LUCIANO GONÇALVES

**PROJEÇÕES DIFERENCIADAS DA HABÊNULA LATERAL PARA O NÚCLEO
TEGMENTAL ROSTROMEDIAL E ÁREA TEGMENTAL VENTRAL NO RATO**

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

São Paulo
2013

LUCIANO GONÇALVES

**PROJEÇÕES DIFERENCIADAS DA HABÊNULA LATERAL PARA O NÚCLEO
TEGMENTAL ROSTROMEDIAL E ÁREA TEGMENTAL VENTRAL NO RATO**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Martin Andreas Metzger

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Gonçalves, Luciano.

Projeções diferenciadas da habênula lateral para o núcleo tegmental rostromedial e área tegmental ventral no rato / Luciano Gonçalves. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Martin Andreas Metzger.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Circuitaria e assinatura neuroquímica das conexões de grupamentos monoaminérgicos.

Versão do título para o inglês: Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial nucleus and ventral tegmental area in the rat.

1. Habênula 2. Dopamina 3. Tegmento mesopontino 4. Aversão
5. Recompensa 6. Controle motor 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/SBIB022/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luciano Gonçalves.

Título da Tese: Projeções diferenciadas da habênula lateral para o núcleo tegmental rostromedial e área tegmental ventral no rato.

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

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

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

Ao meu amor e noiva Marina Oliveira Barbosa, mulher incrível que me apóia em todos os momentos da minha vida. Com você, tudo é diferente, sensacional. Te amo.

Aos meus futuros sogros José Celso Gonçalves Barbosa e Denise Guimarães Oliveira Barbosa e a minha futura cunhada Luísa Oliveira Barbosa por sempre me incentivarem.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A DEUS e à evolução.

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

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

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

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

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

Ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo por todas as oportunidades que me foram concedidas para a realização desta tese de doutorado no Curso de Pós Graduação.

Ao meu orientador Martin Andreas Metzger pela amizade, compreensão e permitir a realização do meu sonho. Jamais me esquecerei de cada ensinamento. Foram anos produtivos de muito crescimento profissional e de amizade. Você se tornou um grande companheiro de trabalho. Agradeço também a sua família, Eliana, Juan e Mariana, sempre fui muito bem recebido em sua casa. Muito obrigado por confiar no meu trabalho.

A professora Sara Joyce Shammah Lagnado pela importantíssima colaboração, ensinamentos e respeito durante todo o meu trabalho de mestrado e doutorado. Para mim, você é uma das melhores neuroanatomistas que conheci. Muito obrigado pela ajuda de sempre.

Ao querido professor "Anatomossauro" Professor Edson Aparecido Liberti, por participar na concretização de minha paixão em ensinar Anatomia Humana. Eu não tenho dúvidas que você foi e sempre será uma das pessoas mais sensacionais que conheci. Admiro-lhe muito querido amigo. Muito Obrigado pelos ensinamentos anatômicos, pelas várias conversas e direcionamentos.

À professora Silvia de Campos Boldrini (em memória), professora anatomista que tive a oportunidade de trabalhar por 3 anos como monitor de anatomia para o curso de Odontologia da USP. Que Deus esteja contigo. Saudades eternas.

Aos funcionários do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Marcelo e Renaide pelo exemplo de paciência e presteza.

Ao serviço da biblioteca e informação biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP pela orientação exemplar na normalização e correção das referências de minha tese de doutorado.

A todos os funcionários dos setores de serviços gerais, guardas e secretários que contribuíram para a correta manutenção, proteção e administração do Dep. de Fisiologia e Biofísica da USP. Destaco o querido José Maria pelo preciso trabalho.

Aos amigos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP: Wilma Allemand; Leila Campos; Cleyton; Silvia Honda; Adilson; Miguel, Milena, Cecília, Taisa, Daniel, Cris, Rosana, Anselmo, Arnaldo, Luiz Britto, João, Josember, Wilian, a todos que fizeram parte da minha história na USP.

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

Ao amigo e irmão Cristiano Mendes da Silva pela amizade e preocupação em me ajudar durante todas as etapas da minha formação acadêmica. Admiro-te pela vontade em vencer na vida.

Aos meus amigos e irmãos Flávio Silva Tampelini, popular “PREGO”, Guilherme Cotomacci, popular “COTO” e Ricardo, popular “TEVEZ”. Queridos amigos, gostaria de agradecer, sinceramente todo o companheirismo durante toda a minha jornada aqui em São Paulo.

A Universidade Federal do Triângulo Mineiro, hoje o meu local de trabalho, e também a minha segunda casa, local onde conheci pessoas maravilhosas que hoje são os meus grandes amigos. Agradeço de coração a todos e em especial a Lúcia, Bia, Mariana, Rui, Marcus. Agradeço também ao Lourimar, Douglas, Januário, Valdo, Aldo, Lucas e aos professores da disciplina de Anatomia Humana.

À amiga e irmã Wilma Allemand, umas das pessoas mais incríveis e bondosas que conheci na vida. Você pode não ter noção, mas eu te amo do fundo do meu coração. Guarde em sua memória querida “Wilminha”: se você precisar de um amigo irmão em qualquer situação fácil ou difícil, estarei sempre de braços abertos para discutirmos muito. Muito obrigado por você existir.

Aos amigos do laboratório de Neuroanatomia Funcional do departamento de Fisiologia e biofísica da USP pela amizade, companheirismo, discussões científicas e momentos de muitas alegrias: Aline; Aninha (A técnica mais extrovertida e competente que um laboratório possa ter); Leandro, Tai, Sara e José Donato.

Às pessoas com quem dividi moradia no CRUSP: Aline Silverol, Luiz Machado, Cleyton Sobrinho e Jáfia Lacerda. Muito obrigado pelo carinho, atenção, preocupação, respeito e companheirismo em todos os momentos que vivemos juntos. Vocês são grandes amigos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo suporte financeiro durante a minha tese de doutorado (143177/2008-7).

Enfim, muito obrigado a todos!!!

Ser Professor

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

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

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

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

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

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

Darwin Lanuskiewtz

Oração ao Cadáver Desconhecido

"Ao curvar-te com a lâmina rija de teu bisturi sobre o cadáver desconhecido, lembra-te que este corpo nasceu do amor de duas almas; cresceu embalado pela fé e esperança daquela que em seu seio o agasalhou, sorriu e sonhou os mesmos sonhos das crianças e dos jovens; por certo amou e foi amado e sentiu saudades dos outros que partiram, acalentou um amanhã feliz e agora jaz na fria lousa, sem que por ele tivesse derramado uma lágrima sequer, sem que tivesse uma só prece. Seu nome só Deus o sabe; mas o destino inexorável deu-lhe o poder e a grandeza de servir a humanidade que por ele passou indiferente."

Karl Rokitansky (1876)

RESUMO

GONÇALVES, L. **Projeções diferenciadas da habênula lateral para o núcleo tegmental rostromedial e área tegmental ventral no rato.** 2013. 106 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O núcleo tegmental rostromedial (RMTg) é uma estrutura GABAérgica assumida em atuar como um relé de sinalização a eventos aversivos para os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA). O RMTg recebe projeções glutamatérgicas da habênula lateral (LHb) e envia robustas projeções GABAérgicas para a VTA, que também recebe projeções diretas da LHb. Para detalhar a topografia das projeções da LHb para o RMTg e VTA, pequenas injeções do traçador anterógrado *Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin* (PHA-L) foram depositadas em diferentes subdivisões da LHb. A origem subnuclear das projeções da LHb para o RMTg e VTA foi confirmada com injeções do traçador retrógrado, cólera toxina, subunidade b (CTb) no RMTg ou VTA. Além disso, comparamos a posição topográfica dos neurônios marcados retrogradamente no RMTg após injeções na VTA com os axônios marcados anterogradamente, originando-se da LHb. Como revelado pelo mapeamento anterógrado e retrógrado, as projeções da LHb estão organizadas de maneira estritamente topográfica, com projeções para o RMTg, principalmente se originando da região lateral da LHb (LHbL), enquanto as projeções para a VTA, principalmente emergem da região medial da LHb (LHbM). No RMTg, axônios intensamente ramificados oriundos da LHb foram observados na mesma posição que os neurônios marcados retrogradamente, após injeções de CTb na VTA, com os axônios formando frequentemente aposições com os neurônios CTb+. De modo geral, os resultados demonstraram que as projeções da LHb para o RMTg e VTA originam-se de diferentes regiões da LHb e provam a existência de uma importante via bisináptica que conecta a LHbL com a VTA via o RMTg.

Palavras-chave: Habênula. Dopamina. Tegmento Mesopontino. Aversão. Recompensa. Controle Motor.

ABSTRACT

GONÇALVES, L. **Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial tegmental nucleus and ventral tegmental area in the rat.** 2013. 106 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The mesopontine rostromedial tegmental nucleus (RMTg) is a GABAergic structure believed to be a node for signaling aversive events to dopamine neurons in the ventral tegmental area (VTA). The RMTg receives glutamatergic inputs from the lateral habenula (LHb) and sends substantial GABAergic projections to the VTA, which also receives direct projections from the LHb. To further specify the topography of LHb projections to the RMTg and VTA, small injections of the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) were aimed at different subdivisions of the LHb. The subnuclear origin of LHb inputs to the VTA and RMTg was then confirmed by injections of the retrograde tracer cholera toxin subunit b (CTb) into the VTA or RMTg. Furthermore, we compared the topographic position of retrogradely labeled neurons in the RMTg resulting from VTA injections with that of anterogradely labeled axons emerging from the LHb. As revealed by anterograde and retrograde tracing, LHb projections were organized in a strikingly topographic manner, with inputs to the RMTg mostly arising from the lateral division of the LHb (LHbL), whereas inputs to the VTA mainly emerged from the medial division of the LHb (LHbM). In the RMTg, profusely branched LHb axons were found in close register with VTA projecting neurons and were frequently apposed to the latter. Overall, our findings demonstrate that LHb inputs to the RMTg and VTA arise from different divisions of the LHb and provide direct evidence for a disynaptic pathway that links the LHbL to the VTA via the RMTg.

Keywords: Habenula. Dopamine. Mesopontine tegmentum. Aversion. Reward. Motor control.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fotomicrografia de um local de injeção de CTb na área tegmental ventral (VTA) e da marcação retrógrada no núcleo tegmental rostromedial (RMTg)36
- Figura 2** - Desenhos esquemáticos de um local de injeção de CTb na VTA e a marcação retrógrada na região do tegmento mesopontino37
- Figura 3** - Fotomicrografias em campo escuro e campo claro mostrando a inervação do RMTg sobre os grupos de neurônios dopaminérgicos do complexo VTA-negra e campo retrorubral39
- Figura 4** - Fotomicrografias dos locais de injeções de PHA-L em diferentes regiões da LHb41
- Figura 5** - Fotomicrografias ilustrando a marcação anterógrada no tegmento mesopontino após injeções de PHA-L na LHb.43
- Figura 6** - Fotomicrografias ilustrando a distribuição da marcação anterógrada no tegmento mesopontino após injeções de PHA-L na LHb.44
- Figura 7** - Desenhos esquemáticos ilustrando a real distribuição das fibras marcadas anterogradamente na VTA e tegmento mesopontino após injeções de PHA-L na LHb.....46
- Figura 8** - Fotomicrografias ilustrando a distribuição e característica morfológica dos axônios PHA-L+ na VTA e no RMTg após injeção de PHA-L na LHb.....47
- Figura 9** - Fotomicrografias dos locais de injeções de CTb no RMTg e na VTA e a marcação retrógrada na LHb.....50
- Figura 10** - Plotagem das origens das projeções da LHb para o RMTg e VTA51
- Figura 11** - Fotomicrografias ilustrando as aposições da inervação da LHb sobre os neurônios do RMTg que enviam projeções para a VTA.....53
- Figura 12** - Plotagem ilustrando as aposições da inervação da LHb sobre os neurônios do RMTg que enviam projeções para a VTA.....54
- Figura 13** - Diagrama esquemático ilustrando as principais conexões aferentes e eferentes da habênula e os principais achados do presente estudo.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos Experimentais30

