, p. 233-264, 2008.

MONTI, J. M. The role of dorsal raphe nucleus serotonergic and non-serotonergic neurons, and of their receptors, in regulating waking and rapid eye movement (REM) sleep. **Sleep. Med. Rev.**, v. 14, p. 319-327, 2010.

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.

MORTON, G. J.; MEEK, T. H.; SCHWARTZ, M. W. Neurobiology of food intake in health and disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 15, p. 367-378, 2014.

MYERS, M. G. JR.; OLSON, D. P. Central nervous system control of metabolism. **Nature**, v. 491, p. 357-363, 2012.

NAIR-ROBERTS, R. G.; CHATELAIN-BADIE, S. D.; BENSON, E.; WHITECOOPER, 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. **Neurosci.**, v. 152, p. 1024–1031, 2008.

NAKAMURA, K.; MATSUMOTO, M.; HIKOSAKA, O. Reward-dependent modulation of neuronal activity in the primate dorsal raphe nucleus. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 5331-5343, 2008.

NIEH, E. H.; MATTHEWS, G. A.; ALLSOP, S. A.; PRESBREY, K. N.; LEPPLA, C. A.; WICHMANN, R.; NEVE, R.; WILDES, C. P.; TYE, K. M. Decoding Neural Circuits that Control Compulsive Sucrose Seeking. **Cell**, v. 160, p. 528-541, 2015.

OADES, R. D.; HALLIDAY, G. M. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. **Brain Res. Rev.**, v. 12, p. 117–165, 1987.

OGAWA, S. K.; COHEN, J. Y.; HWANG, D.; UCHIDA, N.; WATABE-UCHIDA, M. Organization of monosynaptic inputs to the serotonin and dopamine neuromodulatory systems. **Cell Rep.**, v. 8, p. 1105-18, 2014.

OLDS, J.; MILNER, P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 47, p. 419-427, 1954.

OLSON, V. G.; NESTLER, E. J. Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. **Synapse**, v. 61, p. 87-95, 2007.

OLSON, V. G.; ZABETIAN, C. P.; BOLANOS, C. A.; EDWARDS, S.; BARROT, M.; EISCH, A. J.; HUGHES, T.; SELF, D. W.; NEVE, R. L.; NESTLER, E. J. Regulation of drug reward by camp response element- binding protein: evidence for two functionally distinct subregions of the ventral tegmental area. **J. Neurosc.**, v. 25, p. 5553–5562, 2005.

OMELCHENKO, N.; SESACK, S. R. Glutamate synaptic inputs to ventral tegmental area neurons in the rat derive primarily from subcortical sources. **Neuroscience**, v. 146, p. 1259-1274, 2007.

OMELCHENKO, N.; BELL, R.; SESACK, S. R. Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. **Eur. J. Neurosci.**, v. 30, p. 1239-1250, 2009.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, 4th ed. San Diego: Academic Press., 1998. 367 p.

PERROTI, L. I.; BOLANOS, C. A.; CHOI, K.; RUSSO, S. J.; EDWARDS, S.; ULERY, P. G.; WALLACE, D. L.; SELF, D. W.; NESTLER, E. J.; BARROT, M. DeltafosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. **Europ. J. Neurosc.**, v. 21, p. 2817-2824, 2005.

PERROTTI, L. I.; WEAVER, R. R.; ROBISON, B.; RENTHAL, W.; MAZE, I.; YAZDANI, S.; ELMORE, R. G.; KNAPP, D. J.; SELLEY, D. E.; MARTIN, B. R.; SIMSELLEY, L.; BACHTELL, R. K.; SELF, D. W.; NESTLER, E. J. Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. **Synapse**, v. 62, p. 358-369. 2008.

PATTERSON, C. M.; WONG, J. M.; LEINNINGER, G. M.; ALLISON, M. B.; MABROUK, O. S.; KASPER, C. L.; GONZALEZ, I. E.; MACKENZIE, A.; JONES, J. C.; KENNEDY, R. T.; MYERS, M. G. JR. Ventral tegmental area neurotensin signaling links the lateral hypothalamus to locomotor activity and striatal dopamine efflux in male mice. **Endocrinology**, 2015

PEYRON, C.; LUPPI, P. H.; FORT, P.; RAMPON, C.; JOUVET M. Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v. 364, p. 402-413, 1996.

PEYRON, C.; PETIT, J. M.; RAMPON, C.; JOUVET, M.; LUPPI, P. H. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. **Neuroscience**, v. 82, p. 443–468, 1998.

PEYRON, C.; TIGHE, D. K.; VAN DEN POL, A. N.; DE LECEA, L.; HELLER, H. C, SUTCLIFFE JG, KILDUFF TS. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 9996– 10015, 1998.

PHILIPSON, O. T. Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v.187, n. 1, p. 117-43, 1979c.