Tabela 2 - Lista de anticorpos primários31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BST	núcleo intersticial da estria terminal
CLi	núcleo caudal linear da rafe
cp	pedúnculo cerebral
CPu	caudado putâmem
CTb	toxina colérica, subunidade b
CTb+	neurônios retrogradamente marcados com CTb
DA	dopamina
DBB	núcleo da banda diagonal de Broca
DMTg	área tegmental dorsomedial
DR	núcleo dorsal da rafe
DRC	núcleo dorsal da rafe, parte caudal
DTgP	núcleo tegmental dorsal, parte pericentral
EP	núcleo entopeduncular
fr	fascículo retroflexo
GABA	ácido Gama-aminobutírico
GPI	globo pálido, segmento interno
IF	núcleo interfascicular
IP	núcleo interpeduncular
IPA	IP, subnúcleo apical
IPC	IP, subnúcleo caudal
IPI	IP, subnúcleo intermediado
LDT	núcleo tegmental laterodorsal
LH	hipotálamo lateral
LHb	núcleo habenular lateral
LHbL	LHb, região lateral
LHbLB	subnúcleo basal da parte lateral da LHb
LHbLMc	subnúcleo magnocelular da parte lateral da LHb
LHbLMg	subnúcleo marginal da parte lateral da LHb
LHbLO	subnúcleo oval da parte lateral da LHb
LHbLPc	subnúcleo parvocelular da parte lateral da LHb
LHbM	LHb, região medial
LHbMA	subnúcleo anterior da parte medial da LHb
LHbMC	subnúcleo central da parte medial da LHb
LHbMMg	subnúcleo marginal da parte medial da LHb
LHbMPc	subnúcleo parvocelular da parte medial da LHb
LHbMS	subnúcleo superior da parte medial da LHb
LPO	área pré-óptica lateral
MHb	núcleo habenular medial
ml	lemnisco medial
mlf	fascículo longitudinal medial
MnR	núcleo mediano da rafe
MT	núcleo terminal medial do trato óptico acessório
PBP	núcleo pigmentado parabraquial
PHA-L	<i>Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin</i>
PHA-L+	axônios marcados com PHA-L
PMnR	núcleo paramediano da rafe
PN	núcleo paranigral
PPTg	núcleo tegmental pedúnculopontino
PVP	núcleo talâmico paraventricular, parte posterior
RLi	núcleo rostral linear da rafe
RMTg	núcleo tegmental rostromedial
RRF	campo retrorubral
S	septo
sm	estria medular do tálamo
SNc	substância negra, parte compacta
SNR	substância negra, parte reticular
VTA	área tegmental ventral
VLPAG	substância cinzenta periaquedutal, parte ventrolateral
xscp	decussação do pedúnculo cerebelar superior

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Complexo Habenular	16
1.1.1 <i>Habênula Lateral - LHb</i>	16
1.2 Área Tegmental Ventral - VTA	18
1.3 Processamento e Condução de Estímulos Aversivos	23
1.4 Núcleo Tegmental Rostromedial - RMTg	24
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Animais	28
3.2 Procedimento Cirúrgico - Estereotaxia	28
3.3 Grupos Experimentais	29
3.4 Perfusão e Microtomia	30
3.5 Caracterizações dos anticorpos e controles imunoistoquímicos	31
3.6 Marcações por Imunoperoxidase	32
3.7 Marcações por Imunofluorescência	33
3.8 Análises dos dados	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Experimentos de Rastreamento Retrógrado	35
4.1.1 <i>Projeções do RMTg para a VTA</i>	35
4.2 Experimentos de Rastreamento Anterógrado	38
4.2.1 <i>Projeções do RMTg para a VTA</i>	38
4.2.2 <i>Projeções da LHb para o tegmento mesopontino</i>	40
4.3 Experimentos de Rastreamento Retrógrado	48
4.3.1 <i>Projeções da LHb para o RMTg e VTA</i>	48
4.4 Experimentos combinados de rastreamento retrógrado e anterógrado	52
5. DISCUSSÃO	55
5.1 Considerações Metodológicas	56
5.2 Localização topográfica do RMTg	57
5.3 Topografia das projeções da LHb para o tegmento mesopontino e VTA	58
5.4 Considerações Funcionais	63
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
APÊNDICE - Publicação do presente estudo	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Complexo Habenular

O complexo habenular é formado por um pequeno grupo de núcleos diencefálicos filogeneticamente antigos que está localizado no teto do terceiro ventrículo, na região pósteromedial do tálamo dorsal (STEPHENSON-JONES et al., 2011). Em mamíferos, a habênula é uma estrutura bilateral simétrica, subdividida em dois núcleos principais, a habênula medial (MHb) e a habênula lateral (LHb), os quais apresentam distintas conexões anatômicas e participam em diversas funções (HERKENHAM; NAUTA, 1979; HIKOSAKA, 2010; KLEMM, 2004; LECOURTIER; KELLY, 2007; SHELTON; BECERRA; BORSOOK, 2012). As informações chegam à MHb e LHb através da estria medular e a via de saída das projeções eferentes desses núcleos é feita pelo fascículo retroflexo (HERKENHAM; NAUTA, 1979). Em conjunto, a estria medular, complexo habenular e fascículo retroflexo, formam o sistema de condução diencefálico dorsal, que liga o prosencéfalo basal a grupamentos monoaminérgicos do mesencéfalo e tegmento mesopontino (SUTHERLAND, 1982).

1.1.1 *Habênula Lateral – LHb*

A LHb é composta por um complexo nuclear que pode ser subdividido em uma região medial (LHbM) e uma região lateral (LHbL), cada uma dessas regiões contendo 5 subnúcleos distintos (ANDRES; VON DURING; VEH, 1999; GEISLER; ANDRES; VEH, 2003). No passado, diversas funções vitais foram atribuídas a LHb, como dor, estresse, ansiedade, aprendizado e recompensa, assim como relação com a patofisiologia de doenças psiquiátricas, como a depressão e a esquizofrenia (ELLISON, 1994; GEISLER; TRIMBLE, 2008; HIKOSAKA et al., 2008; HIKOSAKA, 2010; KLEMM, 2004; LECOURTIER; KELLY, 2007; SHELTON; BECERRA; BORSOOK, 2012; SHUMAKE; GONZALEZ-LIMA, 2003). Até pouco tempo atrás, as exatas funções da LHb permaneceram relativamente obscuras. Atualmente existem claras evidências que os neurônios da LHb codificam estímulos aversivos e a expectativa de acontecimentos negativos (SHEPARD; HOLCOMB; GOLD, 2006;

ULLSBERGER; 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 neurônios da LHb (MATSUMOTO; HIKOSAKA, 2007, 2009). Em consonância com um possível papel chave na codificação de eventos aversivos, recentemente a LHb tem sido muito implicada em mecanismos de estresse e dor, assim como na patofisiologia de depressão maior (AMAT et al., 2001; CALDECOTT-HAZARD; MAZZIOTTA; PHELPS, 1988; LI et al., 2011; MORRIS et al., 1999; SARTORIUS et al., 2010; SHUMAKE; EDWARDS; GONZALES-LIMA, 2003).

Com relação à neuroquímica, existe consenso que a LHb é uma estrutura predominantemente glutamatérgica, contendo apenas esparsos neurônios GABAérgicos (BRINSCHWITZ et al., 2010; CONTESTABILE et al., 1987; KISS et al., 2002; VINCENT et al., 1980). A recente caracterização molecular de Aizawa et al. (2012) confirmou que a LHb contém exclusivamente neurônios glutamatérgicos, caracterizados pela expressão do transportador vesicular de glutamato do tipo 2 (VGLUT2).

Os neurônios da LHb de roedores recebem importantes projeções de diversas fontes, dentre elas, do pálido ventral, área preóptica lateral e núcleo entopeduncular (homólogo ao globo pálido interno de primatas), área tegmental ventral (VTA) e córtex pré-frontal (GROENEWEGEN; BERENDSE; HABER, 1993; GRUBER et al., 2007; HERKENHAM; NAUTA, 1977; KIM; LEE, 2012; KOWSKI et al., 2008; LI et al., 2011). Estudos eletrofisiológicos realizados em macacos mostraram que estímulos aversivos são sinalizados para a LHb, principalmente através de neurônios do segmento interno do globo pálido, Hong e Hikosaka (2008) e estudos recentes realizados em ratos confirmaram que as projeções do núcleo entopeduncular para a LHb são ativadas em respostas a estímulos aversivos e oriundas de neurônios glutamatérgicos e não GABAérgicos (SHABEL et al., 2012). Vale mencionar que a LHb contém receptores dopaminérgicos, Weiner et al. (1991), e recebe importantes projeções dopaminérgicas da VTA através da via mesohabenular (GRUBER et al., 2007; PHILLIPSON; PYCOCK, 1982). Esta via também foi confirmada com estudos farmacológicos, os quais mostraram que a administração de drogas agonistas para dopamina induz ao aumento da atividade neuronal na LHb (KOWSKI; VEH; WEISS, 2009; WIRTSHAFTER; ASIN; PITZER, 1994).

As eferências da LHb são, na sua maioria, formadas por projeções descendentes direcionadas para importantes grupos celulares monoaminérgicos e colinérgicos da ponte e do mesencéfalo, incluindo os núcleos da rafe, a parte compacta da substância negra (SNc), VTA e núcleo tegmental rostromedial (RMTg) (ARAKI; MCGEER; KIMURA, 1988; CORNWALL; COOPER; PHILLIPSON, 1990; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; HERKENHAM; NAUTA, 1979; HIKOSAKA, 2010; JHOU et al., 2009b; KIM, 2009).

Devido a este clássico conjunto de conexões aferentes e eferentes, a LHb tem sido considerada uma ponte de conexão entre o prosencéfalo e os grupamentos de neurônios monoaminérgicos do mesencéfalo e tegmento mesopontino (GEISLER; TRIMBLE, 2008; HIKOSAKA et al., 2008; LECOURTIER; KELLY, 2007). Dentre esses grupamentos de neurônios, o presente estudo visou esclarecer em detalhes as projeções diretas e indiretas da LHb para a VTA.

1.2 Área Tegmental Ventral – VTA

A VTA está localizada na região ventro-medial do mesencéfalo, entre o núcleo interpeduncular (IP), a SNc e o núcleo rubro (OADES; HALLIDAY, 1987). Dahlstrom e Fuxe (1964) destacam 3 grandes grupamentos dopaminérgicos no mesencéfalo ventral, A8, A9 e A10, não existindo um limite claro entre eles. O grupamento A8 está contido na região do campo retrorubral (RRF), o grupamento A9 na SNc, e o grupamento A10 na VTA (DAHLSTRÖM; FUXE, 1964; FALLON; MOORE, 1978). A VTA se diferencia da SNc e do campo retrorubral por suas profusas conexões com o sistema límbico (DAHLSTRÖM; FUXE, 1964). Deve-se ressaltar 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 núcleo dorsal da rafe (DR) e a substância cinzenta periaquedutal (HÖKFELT et al., 1984).

Muitos pesquisadores tentaram descrever a formação nuclear da VTA, baseando-se em estudos morfológicos, neuroquímicos e funcionais. A VTA é composta por 5 núcleos, descritos como núcleo pigmentado parabraqial (PBP) e núcleo paranigral (PN), ambos situados lateralmente, e os núcleos rostral linear da rafe (RLi), interfascicular (IF) e caudal linear da rafe (CLi), situados ao longo da linha média (OADES; HALLIDAY, 1987; SWANSON, 1982). Além dessas formações

nucleares, de acordo com estudos funcionais, a VTA também pode ser subdividida em uma região rostral e uma região caudal. Para esclarecer esta hipótese, foram investigados os exatos sítios na VTA, nos quais drogas de abuso são preferencialmente auto-administradas e os resultados desses estudos mostraram que diversas drogas de abuso exercem efeitos reforçadores intensos na VTA caudal e pouco ou nenhum efeito na VTA rostral (IKEMOTO, 2007; WISE, 2004). O IP foi utilizado como critério topográfico para demarcar a VTA rostral e a VTA caudal, enquanto a região medial e lateral da VTA foi delimitada, utilizando como limite a borda lateral do fascículo retroflexo.

Do ponto de vista neuroquímico, a VTA apresenta como marca principal a presença de neurônios dopaminérgicos. Além disso, foi descrita a presença de outros tipos de neurotransmissores e neuropeptídeos na VTA que podem estar ou não co-localizados com neurônios dopaminérgicos. Assim, estudos quantitativos indicaram que cerca de 65% dos neurônios da VTA são dopaminérgicos, enquanto 35% são GABAérgicos (NAIR-ROBERTS et al., 2008; SWANSON, 1982). Recentemente, também foram descritos neurônios glutamatérgicos na VTA, que expressam VGLUT2 (KAWANO et al., 2006; NAIR-ROBERTS et al., 2008; YAMAGUCHI; SHEEN; MORALES, 2007). Os neurônios glutamatérgicos da VTA são principalmente encontrados paralelos à linha mediana e enviam projeções excitatórias para alvos importantes, como o córtex pré-frontal e o núcleo accumbens (GORELOVA et al., 2012; HNASKO et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2011). Além disso, os neurônios da VTA também podem expressar ou co-expressar, neurotensina, colecistoquinina, óxido nítrico e as proteínas ligantes de cálcio parvalbumina, calbindina e calretinina (GONZÁLEZ-HENNÁNDEZ; RODRÍGUEZ, 2000; JAYARAMAN et al., 1990; MCRITCHIE; HARDMAN; HALLIDAY, 1996; OLSON; NESTER, 2007).

A partir de diferentes núcleos e heterogênea população de neurônios, a VTA origina dois sistemas principais de projeções: o sistema mesocortical e o sistema mesolímbico. O sistema mesocortical inclui projeções para áreas corticais pré-frontais, cingular anterior, agranular insular, piriforme e entorrinal. Já o sistema mesolímbico engloba projeções para o núcleo septal, a amígdala, o núcleo accumbens e o tubérculo olfatório (BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007; OADES; HALLIDAY, 1987). Há evidências sugerindo que os setores rostro-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).