PHILLIPSON, O. T. A Golgi study of the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 187, p. 99–116, 1979b.

PHILLIPSON, O. T. The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of Tsai in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 187, p. 85–98, 1979a.

PHILPOT, K. B.; DALLVECHIA-ADAMS, S.; SMITH, Y.; KUCHAR, M. J. A cocaine- and-amphetamine-regulated-transcript peptide projection from the lateral hypothalamus to the ventral tegmental area. **Neuroscience**, v. 135, p. 915-25, 2005.

PINTO, A.; SESACK, S. R. Limited collateralization of neurons in the rat prefrontal cortex that project to the nucleus accumbens. **Neuroscience**, v. 97, p. 635-642, 2000.

POLLAK DOROCIC, I.; FÜRTH, D.; XUAN, Y.; JOHANSSON, Y.; POZZI, L.; SILBERBERG, G.; CARLÉN, M.; MELETIS, K. A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei. **Neuron**, v. 83, p. 663-678, 2014.

POLLER, W. C.; MADAI, V. I.; BERNARD, R.; LAUBE, G.; VEH, R. W. A glutamatergic projection from the lateral hypothalamus targets VTA-projecting neurons in the lateral habenula of the rat. **Brain Res.**, v. 1507, p. 45-60, 2013.

RAMÓN-MOLINER, E.; NAUTA, W.J. The isodendritic core of the brain stem. **J.Comp. Neurol.**, v.126, p.311-335, 1966.

RICHARDSON, K.A.; ASTON-JONES, G. Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons that project to ventral tegmental area are differentially activated with morphine preference. **J. Neurosci.**, v.32, p.3809-3817, 2012.

RINAMAN, L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. **Brain Research**, v. 1350, p. 18 – 34, 2010.

RODAROS, D.; CARUANA, D.A.; AMIR, S.; STEWART, J. Corticotropin-releasing factor projections from limbic forebrain and paraventricular nucleus of the hypothalamus to the region of the ventral tegmental area. **Neuroscience**, v.150, p.8-13, 2007.

RODD-HENRICKS, Z. A.; MCKINZIE, D. L.; CRILE, R. S.; MURPHY, J. M.; MCBRIDE, W. J. Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats. **Psychopharmacology**, v. 149, p. 217–224, 2000.

RODD-HENRICKS, Z. A.; MELENDEZ, R. I.; ZAFFARONI, A.; GOLDSTEIN, A.; MCBRIDE, W. J.; LI, T. K. The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. **Pharm. Bioch. Behavior**, v. 72, p. 55–64, 2002.

ROSIN, D. L.; WESTON, M. C.; SEVIGNY, C. P.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Hypothalamic orexin (hypocretin) neurons express vesicular glutamate transporters VGLUT1 or VGLUT2. **J. Comp. Neurol.**, v. 465, p. 593-603, 2003.

SAITO, Y. C.; TSUJINO, N.; HASEGAWA, E.; AKASHI, K.; ABE, M.; MIEDA, M.; SAKIMURA, K.; SAKURAI, T. GABAergic neurons in the preoptic area send direct inhibitory projections to orexin neurons. **Front. Neural Circuits**, v. 7, 2013.

SAKURAI T. The role of orexin in motivated behaviours. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 15, p. 719-731, 2014.

SAPER, C. B. Central Autonomic System. In **"The Rat Nervous System"** (Paxinos, G., Ed.), 3rd ed. Elsevier, San Diego, 2003. 1329p.

SAPER, C. B.; SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 183, p. 689-706, 1979.

SARTER, M.; MARKOWITSCH, H. J. Collateralization in the mammalian nervous system. **Int. J. Neurosci.**, v. 28, p. 215-234, 1985.

SCHEIBNER, T.; TÖRK, I. Ventromedial mesencephalic tegmental (VMT) projections to ten functionally different cortical areas in the cat: topography and quantitative analysis. **J. Comp. Neurol.**, v. 259, p. 247-265, 1987.

SCHÖNE, C.; BURDAKOV, D. Glutamate and GABA as rapid effectors of hypothalamic "peptidergic" neurons. **Front. Behav. Neurosci.**, v. 6, p. 81, 2012.

SCHULTZ, W. Behavioral dopamine signals. **Trends Neurosci.**, v. 30, p. 203-10, 2007.

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

SCHULTZ, W.; TREMBLAY, L.; HOLLERMAN, J. R. Reward prediction in primate basal ganglia and frontal cortex. **Neuropharmacology**, v. 37, p. 421-9, 1998.

SEGO, C.; GONÇALVES, L.; LIMA L. B.; DONATO JR, J.; METZGER, M. The lateral habenula and the rostromedial tegmental nucleus innervate neurochemically distinct subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 522, p. 1454-1484, 2013.

SESACK S. R.; GRACE A. A. Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 27-47, 2010.