Está bem claro que os sistemas de projeções ascendentes dos neurônios dopaminérgicos e GABAérgicos da VTA atuam em múltiplas funções cerebrais relacionadas principalmente com a motivação, cognição e recompensa, assim como no controle motor e que a dopamina liberada em seus alvos depende da despolarização dos neurônios dopaminérgicos da VTA (BROZOSKI et al., 1979; GOLDMAN-RAKIC, 1994; KOOB, 1996; REDGRAVE; PRESCOTT; GURNEY, 1999). Neste sentido, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que este padrão de despolarização dos neurônios dopaminérgicos depende de projeções excitatórias para a VTA, especialmente, em sua maioria, glutamatérgicas (CHERGUI et al., 1993; GRACE; BUNNEY, 1984; JOHNSON; NORTH, 1992a; LODGE; GRACE, 2006; OVERTON; CLARK, 1992). Em décadas de pesquisa foi documentado que os neurônios dopaminérgicos da VTA e da SNc transmitem e liberam DA de duas maneiras principais, o modo tônico e o modo fásico (GOTO; OTANI; GRACE, 2007; GRACE, 1991). O modo tônico consiste em disparos isolados regulares para manter um nível basal de DA em suas estruturas alvos, enquanto o modo fásico consiste em rajadas de disparos de 100–500ms, resultando em um aumento significativo das concentrações de DA em suas regiões alvos (SCHULTZ, 1998, 2007). Os neurônios dopaminérgicos são ativados fasicamente por estímulos de recompensas inesperadas, estímulos que predizem recompensas e estímulos novos e intensos (BROMBERG-MARTIN et al., 2010; OVERTON; CLARKE, 1997; REDGRAVE; GURNEY; REYNOLDS, 2008; SCHULTZ; DAYAN; MONTAGUE, 1997). O padrão de disparo fásico dos neurônios dopaminérgicos tem sido discutido principalmente no contexto do papel da DA no controle motivacional e foi proposto que esse padrão de disparo atue como um sinal importante para a aprendizagem reforçada, Schultz et al. (1997) e Wise (2005), assim como um sinal de incentivo para a busca de recompensas (BERRIDGE; ROBINSON, 1998).

As principais aferências da VTA são bem esclarecidas (GEISLER; ZAHM, 2005; WATABE-UCHIDA et al., 2012). Isso vale, em especial, para as aferências glutamatérgicas. Assim, o recente estudo inovador de Geisler et al. (2007), onde combinando as técnicas de rastreamento retrógrado com hibridização *in situ* para diferentes subtipos de transportadores de glutamato (VGLUT1; VGLUT2 e VGLUT3), revelaram que muitas estruturas glutamatérgicas corticais e subcorticais projetam-se

para a VTA. É interessante notar que a maioria dos neurônios glutamatérgicos que aferentam a VTA são encontrados em um conjunto de estruturas contínuas, que se estendem do córtex pré-frontal, rostralmente, até o tegmento mesopontino, caudalmente, incluindo muitas estruturas interconectadas que faz parte, mais a VTA, do chamado “cerne isodendrítico”. Este cerne é formado por uma vasta coleção de grupos de neurônios interconectados que recebem projeções de diversos núcleos, assim como enviam diversas projeções colaterais para várias regiões, oferecendo assim, uma ótima função integrativa (GEISLER; ZAHM, 2005; RAMÓN-MOLINER; NAUTA, 1966). Nesse sistema aferente da VTA tem destaque o córtex pré-frontal, com participação das regiões pré-límbica, infra-límbica, peduncular dorsal, cíngulo e orbital, que fornecem a maioria das projeções VGLUT1+ para a VTA. Porém, estruturas subcorticais contendo neurônios VGLUT2+ constituem a principal fonte excitatória da VTA, com muitos neurônios de projeções VGLUT2+ encontrados em diferentes distritos do hipotálamo e epitálamo, incluindo o hipotálamo lateral, a área pré-óptica lateral, o hipotálamo medial, a LHb e também em estruturas da formação reticular mesopontina, como os núcleos tegmentais pedúnculo pontino (PPTg) e laterodorsal (LDT). Ainda, as projeções VGLUT3+ para a VTA originam-se principalmente do DR e núcleo mediano da rafe (MnR) (GEISLER et al., 2007). Corroborando com os fatos descritos acima, Omelchenko e Sesack (2007), utilizando técnicas de microscopia eletrônica, descreveram que a maioria das sinapses na VTA é formada por axônios VGLUT2+, portanto, a partir de estruturas subcorticais. Este padrão também está de acordo com os resultados do estudo eletrofisiológico que observou a curta latência e grande significado funcional das projeções subcorticais para a modulação da VTA (DOMMETT et al., 2005).

Como mencionado acima, existe uma robusta inervação da VTA a partir do PPTg e LDT, Charara, Smith e Parent (1996), Geisler et al. (2008), Mena-Segovia, Winn e Bolam (2008) e Oakman et al. (1995), com uma contribuição substancial de neurônios glutamatérgicos (GEISLER et al., 2007). Porém, além de glutamato, projeções colinérgicas contribuem para as vias excitatórias do PPTg/LDT para a VTA. No complexo PPTg/LDT existem neurônios glutamatérgicos, colinérgicos e GABAérgicos (WANG; MORALES, 2009). Estudos de microscopia eletrônica revelaram que todos esses três neurotransmissores participam das projeções do complexo PPTg/LDT para a VTA com projeções colinérgicas formando sinapses simétricas com neurônios dopaminérgicos e assimétricas com neurônios

GABAérgicos (GARZÓN et al., 1999; OMELCHENKO; SESACK, 2005, 2006). Essas observações anatômicas estão de acordo com dados neuroquímicos, os quais revelaram que o bloqueio dos receptores colinérgicos e glutamatérgicos na VTA resultam em diminuição da liberação de dopamina no núcleo accumbens (BLAHA et al., 1996; FORSTER; BLAHA, 2000).

Além disso, projeções peptidérgicas atuam na modulação dos neurônios dopaminérgicos da VTA, com destaque para as projeções orexinérgicas do hipotálamo (FADEL; DEUTCH, 2002). As projeções orexinérgicas estão envolvidas em mecanismos de recompensa, talvez pela ação excitatória sobre os neurônios dopaminérgicos (BORGLAND et al., 2006; HARRIS; WIMMER; ASTON-JONES, 2005; KOROTKOVA et al., 2003). Outros peptídeos, como a neurotensina e o fator liberador de córtico-trofina de múltiplas fontes, também modulam a excitabilidade dos neurônios dopaminérgicos da VTA (GEISLER; ZAHM, 2006; REYNOLDS et al., 2006; RODAROS et al., 2007; TAGLIAFERRO; MORALES, 2008; WANAT et al., 2008).

Como detalhado acima, está claro que a VTA possui diversas fontes excitatórias, entretanto, pouco se sabe do controle inibitório dos neurônios dopaminérgicos da VTA. Está bem documentado que os neurônios dopaminérgicos da VTA respondem com curtos disparos a recompensas inesperadas e a estímulos novos e intensos, Overton e Clark (1997), Schultz (1998, 2007) e Tobler, Fiorillo e Shultz (2005), enquanto pausas inibitórias são causadas pela omissão de recompensa e eventos aversivos (BRISCHOUX et al., 2009; HIKOSAKA, 2010; HORVITZ, 2000; UNGLESS; MAGILL; BOLAM, 2004). Até pouco tempo, haviam poucas informações sobre o controle inibitório e dos padrões de disparos dos neurônios dopaminérgicos da VTA e a fonte de informações aversivas conduzidas para a VTA (BROMBERG-MARTIN et al., 2010; ILANGO et al., 2012). É provável que informações aversivas sejam sinalizadas na VTA através das mesmas estruturas que sinalizam recompensas, com projeções direcionadas para os neurônios GABAérgicos da VTA, que em seguida, através de projeções intrínsecas, inibem os neurônios dopaminérgicos da VTA (JOHNSON; NORTH, 1992a). Porém, recentes estudos demonstraram que a população de neurônios GABAérgicos da VTA é muito heterogênea e principalmente composta por neurônios de projeções, Carr e Sesack (2000), Van Bockstaele e Pickel (1995), que emitem colaterais axônicos locais, os quais podem regular a atividade dos neurônios dopaminérgicos

da própria VTA. Assim, um recente estudo de imunoeletrônica sobre os colaterais GABAérgicos da VTA revelou que esses neurônios contatam, de uma maneira não-seletiva, neurônios dopaminérgicos e GABAérgicos (OMELCHENKO; BELL; SESACK, 2009). Além disso, os neurônios glutamatérgicos da VTA também emitem colaterais locais que estabelecem contatos sinápticos com neurônios dopaminérgicos e não dopaminérgicos na própria VTA (DOBI et al., 2010). A falta de especificidade das projeções inibitórias intrínsecas da VTA indica que o controle inibitório dos neurônios dopaminérgicos não está situado dentro da própria VTA, mas sim através de fontes de projeções GABAérgicas extrínsecas. Recentes estudos neuroanatômicos e eletrofisiológicos esclareceram que estímulos aversivos são sinalizados para a VTA através de circuitos muito específicos, com destaque para duas estruturas, a LHb e o recente e definido RMTg.

1.3 Processamento e Condução de Estímulos Aversivos

Inovadores estudos eletrofisiológicos realizados em macacos, Matsumoto e Hikosaka (2007, 2009), assim como estudos de imagens de ressonância magnética funcional (fMRI) em humanos, Ullsperger e Von Cramon (2003), demonstraram que os neurônios da LHb codificam com grande precisão, frustração por serem intensamente ativados por estímulos aversivos, omissão de recompensas e estímulos condicionados que predizem punição, enquanto são inibidos por recompensas, assim como estímulos que predizem recompensas. Além disso, 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). No mesmo sentido, foi comprovado que as lesões da LHb resultam em uma desinibição dos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos (LISOPRAWSKI et al., 1980; SASAKI et al., 1988). Da mesma forma, as lesões do fascículo retroflexo bloqueia a inibição mediada pela LHb sobre os neurônios dopaminérgicos da VTA e SNc (JI; SHEPARD, 2007). Ainda, Nishikawa, Fage e Scatton, (1986) verificaram que a interrupção da via LHb para o mesencéfalo causa um aumento do metabolismo dopaminérgico nas áreas prosencefálicas que recebem projeções da VTA e SNc. Em conjunto, esses estudos eletrofisiológicos, de lesões e imagens mostram que o aumento da atividade dos neurônios da LHb, como por exemplo, após estímulos

aversivos, é crucial para o controle inibitório dos neurônios dopaminérgicos da VTA e SNc.

Embora esteja claro a relação funcional entre a LHb e a VTA, parece pouco provável que o efeito inibitório da LHb sobre a VTA resulte de uma entrada direta monossináptica sobre os neurônios DA ou GABA (JI; SHEPARD, 2007). Existem evidências convincentes que a projeção direta da LHb para a VTA é glutamatérgica e modesta (BRINSCHWITZ et al., 2010; GEISLER et al., 2007). Além disso, a incidência sináptica dessa projeção é muito baixa, com poucas sinapses formadas com neurônios GABAérgicos e também com neurônios dopaminérgicos da VTA (OMELCHENKO; BELL; SESACK, 2009). Dessa forma, os estudos citados acima indicam que o principal controle inibitório da LHb sobre VTA não está situado no interior da própria VTA, mas talvez em alguma estação relé, que faz uma ponte de conexão entre a LHb e a VTA. Apenas recentemente o RMTg foi explorado, descrito e considerado a principal fonte inibitória dos neurônios dopaminérgicos da VTA (FERREIRA et al., 2008; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; JHOU et al., 2009a, b; KAUFILING et al., 2009).

1.4 Núcleo Tegmental Rostromedial – RMTg

O primeiro passo para a identificação do RMTg, antes mesmo de ser explorado, iniciou com Herkenham e Nauta (1979), descrevendo as projeções eferentes do núcleo habenular do rato, documentaram um campo terminal denso no tegmento mesopontino, em um território lateral e adjacente ao MnR, após injeções restritas de traçador anterógrado na LHb. Há evidências que este campo terminal é parte de uma estrutura cerebral recentemente nomeada, dependendo do autor, como “cauda posterior da VTA”, Bourdy e Barrot (2012), Kaufling et al. (2009), Perrotti et al. (2005), polo caudal da VTA, Ferreira et al. (2008), ou como descrito a pouco tempo, RMTg (JHOU et al., 2009a, b; GONÇALVES et al., 2012). Esta estrutura estende-se do polo caudal da VTA, para dentro do tegmento mesopontino e constitui um importante relé para sinalização de eventos aversivos para o mesencéfalo (HIKOSAKA, 2010; JHOU et al., 2009b).

Este núcleo se destacou quando Perrotti et al. (2005) demonstraram a expressão de Δ FosB em resposta à administração crônica forçada de drogas psicoestimulantes em uma população de células GABAérgicas no polo caudal da

VTA. Foi identificado que este núcleo, localizado dorsolateral à metade caudal do IP, contém predominantes neurônios GABAérgicos, Olson e Nestler (2007) e se projetam extensivamente para o complexo VTA-negra (FERREIRA et al., 2008; GEISLER et al., 2008; GEISLER; ZAHM, 2005). Além de neurônios GABAérgicos, distribuídos por toda a sua extensão ântero-posterior, o RMTg apresenta neurônios imunoreativos para somatostatina, receptores de opióide do tipo μ , fibras imunoreativas a tirosina hidroxilase (TH) em toda a sua extensão ântero-posterior e espalhados neurônios dopaminérgicos, situados exclusivamente em sua região rostral (JHOU et al., 2009a, b).

Em publicações simultâneas de dois grupos, Jhou et al. (2009b) e Kaufling et al. (2009), as conexões desta região, assim como o padrão de expressão do gene Fos foram examinadas em mais detalhes. Esses estudos revelaram que variações do gene Fos são essencialmente expressos em neurônios GABAérgicos que se projetam para a VTA em resposta à administração de psicoestimulantes, com 92% das células ativadas sendo neurônios GABAérgicos (KAUFLING et al., 2009). A expressão do gene Fos no RMTg também foi descrita em resposta a estímulos aversivos condicionados e não-condicionados, com aproximadamente 80% das células ativadas sendo neurônios GABAérgicos (JHOU et al., 2009a). Vale destacar que a expressão do gene Fos, sobre as condições citadas acima, de longe não se limita apenas ao conjunto de neurônios do polo caudal da VTA, como foi descrito por Perrotti et al. (2005), mas também está presente em uma população neuronal contínua que se estende do polo caudal da VTA até o tegmento mesopontino, aproximando em direção caudal até o polo rostral do PPTg (GEISLER et al., 2008; JHOU et al., 2009b).

Estudos de mapeamento neuronal usando traçadores retrógrados, Jhou et al. (2009b), Kaufling et al. (2009) e anterógrados, Kim et al. (2009), descreveram que a principal fonte de projeções para o RMTg se origina na LHb. Além disso, o RMTg recebe projeções de muitas estruturas que também aferentam a VTA, incluído projeções do córtex pré-frontal, amígdala estendida, região pré-óptica, hipotálamo lateral, paraventricular e posterior (JHOU et al., 2009b; KAUFLING et al., 2009). Outras importantes entradas para o RMTg tem origem em estruturas do tegmento mesopontino e rombencéfalo, como DR, formação reticular mesencefálica, pontina e bulbar, PPTg e o LDT (JHOU et al., 2009b).

Kaufling et al. (2009) concluíram que as projeções aferentes do RMTg são, em geral, similares as da VTA, com poucas diferenças. Por outro lado, está claro que as projeções eferentes do RMTg são diferentes da VTA. Essas projeções terminam principalmente em estruturas do mesencéfalo e rombencéfalo e tem como alvo principal as projeções GABAérgicas bilaterais para a VTA e SNc, importante característica neuroanatômica de destaque do RMTg (FERREIRA et al., 2008; JHOU et al., 2009a).

Como descrito acima, o RMTg recebe projeções de várias estruturas prosencefálicas, porém, apenas poucas estruturas do prosencéfalo, incluindo o pálido ventral, área pré-óptica lateral, hipotálamo lateral e núcleo talâmico intralaminar mediano são inervadas pelo RMTg (JHOU et al., 2009a). Por outro lado, deve ser destacado que os grupos de neurônios serotoninérgicos e colinérgicos recebem importantes projeções do RMTg. Esta conexão foi a pouco tempo investigada e verificaram que grande parte das projeções GABAérgicas do RMTg para o DR e PPTg são ativadas com a administração de drogas psicoestimulantes. Além disso, essas projeções emitem colaterais para ambas as regiões ou até mesmo para a própria VTA. Esses estudos sugerem o RMTg como um modulador integrativo de múltiplas estruturas encefálicas, especialmente a VTA (LAVEZZI; PARSLEY; ZAHM, 2012).

Por fim, o circuito LHb-RMTg-VTA tem sido explorado recentemente em um inovador estudo de microscopia eletrônica (BALCITA-PEDICINO et al., 2011). Os resultados desse estudo mostraram que mais de 55% das sinapses de axônios da LHb no RMTg são sobre dendritos GABAérgicos e que os axônios GABAérgicos que se originam do RMTg, contatam na VTA, quase que exclusivamente, neurônios dopaminérgicos através de sinapses simétricas. Embora os estudos mencionados acima comprovem a ação inibitória da LHb sobre neurônios dopaminérgicos da VTA, nenhum estudo, até o momento, explorou comparativamente as projeções da LHb para o RMTg e VTA e se os mesmos neurônios do RMTg, que recebem projeções da LHb, enviam projeções para a VTA. Assim, os principais objetivos do presente estudo foram:

2 OBJETIVOS

1. Mapear e comparar detalhadamente a origem das projeções da LHb para o RMTg e a VTA com a técnica de rastreamento retrógrado, utilizando o traçador retrógrado cólera toxina, subunidade b (CTb).
2. Mapear e comparar detalhadamente as projeções da LHb para o RMTg e a VTA com a técnica de rastreamento anterógrado, utilizando o traçador *Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin* (PHA-L).
3. Mapear e comparar detalhadamente a posição topográfica dos neurônios marcados retrogradamente no RMTg após injeções de CTb na VTA, com fibras marcadas anterogradamente, após injeções de PHA-L na LHb.
4. Verificar se as projeções eferentes da LHb no RMTg formam aposições com os neurônios do RMTg que se projetam para a VTA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos Wistar adultos, (180-220 g; n=36) adquiridos a partir de criação local no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo foram usados em todos os experimentos. Os ratos foram mantidos em grupo, em caixas com temperatura controlada de 23 °C, iluminação com ciclos alternados em claro e escuro a cada 12 horas, com água e comida a vontade. Todos os experimentos estiveram de acordo com as diretrizes de cuidados e usos de animais de laboratório (NIH – publicação nº. 80-23, recebido em 1996) e foram aprovados pelo Comitê Institucional de Ética em Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Protocolo nº. 153/2012). Todos os cuidados foram tomados para minimizar o sofrimento e o número de ratos utilizados.

3.2 Procedimento Cirúrgico – Estereotaxia

Os ratos foram inicialmente anestesiados com injeções subcutâneas, com coquetel anestésico contendo Ketamina (Syntec, Hortolândia, Brasil; 5 mg/100 g de peso corporal), Acepromazina (Univet, São Paulo, Brasil; 0.04 mg/100 g de peso corporal) e Xilazina (Syntec; 1 mg/100 g de peso corporal) diluídos em água destilada. Após verificação do grau de anestesia, foi realizada tricotomia na região craniana, seguida pelo posicionamento do animal no estereotáxico (Kopf, Califórnia, USA). A cabeça do animal foi imobilizada por barras auriculares, posicionadas nos ductos auriculares e através da presilha nasal, presa aos incisivos superiores. A calota craniana foi exposta por incisão de aproximadamente 2 cm na superfície cutânea mediana e rebatida a pele que a recobre, seguido de afastamento dos tecidos subcutâneos aderidos na superfície óssea. Com o auxílio de microscópio cirúrgico, dois pontos craniométricos foram identificados como referência: o Bregma e o Lambda. Para garantia de nivelamento do crânio no plano horizontal, a altura desses dois pontos foi ajustada, evitando diferença superior a 0,2 mm entre ambos.

A partir do ponto craniométrico Bregma, com o auxílio de motor de suspensão equipado com broca odontológica esférica, foi aberta uma pequena janela de aproximadamente 0,5 cm² para expor a superfície do encéfalo. Os traçadores

anterógrado *Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin* (PHA-L; a 2.5%, 0.01 M, preparado em soro fosfato, Vector Laboratories, Burlingame, CA) e traçador retrógrado Cólera Toxina, subunidade b (CTb; *low salt* a 1%, diluído em água destilada, List Biological Laboratories Inc., Campell, CA) foram utilizados no presente estudo. As coordenadas estereotáticas foram obtidas no Atlas de Encéfalo de Rato de Paxinos e Watson (2007), (VTA, AP: -5,04 mm, ML: 1,0 mm e DV: 8,2 mm; RMTg, AP: -7,08 mm, ML: 6,2 mm e DV: 8,6 mm ; LHb, AP: -3,72 mm, ML: 0,8 mm e DV: 5,0 mm) e adaptadas.

Ambos os traçadores foram injetados com micropipetas de vidro confeccionadas em estirador de pipetas (Kopf-720, Califórnia, USA) com diâmetro interno de 10-15 μm para as injeções de PHA-L e 15-20 μm para as injeções de CTb. Todas as injeções foram feitas por iontoforese no hemisfério cerebral direito, utilizando uma fonte de corrente positiva pulsada (7 segundos ligado, 7 segundos desligado), alternando em 5 μA , durante 20 minutos, para as injeções de CTb na VTA, 10-15 minutos para as injeções de CTb no RMTg e 4 μA , durante 15 minutos, para as injeções de PHA-L na LHb. Após as injeções, as pipetas foram mantidas em posição durante 3 minutos com corrente contínua negativa de 3 μA para minimizar o escape do traçador durante a retirada da pipeta. Os tecidos foram limpos com solução salina, reposicionados e realizada a sutura na região operada. Para transporte do traçador no tecido nervoso, os ratos permaneceram em período pós-operatório de 7-10 dias, respectivamente para as injeções de CTb e PHA-L.

3.3 Grupos Experimentais

Diante dos parâmetros descritos acima, 3 grupos de ratos receberam injeções unilaterais simples: CTb na VTA (n=14); PHA-L no RMTg (n=3) e CTb no RMTg (n=6). Além disso, um grupo de ratos recebeu injeções unilaterais duplas: PHA-L na LHb, junto com injeções de CTb na VTA (n=13). Dos 13 casos que receberam injeções duplas, houve 7 acertos de injeções de PHA-L na LHb, 8 acertos de injeções de CTb na VTA e apenas 3 casos (R71, R77, R82) receberam injeções duplas para o estudo simultâneo de ambas estruturas no mesmo animal (PHA-L na LHb e CTb na VTA). Após análises detalhadas dos 36 casos de injeções, 12 casos foram selecionados como protótipos para as descrições dos resultados. Ver tabela 1 para maiores detalhes.

Tabela 1 - Grupos experimentais.

Traçadores e Locais de Injeções	n = 36	Casos selecionados para estudo	Propósitos
CTb – VTA	14	R696, R70	Mapear e ilustrar retrogradamente a origem e intensidade das projeções da LHb e RMTg para a VTA.
PHA-L – RMTg	3	R86	Ilustrar anterogradamente as projeções do RMTg para o complexo VTA-negra.
CTb – RMTg	6	R61, R62, R64	Mapear e ilustrar retrogradamente a origem das projeções da LHb para o RMTg.
PHA-L – LHb	13	PHA-L – LHb R81, R82 e R77	Mapear, ilustrar e comparar anterogradamente as projeções da LHb para o RMTg e VTA.
CTb – VTA		PHA-L – LHb CTb – VTA R71, R77, R82	Mapear, ilustrar e comparar anterogradamente as projeções da LHb para o RMTg e VTA além de explorar as aposições no RMTg, das fibras que originam-se da LHb, com neurônios que se projetam para a VTA.

3.4 Perfusão e Microtomia

Após o período de sobrevivência de 7 dias para as injeções de CTb e 10 dias para as injeções de PHA-L ou combinação de PHA-L/CTb, os ratos foram anestesiados e submetidos à perfusão cardíaca, inicialmente utilizando 90 ml de solução salina a 0,9%, seguidos por 500 ml de paraformaldeído a 4%, feito em tampão fosfato 0,1 M (PB; pH 7,3) a 4 °C. Os encéfalos foram pós-fixados por 4 horas a 4 °C e crio-protegidos em solução PB a 4 °C com 20 % de sacarose e cortados no plano coronal em micrótomo de congelamento, com fatias de 40 µm de espessura, coletados em quatro séries. Uma série dos cortes de cada caso que recebeu injeção simples de CTb (VTA ou RMTg) ou PHA-L (RMTg ou LHb) foi processada com a técnica de imunoperoxidase simples para CTb ou PHA-L. Em um dos casos que receberam injeções de PHA-L no RMTg, alguns cortes foram preparados com a técnica de dupla imunoperoxidase para PHA-L e TH. Para os casos que receberam injeções de CTb junto com as injeções de PHA-L, séries adjacentes dos cortes foram utilizadas para procedimentos de dupla imunoperoxidase ou dupla imunofluorescência. Uma série adicional dos cortes de cada animal foi corada com tionina, para servir como referência citoarquitetônica.