SHEPARD, P.D.; HOLCOMB, H.H.; GOLD, J.M. Schizophrenia in translation: the presence of absence: habenular regulation of dopamine neurons and the encoding of negative outcomes. **Schizophr Bull.**, v. 32, p. 417-421, 2006.

SHERIN, J. E.; SHIROMANI, P. J.; MCCARLEY, R. W.; SAPER, C. B. Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. **Science**, v. 271, p. 216-219, 1996.

SHIKANAI, H.; YOSHIDA, T.; KONNO, K.; YAMASAKI, M.; IZUMI, T.; OHMURA, Y.; WATANABE, M.; YOSHIOKA, M. Distinct neurochemical and functional properties of GAD67-containing 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. **J. Neurosci.**, v. 32, p. 14415-14426. 2012

SHIN, R.; IKEMOTO, S. The GABA(B) receptor agonist baclofen administered into the median and dorsal raphe nuclei is rewarding as shown by intracranial self-administration and conditioned place preference in rats. **Psychopharmacology** (Berl), v. 208, p. 545-554, 2010.

SIEGEL, A.; ROELING, T. A.; GREGG, T. R.; KRUK, M. R. Neuropharmacology of brain-stimulation-evoked aggression. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, p. 359–389, 1999.

SIMERLY, R.B.; SWANSON, L.W. Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. **J.Comp. Neurol.**, v.270, p.209-242, 1988.

SIMERLY R. B. Anatomical Substrates of Hypothalamic integration. In: Paxino G. (Ed.). **The Rat Nervous System**. Elsevier: Academic. Press. 2004. 3^a ed. p. 335-368.

SIMS, K. B.; HOFFMAN, D. L.; SAID, S. I.; ZIMMERMAN, E. A. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: an immunocytochemical study. **Brain Res.**, v. 186, p. 165-183, 1980.

SOIZA-REILLY, M.; COMMONS, K. G. Glutamatergic drive of the dorsal raphe nucleus. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 41, p. 247-255, 2011a.

SOIZA-REILLY, M.; COMMONS, K. G. Quantitative analysis of glutamatergic innervation of the mouse dorsal raphe nucleus using array tomography. **J. Comp. Neurol.**, v. 519, p. 3802-3814, 2011b.

SPANAGEL, R.; WEISS, F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 521-527, 1999.

SRIVIDYA, R.; MALLICK, H. N.; KUMAR, V. M. Differences in the effects of medial and lateral preoptic lesions on thermoregulation and sleep in rats. **Neuroscience**, v. 139, p. 853-864, 2006.

STAMATAKIS, A. M.; STUBER, G. D. Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. **Nat. Neurosci.**, v. 15, p. 1105-1107, 2012a.

STAMATAKIS, A. M.; STUBER, G. D. Optogenetic strategies to dissect the neural circuits that underlie reward and addiction. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, 2012. (in press).

STEINBUSCH, H.W.; NIEUWENHUYIS, R.; VERHOFSTAD, A.A.; VAN DER KOOY, D. The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. A combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study. **J. Physiol.**, v. 77, p. 157-174, 1981.

STEINBUSCH, W. Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. In **Handbook of Chemical Neuroanatomy**. A. Bjorklund , T. Hokfelt. Elsevier. New York.1984. v. 3, p. 68-125.

STEININGER, T. L.; GONG, H.; MCGINTY, D.; SZYMUSIAK, R. Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups. **J. Comp. Neurol.**, v. 429, p. 638-653, 2001.

STRATFORD, T. R.; WIRTSHAFTER, D. Ascending dopaminergic projections from the dorsal raphe nucleus in the rat. **Brain Res.**, v. 511, p. 173-176, 1990.

SWANSON, L. W. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. **Brain Res.**, v. 886, p. 113-164, 2000.

SWANSON, L. W. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. **Brain Res.**, v. 9, p. 321–353, 1982.

THOMPSON, J. L.; BORGLAND, S. L. A role for hypocretin/orexin in motivation. **Behav. Brain Res.**, v. 217, p. 446-53, 2011.

TOTH, M.; FUZESI, T.; HALASZ, J.; TULOGDI, A.; HALLER, J. Neural inputs of the hypothalamic “aggression area” in the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 215, p. 7–20, 2010.

LACOSTE, B.; RIAD, M.; RATTÉ, M. O.; BOYE, S. M.; LÉVESQUE, D.; DESCARRIES, L. Trafficking of neurokinin-1 receptors in serotonin neurons is controlled by substance P within the rat dorsal raphe nucleus. **Eur. J. Neurosci.**, v. 29, p. 2303-2314, 2009.

UHL, G.R., GOODMAN, R.R., KUCHAR, M.J., CHILDERS, S.R., SNYDER, S.H., Immunohistochemical mapping of enkephalin containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat. **Brain Res.**, v. 166, p. 75–94, 1979.