3.5 Caracterizações dos anticorpos e controles imunoistoquímicos

Os anticorpos primários utilizados no presente estudo (Tabela 2) foram previamente caracterizados e testados para definição de sua especificidade. O anticorpo feito em cabra contra CTb (List, #104) foi obtido a partir da purificação da toxina do vibrião da cólera (List datasheet), que não é fisiologicamente encontrado no organismo. O anticorpo feito em coelho contra PHA-L (DAKO, Carpinteria, CA, #B275) foi produzido pela hiperimunização de ratos com lectina purificada, que também não é encontrada no organismo de mamíferos (DAKO). O anticorpo feito em camundongo contra TH (purificada a partir de células PC12) (Chemicon, #MAB318). É importante mencionar que cortes de encéfalos que não receberam injeções de PHA-L ou CTb não mostraram imunoreatividade, quando reagidos com os respectivos anticorpos primários contra PHA-L ou CTb. As concentrações ideais de cada anticorpo foram individualmente determinadas. A especificidade dos anticorpos secundários foi comprovada pela ausência de marcação específica em cortes dos encéfalos de animais que não receberam injeção de traçador ou em cortes dos encéfalos de animais que receberam injeção de traçador.

Tabela 2 - Lista de anticorpos primários.

Antígeno	Imunogênio	Empresa	Diluições	
			I _{Pe}	I _F
CTb	Toxina purificada do Vibrião da cólera	List Laboratories, (Burlingame, CA), #104, feito em cabra, policlonal	1:10.000	1:10.000
PHA-L	Lectina purificada do <i>Phaseolus vulgaris</i>	DAKO, (Carpinteira, CA), #B275, feito em coelho, policlonal	1:5.000	1:2.500
TH	Tirosina hidroxilase	Chemicon, (Temecula, CA), #MAB318 feito em camundongo, monoclonal	1:5.000	-

Abreviações: I_{Pe}: imunoperoxidase; I_F: imunofluorescência.

3.6 Marcações por Imunoperoxidase

Os procedimentos de imunoperoxidase foram realizados em cortes com livre flutuação, em temperatura ambiente. Todos os marcadores, CTb, Luppi, Fort e Jouvett (1990) e PHA-L, Gerfen e Sawchenko (1984) e TH foram processados com técnicas de imunoistoquímica. Nos casos de CTb e TH, os cortes foram inicialmente pré-incubados por 30 minutos em soro normal de cabra a 2% (NGS, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) para CTb e em soro normal de burro (NHS, Vector Laboratories, Burlingame, CA) para TH e então incubados com o anticorpo policlonal contra CTb, feito em cabra (List), diluído a 1:10.000 ou anticorpo monoclonal contra TH, feito em camundongo (Immuno Star), diluído a 1:5.000, em PB, contendo 0,3% de Triton X-100 por 24-48 horas, a 4 °C. Nos casos de PHA-L, a pré-incubação com 2% de soro normal foi omitida e os cortes foram incubados diretamente com um anticorpo policlonal, anti-PHA-L, feito em coelho (DAKO), diluído a 1:5.000 em PB, contendo 0,3 Triton X-100 e 10% de leite desnatado por 24-48 horas a 4 °C. Os cortes foram lavados em PB e incubados por 2 horas no apropriado anticorpo secundário biotinizado purificado (anti-coelho, feito em cabra IgG, #BA-1000, Vector, com diluição: 1:200, para PHA-L), (anti-cabra, feito em burro #705-066-147, Jackson, com diluição: 1:4.000, para CTb) e (anti-camundongo, feito em burro, Vector, com diluição: 1:200, para TH). Os cortes foram lavados novamente, seguidos por 2 horas de incubação em um complexo AB (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Após este período e novas lavagens em PB, o produto de reação com peroxidase foi revelado, utilizando o procedimento de glicose oxidase de Itoh et al. (1979) e o metal-livre 3,3'-diaminobenzidina (DAB) tetraidroclorido como cromógeno. Para detalhes adicionais sobre a técnica utilizada, ver Shammah-Lagnado e Santiago (1999).

Para os casos selecionados de injeções de PHA-L na LHb, juntamente com as injeções de CTb na VTA, um protocolo de dupla imunoperoxidase foi usado para a detecção simultânea dos axônios marcados com PHA-L (PHA-L+) e corpos de neurônios positivos para CTb (CTb+). Os cortes foram primeiramente tratados com procedimentos de imunoistoquímica contra PHA-L, usando o método níquel de intensificação de Hancock (1986), seguidos por procedimentos de imunoistoquímica para CTb, usando o protocolo de glicose oxidase, como descrito acima e o metal-livre DAB como cromógeno. Para os casos selecionados de injeções de PHA-L no

RMTg, outro protocolo de dupla imunoperoxidase foi usado para a detecção simultânea dos axônios marcados com PHA-L (PHA-L+) no complexo VTA-negra, juntamente com neurônios imunoreativos para tirosina hidroxilase (TH+). Primeiramente, os cortes foram tratados com procedimentos de imunoistoquímica contra PHA-L, usando o método níquel de intensificação de Hancock (1986), seguido por procedimentos de imunoistoquímica para TH, usando o protocolo de glicose oxidase, como descrito acima e o metal-livre DAB, como cromógeno.

Por fim, os cortes foram novamente lavados em PB, montados em lâminas gelatinizadas, secos e mergulhados por 20 segundos em solução contendo 0,05% de ósmio tetróxido, desidratados através de uma série de concentrações ascendentes de alcoóis, transferidos para solução xileno por um período mínimo de 30 minutos e cobertos com lamínula, utilizando o DPX (Sigma) como meio de montagem.

3.7 Marcações por Imunofluorescência

Os procedimentos de imunofluorescência foram realizados em cortes com livre flutuação. Os cortes foram primeiramente pré-tratados, como descrito acima e então incubados por 72 horas a 4 °C, em um coquetel com anti-corpos primários, anti-PHA-L, feito em coelho, com diluição 1:2.500 e anti-CTb, feito em cabra, com diluição 1:10.000, em PB, contendo 1% de soro normal de burro (NDS) e 0,3% de Triton X-100. Após lavagens em PB, os cortes foram incubados por 1 hora em outro coquetel contendo os anticorpos secundários, anti-coelho feito em burro, FITC-conjugado (Jackson Immunoresearch) e anti-cabra feito em burro, Texas Red-conjugado (Jackson Immunoresearch), ambos com diluição 1:200 em PB, contendo 1% de soro normal de burro (NDS). Finalmente, os cortes foram lavados 5 vezes seguidas em tampão Tris-HCL, 0,05 M, montados em lâminas gelatinizadas, secos e cobertos com lamínula, utilizando Slow-fade (Invitrogen), como meio de montagem e seladas com esmalte de unha. Vários grupos controles foram realizados, incluindo a omissão de um ou ambos os anticorpos primários, omissão de um dos anticorpos secundários e troca dos fluoróforos relacionados para os diferentes marcadores. Todos estes procedimentos controles resultaram na prevista marcação fluorescente simples ou nos casos de omissão de ambos os anticorpos primários, na ausência de marcação fluorescente.

3.8 Análises dos Dados

Os cortes marcados por imunoperoxidase foram examinados com iluminação de campo claro ou campo escuro e os cortes marcados por imunofluorescência foram examinados por epifluorescência, utilizando um microscópio Zeiss Axioimager A1 (Zeiss, Muechen, Alemanha). As fotomicrografias coloridas foram capturadas com uma câmera Zeiss AxioCam HRC (Zeiss). As imagens dos cortes marcados com dupla fluorescência foram capturadas e analisadas com o programa Axiovision (Zeiss), o qual permitiu a aquisição de imagens com vários canais separados de fluorescência, assim como a subsequente montagem dessas imagens. Alguns cortes selecionados, marcados por dupla imunofluorescência, foram analisados com microscópio de leitura a laser confocal (Zeiss, Goettingen, Alemanha), utilizando intervalos de aproximadamente 200 nm ao longo do eixo z.

A preparação das imagens e legendas foi realizada com o programa Adobe Photoshop (Versão 7,0; Adobe Systems Inc., Mountain View, CA), com apenas ajustes do equilíbrio de cores, contraste e brilho. O programa Canvas (ACD Systems, Victoria, Canada, Version 9,0) foi utilizado para plotagem dos desenhos e esquemas.

A nomenclatura utilizada no presente estudo, com poucas exceções, foi baseada no Atlas de (PAXINOS; WATSON, 2007). Optamos pelo termo RMTg, como foi primeiramente definido por (JHOU et al., 2009a, b). Por razões mais detalhadas na discussão, consideramos a estrutura denominada em trabalhos anteriores, como “*retroVTA*”, Scamell et al. (2000), “cauda posterior da VTA”, Kaufling et al. (2009) e Perrotti et al. (2005), ou “polo caudal da VTA”, Ferreira et al. (2008), como uma parte integral do RMTg. Para especificar a posição exata dos neurônios CTb+ e os locais de injeções na LHb, aderimos a nomenclatura de Andres, Von During e Veh (1999) para os diferentes subnúcleos do complexo LHb (ver também, GEISLER; ANDRES; VEH, 2003). De acordo com estes autores, a LHb pode ser dividida em uma região medial (LHbM) e outra lateral (LHbL), cada uma, subdividida também, por razões morfológicas e citoarquitetônicas, em 5 subnúcleos distintos (ver Figura. 4E de GEISLER; ANDRES; VEH, 2003).

4 RESULTADOS

4.1 Experimentos de Rastreamento Retrógrado

4.1.1 Projeções do RMTg para a VTA

As injeções de CTb na VTA foram tipicamente depositadas na parte rostral e lateral do PBP. (Fig. 1A). Algumas injeções foram confinadas neste núcleo, enquanto outras, também envolveram o PN ou a região dorsal da SNc. As injeções muito pequenas na VTA, que resultaram em fraca marcação no tegmento mesopontino e as injeções maiores na parte caudal do PBP, as quais invadiram o RMTg ou o IP, foram descartadas das análises. De 14 animais que receberam injeções simples de CTb na VTA, 8 casos foram selecionadas para as análises e 2 casos foram selecionados como protótipos (R696 e R70). Nesses casos, observamos um padrão de marcação retrógrada muito consistente em várias estruturas do tegmento mesopontino, incluindo o RMTg, DR e MnR, a substância cinzenta periaquedutal e o PPTg. A distribuição da marcação retrógrada após a grande injeção representativa de CTb na VTA (caso R696; Fig.1), está ilustrada na Figura 2. Foi identificado densa marcação bilateral no RMTg, com marcação ipsilateral, maior que o componente contralateral. Os neurônios CTb+ no RMTg estenderam-se desde aproximadamente 6,4 mm até 7,6 mm posteriores ao bregma, estando associados em todos os níveis rostro-caudais, com fibras de cruzamento do pedúnculo cerebelar superior (xscp). Em níveis rostrais, o RMTg se mostrou nítido em secções coronais, apresentando-se na forma esférica, localizado imediatamente dorsal à borda dorso-medial do lemnisco medial e dorso-lateral à metade caudal do IP. (Figs. 1B, 2B, C). Neste nível, a maioria dos neurônios CTb+ no RMTg ocuparam uma posição ventral às fibras de cruzamento do pedúnculo cerebelar superior. Estendendo-se para a região caudal, o feixe de neurônios CTb+ no RMTg se deslocou em direção dorsal e a maioria deles, agora situaram-se em meio as fibras da decussação do pedúnculo cerebelar superior (Figs. 1C, 2D, E). Ainda, situados na região mais caudal, a aproximadamente 7 mm posteriores ao bregma, os neurônios CTb+ no RMTg ocuparam uma extensão médio-lateral mais extensa e a forma do aglomerado neuronal, agora se apresentou mais parecido ao formato de um "c" discreto, do que a de uma esfera ou uma bola (Fig, 2F). No polo caudal do

RMTg, os neurônios CTb+ se espalharam e progressivamente se fundiram com os neurônios CTb+ do PPTg (Fig. 2G, H). Nesses níveis, a maioria dos neurônios CTb+ no RMTg ocuparam, mais uma vez a região ventral das fibras de cruzamento do pedúnculo cerebelar superior. Deve-se salientar que as injeções na VTA, localizadas na região medial à apresentada na Figura 1, resultou em menos neurônios CTb+ no RMTg, localizados com predomínio na parte medial desse núcleo.

Figura 1 - Fotomicrografia de um local de injeção de CTb na área tegmental ventral (VTA) e a marcação retrógrada no núcleo tegmental rostromedial (RMTg).

Legenda: Fotomicrografia de um local de injeção de CTb representativa, centrada no subnúcleo pigmentado parabraquial (PBP) da área tegmental ventral (VTA - **A**) e da marcação retrógrada resultante dessa injeção em um nível rostral (**B**) e central (**C**) do núcleo tegmental rostromedial (RMTg). Para outras abreviações, ver a lista. Escala das barras: **A** = 250 μ m; **B-C** = 200 μ m.

Figura 2 - Desenhos esquemáticos de um local de injeção de CTb na VTA e a marcação retrógrada na região do tegmento mesopontino.

Legenda: A-H Desenhos esquemáticos de um local de injeção de CTb na VTA rostral (A) e a marcação retrógrada resultante em cortes frontais (B-H) na região do tegmento mesopontino. Os cortes estão apresentados em uma sequência rostro-caudal e cada ponto representa cerca de dois neurônios marcados retrógradamente. Notar a relação anatômica do RMTg (indicado pela área delimitada em cinza), com as fibras da decussação do pedúnculo cerebelar superior (xscp). Para abreviações, ver a lista.

4.2 Experimentos de Rastreamento Anterógrado

4.2.1 Projeções do RMTg para a VTA

A densa inervação do RMTg sobre o complexo VTA-negra e também na região do RRF foi confirmada e ilustrada em 3 casos de injeções de PHA-L no RMTg (R85, R86 e R87). Os 3 casos apresentaram injeções de PHA-L, envolvendo em diferentes graus, o RMTg. O caso R86, com injeção grande, mas perfeitamente restrita ao RMTg foi utilizado como protótipo para ilustrar o local de injeção de PHA-L no RMTg (R86, Fig. 3. C), assim como a rica distribuição de axônios marcados com PHA-L no complexo VTA-negra e também na região do RRF. Todos os grupamentos dopaminérgicos do complexo VTA-negra e RRF, ao longo do eixo rostro-caudal, apresentaram densa marcação anterógrada para PHA-L. Os resultados de dupla imunoperoxidase, claramente indicam que a inervação do RMTg é sobre os neurônios dopaminérgicos do complexo VTA-negra e RRF (Fig. 3. A, B e C).

Figura 3 - Fotomicrografias em campo escuro e campo claro mostrando a inervação do RMTg sobre os grupos de neurônios dopaminérgicos do complexo VTA-negra e campo retrorubral.

Legenda: A-C: Fotomicrografias em campo escuro mostrando a inervação do RMTg sobre os grupos de neurônios dopaminérgicos do complexo VTA-negra e campo retrorubral (RRF) em três níveis rostro-caudais. O local de injeção de PHA-L no RMTg é mostrado em C. A'-C': Fotomicrografias em campo claro em maior aumento de axônios PHA-L+ (produto da reação preto) contatando corpos e dendritos de neurônios TH+ (produto da reação marrom). Escala das barras: A-C = 300 μ m; A'-C' = 20 μ m.

4.2.2 Projeções da LHb para o tegmento mesopontino

Devido ao aumento de evidências esclarecendo que a LHb contém distintas subdivisões, Andres, Von Doring e Veh (1999) e Geisler, Andres e Veh (2003), que podem dar origem a diferentes vias de processamento de informações do prosencéfalo para os grupos de células monoaminérgicas do mesencéfalo e tegmento mesopontino, Kim (2009) e Kowski et al. (2008), injeções de PHA-L foram realizadas em diferentes locais, ao longo do eixo médio-lateral da LHb. De 13 injeções de PHA-L depositadas na LHb, 7 foram restritas na LHb e não invadiram os limites da habénula medial (MHb). As 6 injeções restantes, localizadas no tálamo, foram descartadas das análises ou serviram como casos controles. A maioria dos locais de injeções de PHA-L na LHb apresentaram aparência semelhante, com denso centro contendo pequeno e variável número de neurônios impregnados com PHA-L marcados, rodeados por um halo difuso. Três casos de injeções restritas na LHb foram escolhidas como protótipos para ilustrar os resultados (R81, R82 e R77), (Fig. 4). O caso R81 teve uma pequena injeção centralizada na região medial (Fig. 4A), o caso R82 teve uma grande injeção envolvendo o terço central e lateral (Fig. 4B) e no caso R77 a injeção foi confinada na região ventrolateral da LHb (Fig. 4C). Nos casos R77 e R82, as injeções envolveram partes dos núcleos talâmicos centrolateral e mediodorsal. Devido a essas injeções controles em distritos talâmicos não terem resultado em marcação anterógrada no RMTg, esses dois casos foram aproveitados. Em todos os casos analisados, a marcação de PHA-L no mesencéfalo e tegmento mesopontino foi bilateral, após injeções na LHb, com menos axônios visíveis no hemisfério contralateral. Como descrito a pouco tempo atrás no estudo de mapeamento anterógrado de Kim (2009), o qual ainda não reconheceu o RMTg como uma entidade separada, identificamos que as projeções da LHb para o tegmento mesopontino estão organizadas de maneira altamente topográfica.

Figura 4 - Fotomicrografias dos locais de injeções de PHA-L em diferentes regiões da LHb.

Legenda: Fotomicrografias dos locais de injeções de PHA-L centradas na região medial (R81; **A**), no subnúcleo magnocelular (caso R82; **B**) e subnúcleo oval (caso R77; **C**) da habênula lateral (LHb), de acordo com a organização subnuclear da habênula, como ilustrada em corte marcado com tionina, método de Nissl (**D**) e esquema da delineação dos subnúcleos da LHb (**E**), modificado de Geisler et al. (2003). Os pontos brancos em **A**, **B** e **C** indicam a posição dos neurônios impregnados com PHA-L, marcando a região central dos locais de injeções. Para abreviações, ver a lista. Escala das barras: **A-C** = 300 μ m; **D** = 250 μ m.

Após a injeção de PHA-L centralizada na região medial da LHb, envolvendo os subnúcleos central, parvocelular e marginal da LHbM (caso R81; Fig. 4A), a marcação anterógrada no tegmento mesopontino se mostrou, em sua maioria, restrita às estruturas medianas e paramedianas. Estas estruturas incluem o IP (Fig. 5A), o MnR, DR (Figs. 5A, 7D, E) e o PMnR, enquanto, apenas esparsos terminais marcados foram encontrados na região lateral, adjacente ao RMTg. Vários campos terminais proeminentes foram encontrados por toda a extensão rostro-caudal do MnR e em menor grau, no núcleo paramediano da rafe (Figs. 5A, A'', 7D). Pouquíssimos axônios e terminais PHA-L+ foram encontrados no DR. Uma marcação proeminente de PHA-L semelhante a terminais no DR se apresentou apenas em sua região caudal (Fig. 6A). Em contraste, apenas poucos axônios PHA-L+ foram detectados na região rostral do DR (Fig. 7D). Além disso, o IP apresentou um proeminente campo terminal no subnúcleo intermédio (Figs. 5A, 7C).

Em contraste, a grande injeção de PHA-L do caso R82 (Fig. 4B), centralizada no subnúcleo magnocelular da LHbL, envolvendo o terço central e lateral da LHb, sem contaminar o terço medial, resultou em marcação terminal proeminente no RMTg e núcleo paramediano da rafe. Diferente do caso R81, consideravelmente, menos axônios e terminais PHA-L+ foram encontradas ao longo da linha mediana, no IP, na região caudal do DR e no MnR (Figs. 5B-B'', 6B). Um proeminente campo terminal contendo muitos axônios com botões sinápticos e ramificações terminais foi observado no RMTg (Figs. 5B-B'', 6C, C', 7C',D',8B). Nos níveis rostrais do RMTg, este campo terminal demonstrou um aparência esférica (Fig.5B,6C), enquanto na região caudal, este campo terminal se deslocou em direção dorsal e ocupou uma extensão médiolateral mais ampla (Figs. 5B',B'', 7D'). A marcação terminal de PHA-L localizada no RMTg foi visualizada até aproximadamente 7,5 mm posterior ao bregma. Ainda, na região caudal, muitas fibras marcadas com PHA-L, se espalharam da região central do RMTg e alguns terminais foram encontrados na área tegmental dorsomedial (DMTg) (Fig. 6B).

Por fim, as injeções centralizadas no subnúcleo oval, envolvendo a parte lateral do subnúcleo magnocelular da LHbL (exemplificado pelo caso R77; Fig. 4C), resultaram em menor marcação anterógrada no RMTg, com a maior parte de terminais marcados com PHA-L no RMTg, restritos em sua região lateral (Fig. 5C-C''). Além disso, poucas fibras marcadas com PHA-L e terminais foram encontrados no núcleo paramediano da rafe e as estruturas situadas na linha mediana, como o IP, MnR e DR, não apresentaram marcação. Na região caudal, pouquíssimas fibras marcadas com PHA-L foram identificadas nas proximidades da parte ventral do LDT e menos ainda no PPTg (Não ilustrado).

Figura 5 - Fotomicrografias ilustrando a marcação anterógrada no tegmento mesopontino após injeções de PHA-L na LHb.

Legenda: A-C'': Fotomicrografias ilustrando a distribuição da marcação anterógrada após injeções de PHA-L no terço medial (R81; A-A''), no subnúcleo magnocelular (R82; B-B'') e subnúcleo oval (R77; C-C'') da LHb em três níveis rostro-caudais, sucessivos através do tegmento mesopontino. Note a clara topografia das projeções da LHb. A imagem inserida em A', ilustra campos terminais focais marcados com PHA-L no núcleo mediano da rafe (MnR). Os respectivos locais de injeções estão ilustrados na figura 4. Para abreviações, ver a lista. Escala das barras: A-C'' = 500 µm e 10 µm para a imagem inserida em A'.

Figura 6 - Fotomicrografias ilustrando a distribuição da marcação anterógrada no tegmento mesopontino após injeções de PHA-L na LHb.

Legenda: Fotomicrografias ilustrando a distribuição de marcação anterógrada no tegmento mesopontino após injeções de PHA-L, localizadas no terço medial (R81; **A**) e no subnúcleo magnocelular (R82; **B**) da LHb. **A, B:** Marcação anterógrada ao nível caudal do núcleo dorsal da rafe (DRC). Note o padrão complementar de marcação anterógrada nestes dois casos. Enquanto no caso R81, robusta marcação anterógrada foi encontrada no DRC e MnR, estas regiões estiveram amplamente ausente de marcação no caso R82. **C-D:** Marcação anterógrada ao nível do polo rostral do RMTg. Note que os axônios marcados na parte caudal da VTA demonstraram características de fibras de passagem (**C, imagem inserida**), enquanto aqueles no RMTg, exibiram numerosos botões sinápticos e ramificações terminais (**D**). As setas indicam os mesmos axônios em menor e maior aumento (**imagem inserida**) e as cabeças das setas destacam as ramificações terminais (**D**). Para abreviações, ver a lista. Escala das barras: A-C = 500 µm; **D e imagem inserida em C** = 100 µm.

Em todos os casos que receberam injeções de PHA-L na LHb, proeminente marcação de PHA-L também pode ser observada na VTA (Fig. 7, 8). Entretanto, a marcação de PHA-L na VTA não se apresentou proeminente e semelhante a terminais, comparada a marcação no RMTg (comparar figuras 8A, C com 8B, D). Assim, em contraste com a aparência muito varicosa de axônios marcados no RMTg, a maioria dos axônios marcados com PHA-L na VTA, demonstraram características morfológicas sugestivas de fibras de passagem, ou seja, elas se apresentaram pouco ramificadas, exibiram poucas varicosidades e na maioria das vezes estavam organizados em feixes. A característica não varicosa predominante dos axônios da LHb na VTA tornou-se particularmente evidente nos casos de injeções de PHA-L na LHbL, que consistentemente resultou em marcação anterógrada mais intensa na VTA do que as injeções confinadas na LHbM. Assim, após injeções centrais e laterais na LHb, alta densidade de fibras PHA-L+ foram detectadas na VTA rostral ao longo do feixe do fascículo retroflexo e no subnúcleo paranigral (Fig. 7A'). Em níveis mais caudais da VTA, a marcação de PHA-L no PN persistiu e um proeminente feixe de fibras marcadas pôde ser observado na parte lateral do PBP (Fig. 7B',C', 8A). Muitas fibras não varicosas neste fascículo pareciam continuar na direção caudal da VTA (Fig. 6C).

Após as injeções na LHbM, a marcação de PHA-L na VTA foi mais densa no PN, com pequena e fraca marcação no IF e PBP (Fig. 7A-C). Em todas essas sub-regiões da VTA, alguns axônios varicosos PHA-L+ também foram observados. Além disso, todas as injeções feitas na LHb resultaram em escassa marcação anterógrada na SNc.

Figura 7 - Desenhos esquemáticos ilustrando a real distribuição das fibras marcadas anterogradamente na VTA e tegmento mesopontino após injeções de PHA-L na LHb.

Legenda: A-E': Desenhos esquemáticos obtidos a partir de cortes frontais ilustrando a real distribuição das fibras marcadas anterogradamente na VTA e tegmento mesopontino após injeções de PHA-L nas regiões medial (R81; A-E) e lateral (R82; A'-E') da LHb. Os cortes estão apresentados em uma sequência rostro-caudal e os respectivos locais de injeções foram demonstrados na Figura 4. Para abreviações, ver a lista.

Figura 8 - Fotomicrografias ilustrando a distribuição e característica morfológica dos axônios PHA-L+ na VTA e no RMTg após injeção de PHA-L na LHb.

Legenda: A-D: Fotomicrografias ilustrando a distribuição e característica morfológica de axônios PHA-L+ na VTA (A, C) e no RMTg (B, D) após injeção de PHA-L no subnúcleo magnocelular (R82) da LHb. Note a característica não varicosa dos axônios da LHb na VTA (C e imagem inserida) enquanto os axônios no RMTg exibem extensivas ramificações e botões sinápticos sugestivos de um campo terminal (D e imagem inserida). As setas indicam os mesmos axônios em menor e maior aumento (imagem inserida) e as cabeças das setas, as ramificações terminais. Para abreviações, ver a lista. Escala das barras: A-B = 500 μ m; C-D = 100 μ m e para as imagens inseridas = 20 μ m.