ULLSPERGER, M.; VON CRAMON, D. Y. Error monitoring using external feedback: specific roles of the habenular complex, the reward system, and the cingulate motor area revealed by functional magnetic resonance imaging. **J. Neurosci.**, v. 23, p. 4308-4314, 2003.

UNGLESS, M. A.; MAGILL, P. J.; BOLAM, J. P. Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. **Science**, v. 303, p. 2040-2042, 2004.

URBAIN, N.; CREAMER, K.; DEBONNEL, G. Electrophysiological diversity of the dorsal raphe cells across the sleep-wake cycle of the rat. **J. Physiol.**, v. 573, p. 679-695, 2006.

VANDERHAEGHEN, J. J.; LOTSTRA, F.; DE MEY, J.; GILLES, C. Immunohistochemical localization of cholecystokinin- and gastrin-like peptides in the brain and hypophysis of the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 1190-1194, 1980.

VASUDEVA, R. K.; LIN, R. C.; SIMPSON, K. L.; WATERHOUSE, B. D. Functional organization of the dorsal raphe efferent system with special consideration of nitrergic cell groups. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 41, p. 281-293, 2011.

VÁZQUEZ-BORSETTI, P.; CELADA, P.; CORTÉS, R.; ARTIGAS, F. Simultaneous projections from prefrontal cortex to dopaminergic and serotonergic nuclei. **Int. J. Neuropsychopharmacol**, v.14, p. 289-302, 2011.

VERTES, R. P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 313, p. 643-668, 1991.

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

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WANG, G. J. The addicted human brain: insights from imaging studies. **J. Clin. Invest.**, v.111, p. 1444-1451, 2003.

VONG, L. YE, C.; YANG, Z.; CHUA S. JR.; LOWELL, B. B. Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. **Neuron**, v. 71, p. 142-154, 2011.

WANG, J.; SWANN, J. M. The magnocellular medial preoptic nucleus I. Sources of afferent input. **Neuroscience**, v. 141, p. 1437–1456, 2006.

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

WASELUS, M.; VALENTINO, R. J.; VAN BOCKSTAELE, E. J. Collateralized dorsal raphe nucleus projections: a mechanism for the integration of diverse functions during stress. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 41, p. 266-280, 2011.

WATABE-UCHIDA M, ZHU L, OGAWA SK, VAMANRAO A, UCHIDA N. Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. **Neuron**, v. 74, p. 858-873, 2012.

WEISSBOURD, B.; REN, J.; DELOACH, K. E.; GUENTHNER, C. J.; MIYAMICHI, K.; LUO, L. Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and GABAergic neurons. **Neuron**, v. 83, p. 645-662, 2014.

WIKLUND, L.; LEGER, L.; PERSSON, M. Monoamine cell distribution in the cat brain stem. A fluorescence histochemical study with quantification of indolaminergic and locus coeruleus cell groups. **J. Comp. Neurol.**, v. 203, p. 613-647, 1981.

WILLIAMS, K. W.; ELMQUIST, J. K. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. **Nat. Neurosci.**, v. 15, p. 1350-1355, 2012.

YAMAGUCHI, T.; SHEEN, W.; MORALES, M. Glutamatergic neurons are present in the ventral tegmental area. **Eur. J. Neurosci.**, v. 25, n. 1, p. 106-118, 2007.

YETNIKOFF, L.; LAVEZZI, H. N.; REICHARD, R. A.; ZAHM, D. S. An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. **Neuroscience**, v.282, p. 23-48, 2014.

YOON, Y. S.; LEE, H. S. Projection patterns of lateral hypothalamic, cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons to the dorsal raphe and/or the locus coeruleus in the rat. **Brain Res.**, v. 1494, p. 56-69, 2013.

ZAHM, D. S.; CHENG, A. Y.; LEE, T. J.; GHOBADI, C. W.; SCHWARTZ, Z. M.; GEISLER, S.; PARSELY, K. P.; GRUBER, C.; VEH, R. W. Inputs to the midbrain dopaminergic complex in the rat, with emphasis on extended amygdala-recipient sectors. **J. Comp. Neurol.**, v. 519, p. 3159-3188, 2011.

ZANGEN, A.; IKEMO, S.; ZADINA, J. E.; WISE, R. A. Rewarding and psychomotor stimulant effects of endomorph in-1: anteriorposterior differences within the ventral tegmental area and lack of effect in nucleus accumbens. **J. Neurosc.**, v. 22, p. 7225–7233, 2002.

ZANGEN, A.; SOLINAS, M.; GOLDBERG, S. R.; WISE, R. A.; IKEMOTO, S. Two brain sites for cannabinoid reward. **J. Neurosc.**, v. 26, n. 18, p. 4901– 4907, 2006.