4.3 Experimentos de Rastreamento Retrógrado

4.3.1 Projeções da LHb para o RMTg e VTA

Para confirmar se o RMTg recebe projeções topográficas e organizadas da LHb, pequenas injeções de CTb foram realizadas no RMTg em outro grupo de animais. Além disso, o padrão de marcação retrógrada na LHb após as injeções no RMTg, foi comparado com injeções na VTA. No geral, os experimentos retrógrados permitiram uma caracterização mais precisa sobre a origem subnuclear dos neurônios da LHb que se projetam para o RMTg e VTA. De um total de 6 injeções de CTb no RMTg, 3 casos (R61, R62, R64) foram restritos e resultaram em uma robusta marcação retrógrada bilateral na LHb, com menor quantidade de neurônios marcados no componente contralateral. A marcação retrógrada após esses 3 casos, bem como de 2 casos representativos (R696, R70), que receberam injeções de CTb na VTA, foram ilustrados nas figuras 9 e 10. Embora os neurônios CTb+ tenham se espalhado por todos os subnúcleos da LHb, o padrão observado nesses casos confirmou a organização topográfica das projeções da LHb, detectados pelo rastreamento anterógrado da LHb. Os resultados dessas abordagens retrógradas revelaram que o RMTg principalmente recebe projeções dos subnúcleos pertencente a LHbL, enquanto a VTA é principalmente inervada pelos subnúcleos da LHbM.

Após injeção muito pequena de CTb, restrita ao RMTg (R62; Fig. 9A), grande parte dos neurônios marcados na LHb foram restritos aos subnúcleos magnocelular e oval da LHbL (Figs. 9A', 10A', A''). Além disso, na região rostral, poucos neurônios CTb+ foram observados no subnúcleo anterior da LHbM (Fig. 10A). No caso R61, uma grande injeção foi depositada na região medial do RMTg, envolvendo na região caudal, partes do núcleo paramediano da rafe (Fig. 9B). Mais uma vez, a maior parte dos neurônios CTb+ foram encontrados no núcleo magnocelular e, em menor grau, no subnúcleo oval da LHbL. No entanto, a marcação retrógrada no subnúcleo magnocelular se deslocou em direção medial (Fig. 9B') e mais neurônios CTb+ do que no caso R62 foram agora, também encontrados nos subnúcleos que pertencem a LHbM, tais como, os subnúcleos central, parvocelular e anterior (Fig. 10B''). Finalmente, o caso que a injeção de CTb no RMTg foi centrada em sua região lateral e caudal (R64, Fig. 9C), comparada ao caso R61, a marcação de CTb na LHb se deslocou em direção lateral, com muitos neurônios CTb+ situados na região lateral

do subnúcleo magnocelular e no subnúcleo oval. Um agrupamento de neurônios CTb+ na LHbL foram observados nos níveis caudais da LHb (Figs. 9C', 10C''). Com exceção ao subnúcleo anterior, poucos neurônios CTb+ foram encontrados em outros subnúcleos da LHbM.

Por outro lado, as injeções na VTA, consistentemente resultaram em mais neurônios CTb+ em subnúcleos da LHbM, comparados a LHbL. Assim, os subnúcleos parvocelular e central da LHbM foram em todos os casos, intensamente marcados após as injeções na VTA. Uma pronunciada aglomeração de neurônios CTb+ no subnúcleo parvocelular se tornou particularmente óbvia no caso R70, na qual a injeção de CTb principalmente envolveu o subnúcleo paranigral da VTA (Fig. 9E,E'). Neste caso, o deslocamento medial da marcação retrógrada após as injeções na VTA foi observado também no subnúcleo anterior da LHbM (Fig. 10E). Por outro lado, as injeções, principalmente envolvendo a parte lateral do PBP da VTA, resultou em um deslocamento lateral da marcação retrógrada na LHb (não ilustrado). Além disso, as injeções no RMTg, bem como na VTA, resultaram em neurônios CTb+ espalhados no segmento inicial do fascículo retroflexo e nos núcleos paraventricular e mediodorsal do tálamo.

Figura 9 - Fotomicrografias dos locais de injeções de CTb no RMTg e na VTA e a marcação retrógrada na LHb.

Legenda: A-E': Fotomicrografias dos locais de injeções de CTb no RMTg (A-C) e na VTA (D e E) e da marcação retrógrada resultante (A'-E') na LHb. A: Injeção muito pequena no RMTg (R62). B: Injeção na região medial do RMTg (R61). C: Injeção na região lateral do RMTg (R64). D: Injeção no núcleo pigmentado parabraquial da VTA (PBP) (R696). E: Injeção envolvendo o subnúcleo paranigral (PN) da VTA (R70). Note a ausência de marcação retrógrada na habênula medial (MHb). Para abreviações, ver a lista. Escala das barras: A-E = 1000 µm; A'-E' = 300 µm.

Figura 10 - Plotagem das origens das projeções da LHb para o RMTg e VTA.

Legenda: A-E'': Desenhos esquemáticos obtidos a partir de cortes frontais ilustrando a real distribuição dos neurônios CTb+ em três níveis rostro-caudais através da LHb após injeções de CTb no RMTg (R62, R61, R64) ou na VTA (R696, R70), respectivamente. Note que o RMTg é innervado por neurônios principalmente localizados na região lateral da LHb, enquanto a VTA está principalmente innervada por neurônios da região medial da LHb. Cada ponto representa um neurônio CTb+. Para abreviações, ver a lista.

4.4 Experimentos combinados de rastreamento retrógrado e anterógrado

Para testar se os axônios marcados com PHA-L, que se originam da LHb, são encontrados na mesma posição topográfica que os neurônios marcados com CTb, após injeções na VTA e se esses axônios apresentam aposições com neurônios no RMTg, ambos os traçadores foram injetados no mesmo animal e o resultado da marcação foi revelado usando a técnica de imunistoquímica de dupla imunoperoxidase ou dupla imunofluorescência. Dos 13 animais que receberam injeções de PHA-L na LHb (descrito anteriormente), 8 também tiveram injeções de CTb na VTA. Em 3 casos (R71, R77, R82), todas as injeções foram confinadas em suas respectivas regiões alvos e demonstraram transporte satisfatório de ambos os traçadores. Nesses casos houve importantes aposições na distribuição de neurônios CTb+ e fibras PHA-L+ no RMTg, com numerosos terminais axônicos PHA-L+, formando aposições com corpos neuronais e dendritos CTb+ (Fig. 11). Os terminais axônicos PHA-L+ foram principalmente marcados na região central do RMTg e se estenderam por uma distância rostro-caudal muito semelhante ao grupamento dos neurônios CTb+, após as injeções na VTA. O caso R82, que recebeu uma grande injeção de PHA-L, centrada no subnúcleo magnocelular da LHbL e uma grande injeção de CTb, envolvendo o PBP da VTA, grande parte da região central do RMTg foi preenchida por terminais axônicos PHA-L+ e neurônios CTb+, ficando claro que ambos os marcadores foram eficientes para registrar as aposições (Fig. 12). No entanto, as partes dorso-mediais do RMTg foram pouco inervadas por axônios PHA-L+, com numerosos neurônios CTb+ (Figs. 11A, 12A-D). Na região caudal, muitos neurônios CTb+ foram encontrados em meio as fibras da decussação do pedúnculo cerebelar superior, dorsal a região central do RMTg, marcado com PHA-L (Fig. 12B,D). A parte ventral do RMTg caudal foi preenchido por axônios PHA-L+ e não apresentou neurônios CTb+ (Fig. 11D).

Nos 2 casos restantes, a injeção de PHA-L foi centrada na região lateral da LHb e como observado no material de imunoperoxidase, axônios PHA-L+ no RMTg foram agora marcados principalmente na parte lateral do RMTg. Apesar disso, várias aposições de axônios PHA-L+ com neurônios CTb+ foram observadas nesses dois casos, na parte lateral do RMTg, onde ambos os traçadores foram co-localizados.

Figura 11 - Fotomicrografias ilustrando as aposições da inervação da LHb sobre os neurônios do RMTg que enviam projeções para a VTA.

Legenda: A-D: Fotomicrografias em menor e maior aumento após marcações de dupla imunofluorescência (A-C) ou dupla imunoperoxidase (D) para axônios PHA-L+ (fluorescência verde ou o produto da peroxidase em preto) e corpos celulares CTb+ (fluorescência vermelha ou produto da peroxidase em marrom) no RMTg. A marcação para PHA-L após grande injeção no subnúcleo magnocelular da LHb (R82) e a marcação de CTb após grande injeção na VTA, localizada no PBP. Note que houve importantes sobreposições na distribuição de neurônios CTb+ e fibras PHA-L+ no RMTg, com numerosos terminais axônicos PHA-L+ formando aposições com corpos celulares e dendritos CTb+ (indicado pelas setas). Escala das barras: A = 100 μ m; B-D = 10 μ m.

Figura 12 - Plotagem ilustrando as aposições da inervação da LHb sobre os neurônios do RMTg que enviam projeções para a VTA.

Legenda: A-D: Desenhos esquemáticos ilustrando a distribuição dos axônios PHA-L+ e neurônios CTb+ na região do RMTg no caso R82, que recebeu injeção de PHA-L no subnúcleo magnocelular da LHbL junto com injeção de CTb, envolvendo principalmente o subnúcleo pigmentado parabraquial da VTA. Os cortes estão apresentados em sequência rostro-caudal. Os quadrados pretos representam neurônios marcados retrogradamente e as linhas pontilhadas, a linha mediana. Note que todos os neurônios CTb+ foram representados, enquanto a densidade de axônios marcados com PHA-L foi ajustada para não obscurecer a marcação retrógrada. Para abreviações, ver a lista.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos sistematicamente as projeções do RMTg para a VTA, assim como as projeções da LHb para RMTg e a VTA. Um diagrama resumido dos resultados está demonstrado na figura 13. Os principais achados foram: 1) O RMTg é o principal campo terminal da LHb. 2) As projeções da LHb para o tegmento mesopontino estão organizados de maneira altamente topográfica, com projeções para o RMTg, principalmente se originando da LHbL, enquanto as projeções para a VTA e DR, predominantemente se originando da LHbM. 3) No RMTg, axônios varicosos originados da LHb, foram observados na mesma posição que os neurônios marcados retrogradamente após injeções de CTb na VTA, com esses axônios, formando frequentes aposições com os neurônios CTb+. Os resultados serão discutidos com referência aos achados anteriores sobre a expressão de genes de expressão imediata, estudos com traçadores neuronais e com referências ao papel funcional do RMTg, como uma interface entre a LHb e os grupamentos de células monoaminérgicas do tegmento mesopontino.

Figura 13 - Diagrama esquemático ilustrando as principais conexões aferentes e eferentes da habênula e os principais achados do presente estudo.

Legenda: Diagrama esquemático das principais conexões aferentes e eferentes da habênula. Este diagrama está baseado nos resultados obtidos no presente estudo (linhas sólidas) e dados da literatura (linhas pontilhadas). Note que o diagrama está simplificado. Portanto, muitas conexões retratadas são recíprocas e existem ricas interconexões entre muitas estruturas mesopontinas e mesencefálicas incluídas no diagrama. Por razões didáticas, estas conexões não foram demonstradas. Esquema adaptado de (HIKOSAKA et al., 2008). Para abreviações, ver a lista.

5.1 Considerações Metodológicas

Uma limitação natural para a interpretação dos resultados é o potencial de captação e transporte dos traçadores neuronais retrógrados e anterógrados por fibras de passagem lesadas passando pelos locais de injeções (CHEN; ASTON-JONES, 1995; CLIFFER; GIESLER, 1988; DADO et al., 1990). A necrose acentuada no local de injeção tem sido considerada como a principal causa de captação do traçador por fibras de passagem (DADO et al., 1990; LUPPI et al., 1995). Assim, no presente estudo, PHA-L e CTb foram injetados iontoforese, utilizando corrente pulsada para minimizar o desenvolvimento de calor e consequente dano tecidual próximo as pontas das pipetas (LUPPI; FORT; JOUVET, 1990; WOUTERLOOD; GOEDE; GROENEWEGEN, 1990). Visto que as nossas injeções de traçador focaram estruturas atravessadas ou quase associadas com feixes de fibras, como a VTA, RMTg e LHb, estas podem estar propensas a ocorrência de captação por fibras lesadas. Entretanto, não encontramos evidências que a captação por fibras de passagem tenha afetado os principais resultados do presente estudo. No geral, os dados anterógrados sobre as projeções da LHb para a VTA e RMTg estão de acordo com os estudos anteriores que utilizaram traçadores anterógrados, Araki, Mcgeer e Kimura (1988), Herkenham e Nauta (1979), Jhou et al. (2009b), Kim (2009) e Omelchenko, Bell, Sesack (2009) e foram em grande parte, suportado pelo padrão de marcação retrógrada na LHb, após injeções de CTb nessas estruturas. Todavia, não podemos excluir que alguma captação de PHA-L ou CTb tenha ocorrido por fibras de passagem lesadas.

Um desafio do presente estudo foi depositar pequenas injeções em estruturas próximas, como a VTA e o RMTg. Assim, especial cuidado foi tomado para obter pequenos depósitos do traçadores nessas estruturas. O padrão diferenciado de marcação retrógrada na LHb após injeções de CTb na VTA e RMTg indicam que a tentativa de depósitos de injeções em regiões próximas foi bem sucedida.

Outra limitação metodológica óbvia foi a atribuição exata de nossas injeções de PHA-L a distintos subnúcleos do complexo LHb. Nenhuma das injeções de PHA-L situadas no complexo LHb foram pequenas o suficiente para estarem confinadas a um dos 10 subnúcleos (ANDRES; VON DURING; VEH, 1999; GEISLER; ANDRES; VEH, 2003). Assim, muitas vezes foi impossível decidir se apenas um ou vários subnúcleos contribuem para o padrão resultante de marcação anterógrada no

tegmento mesopontino (KIM, 2009). Da mesma forma, consideramos nossas tentativas de atribuir neurônios CTb+ às vezes duvidosos após injeções de CTb na VTA ou RMTg para os distintos subnúcleos da LHb, sem uma contra-coloração por métodos imunistoquímicos e ou histoquímicos. No entanto, esta abordagem ofereceu informações valiosas sobre quais subnúcleos da LHb fornecem mais projeções para a VTA e RMTg, e em grande parte, validou os dados anterógrados do presente estudo.

5.2 Localização topográfica do RMTg

Nos experimentos de rastreamento neuronal, tentamos especificar a exata posição topográfica do RMTg, explorando em detalhes duas de suas principais características anatômicas descritas, como uma projeção muito robusta para o complexo VTA-negra, Ferreira et al. (2008), Geisler et al. (2008), Jhou (2005), Jhou et al. (2009a, b), ver a Figura 3 de Vertes e Martin (1988), bem como importantes projeções topográficas e organizadas da LHb (ARAKI; MCGEER; KIMURA, 1988; HERKENHAM; NAUTA, 1979; KIM, 2009). A estrutura, hoje conhecida como RMTg, a princípio, foi definida em estudos que examinaram a ativação da proteína Fos com psicoestimulantes (COLUSSI-MAS et al., 2007; GEISLER et al., 2008; JHOU et al., 2009a, b; KAUFLING et al., 2009; PERROTTI et al., 2005; SCAMMELL et al., 2000). No geral, os nossos resultados, sobre a localização topográfica do RMTg, estão de acordo com os resultados desses estudos de ativação da proteína Fos, ampliando esses achados em outros aspectos. É interessante notar que os nossos resultados indicam que a região central do RMTg também pode ser definida pela distribuição sobreposta de neurônios CTb+, após injeções na VTA e axônios PHA-L+, após injeções na LHb. Assim, a posição da maior parte dos neurônios CTb+ no RMTg após injeções de CTb na VTA e da maioria dos axônios PHA-L+ após injeções de PHA-L na LHb, apresentado no presente estudo, sem dúvida, corresponde a posição central do RMTg, delineado por neurônios marcados com Fos, ativados após a aplicação de psicoestimulantes em estudos anteriores (compare a Figura 5 de Geisler et al. (2008) com a Figura 2 do presente estudo). Dessa forma, como demonstrado anteriormente, os axônios da LHb no RMTg estão distribuídos de maneira co-existente com a imunoreatividade para a proteína Fos, induzida por metanfetamina (JHOU et al., 2009b).

Inicialmente, os neurônios marcados com a proteína Fos no mesencéfalo e tegmento mesopontino após tratamento com psicoestimulantes, foram descritos em uma população de células GABAérgicas no polo caudal da VTA, descrito como “retro VTA”, Scamell et al. (2000) ou “cauda posterior da VTA”, (PERROTTI et al., 2005). Em contraste, os estudos mais recentes demonstraram que psicoestimulantes, Geisler et al. (2008), Jhou et al. (2009b) e estimulação por choques, Jhou et al. (2009a), também induzem imunoreatividade a proteína Fos em uma região mais caudal de células GABAérgicas contínuas, Jhou et al. (2009b), Kaufling et al. (2009), que estende-se da região ventral do polo caudal da VTA para o interior do tegmento mesopontino. No geral, os nossos dados de rastreamento estão de acordo que o RMTg não é apenas uma extensão caudal da VTA, como assumido por Kaufling et al. (2009), mas sim, uma entidade separada do tegmento mesopontino, como proposto por (JHOU et al., 2009a, b). Considerando o limite caudal do RMTg, na direção caudal, encontramos ambas marcações retrógradas e anterógradas se tornando esparsas e difusas, com eferências da LHb, espalhando para fora do RMTg e neurônios CTb+ no RMTg, tornando-se misturados com neurônios situados em estruturas laterais e adjacentes, como o DTg. Essas observações estão de acordo com a visão de Jhou et al. (2009a), que distinguem uma parte compacta e outra difusa do RMTg, com a última se misturando em níveis caudais, com elementos do tegmento mesopontino.

5.3 Topografia das projeções da LHb para o tegmento mesopontino e VTA

Importantes projeções da LHb para o tegmento mesopontino, incluindo o RMTg, foram descritas em vários estudos anteriores (ARAKI; MCGER; KIMURA, 1988; HERKENHAM; NAUTA, 1979; JHOU et al., 2009b; KAUFILING et al., 2009; KIM, 2009). Devido a importância funcional das projeções da LHb para o RMTg, reexaminamos em detalhes essas projeções, utilizando métodos de rastreamento anterógrado e retrógrado. Além disso, incluímos a VTA em nossas análises para compararmos a intensidade e origem das projeções da LHb para a o RMTg com as projeções para VTA. No geral, muito dos nossos resultados, sobre as projeções da LHb para o tegmento mesopontino, estão de acordo com os dados dos estudos citados anteriormente, ampliando os achados anteriores, em vários outros aspectos. A principal e nova descoberta do presente estudo foi a descrição detalhada sobre a

topografia das projeções da LHb para o tegmento mesopontino e o notável achado que as projeções da LHb para o RMTg, quase exclusivamente, se originam da LHbL, enquanto aqueles para a VTA, principalmente se originam da LHbM. O caráter topográfico das projeções da LHb para o tegmento mesopontino foi primeiramente descrito no importante estudo de (HERKENHAM; NAUTA, 1979). Após injeções de aminoácidos radioativos em diferentes partes da LHb, estes autores já revelaram um importante aspecto chave das projeções da LHb para o tegmento mesopontino, ou seja, que as projeções para estruturas medianas, a princípio originam-se da LHbM, enquanto aquelas para estruturas paramedianas, incluindo uma proeminente projeção específica para o RMTg, origina-se da LHbL. Mais tarde, Kim (2009) ampliou esses resultados através de pequenas injeções de dextraminas biotinilados em diferentes partes da LHb. A evidente topografia médio-lateral das projeções da LHb para o tegmento mesopontino pode ser melhor reconhecida com a comparação dos nossos resultados, com os resultados do trabalho de (KIM, 2009). No geral, em ambos os estudos, as estruturas medianas foram o alvo preferencial das projeções da LHbM, enquanto as injeções centradas na LHbL, resultaram, com predomínio em marcações nas regiões laterais do tegmento mesopontino (ver também JHOU et al., 2009b). Em muitos aspectos, os nossos resultados e os de Kim são complementares. Por exemplo, no presente estudo, uma injeção medial, situada no centro da LHbM, resultou em marcação confinada no MnR e DR, enquanto uma injeção lateral de Kim (2009), resultou em marcação intensa e adicional no núcleo paramediano da rafe. Nos dois estudos, o RMTg foi marcado após injeções envolvendo o terço central e lateral da LHb. Entretanto, enquanto no estudo de Kim (2009), uma injeção central apenas marcou a parte medial do RMTg, uma de nossas injeções centrada lateral, marcou a maior parte do RMTg. Há discrepâncias comparando os nossos resultados com os resultados de Jhou et al. (2009b), no qual retrataram que de forma topográfica e ordenada, as projeções da LHb para o RMTg se originam de toda a LHb. Em contraste, os nossos dados anterógrados e retrógrados indicam que a LHbM contribui pouco para as projeções da LHb para o RMTg. Determinado a topografia detalhada das projeções da LHb para o tegmento mesopontino, como demonstrada aqui, esta discrepância pode ser devido ao maior tamanho das injeções feitas no RMTg e LHbM por (JHOU et al., 2009b). Assim, as injeções de FluoroGold feitas por Jhou no RMTg podem ter contaminado o núcleo paramediano da rafe, causando uma marcação retrógrada por toda a LHb (ver suas

Figuras 4I-K e 9A), enquanto as suas injeções de PHA-L na LHbM possam ter contaminado a LHbL, levando a uma marcação adicional na região medial do RMTg (ver suas Figuras 9E, F). Os nossos resultados sobre as projeções da LHb para o RMTg, com predomínio da LHbL, foram em grande parte, confirmados com os dados de rastreamento retrógrado. Ambos os nossos resultados de rastreamento anterógrado e retrógrado apontaram os subnúcleos magnocelular e oval da LHbL como as principais fontes de projeções para o RMTg, e além disso, que o subnúcleo oval, principalmente inerva o RMTg lateral, enquanto o subnúcleo magnocelular inerva a maior parte do RMTg. Tais observações estão de acordo com as análises das figuras dos estudos anteriores, demonstrando que o RMTg é o principal alvo, após injeções de traçadores envolvendo estes dois subnúcleos (ver Figura 9 de HERKENHAM; NAUTA, 1979 e Figura 9 de JHOU et al., 2009b). No entanto, os nossos resultados também indicam que outros subnúcleos da LHb, incluindo alguns da LHbM, contribuem, embora em menor escala, com projeções para o RMTg.

Comparando as projeções da LHb para a VTA, com as projeções para o RMTg, três conclusões principais foram extraídas dos nossos resultados. 1) As projeções da LHb para a VTA são mais modestas. 2) Enquanto os axônios da LHb no RMTg exibem extensivas ramificações e botões sinápticos sugestivos de um campo terminal local proeminente, os axônios marcados com PHA-L na VTA, são menos varicosos, consistindo principalmente de fibras de passagem. 3) Em contraste, as projeções da LHb para o RMTg, principalmente se originando da LHbL, e as projeções para a VTA, se originam principalmente da LHbM. Estas observações, em grande parte, estão de acordo com os resultados dos estudos anteriores. Assim, a posição e densidade das fibras marcadas anterogradamente na VTA descritas no presente estudo, são similares ao que foi descrito em estudos anteriores, que examinaram as projeções da LHb para a VTA (ARAKI; MCGEER; KIMURA, 1988; BRINSCHWITZ et al., 2010; HERKENHAM; NAUTA, 1979; OMELCHENKO; BELL; SESACK, 2009). A nossa observação sobre os axônios PHA-L+ na VTA, interpretados como fibras de passagem, estão de acordo com achados de recentes estudos ultraestruturais, que estimaram uma incidência sináptica muito menor de axônios da LHb na VTA, Omelchenko, Bell e Sesack (2009), comparado no RMTg (BALCITA-PEDICINO et al., 2011). No entanto, a observação de um modesto número de axônios da LHb, formando sinapses em neurônios GABAérgicos e dopaminérgicos da VTA, Brinschwitz et al. (2010),

Omelchenko, Bell e Sesack (2009), bem como o distinto padrão de marcação retrógrada na LHb após injeções na VTA ou RMTg, como descrito no presente estudo, indica que a VTA recebe projeções diretas da LHb. Vale ressaltar que, no presente estudo, muitos axônios da LHb na VTA e também no DR, demonstraram morfologia similar (axônios com aparência em linha reta em sua maioria, curtos colaterais e pouca ramificação terminal) ao que foi descrito por Geisler e Zahm (2005), ser característica das projeções para a VTA, originando de diferentes sítios, do assim chamado “cerne isodendrítico” (RAMÓN-MOLINER; NAUTA, 1966; SCHEIBEL; SCHEIBEL, 1958; ZAHM, 2006). Por outro lado, no RMTg e também no MnR, os axônios da LHb apresentaram claras características de um campo terminal local.

Com relação à origem subnuclear das projeções da LHb para a VTA, há pouca informação específica até o momento na literatura. Em perfeito acordo com os nossos achados, dois subnúcleos da LHbM, os subnúcleos parvocelular e central foram definidos, em resumo, ser a principal, mas não a fonte exclusiva das projeções da LHb para a VTA (DITTGEN et al., 2006). Está bem claro que a LHb está reciprocamente interconectada com a VTA e que a LHbM é o primeiro alvo da via meso-habenular (LI et al., 1993; PHILLIPSON; PYCOCK, 1982; SKAGERBERG; LINDVALL; BJORKLUND, 1984). É interessante notar que entre todos os núcleos da VTA, o PN foi descrito como a principal fonte dessa via (GRUBER et al., 2007). Supondo que nossos dados de rastreamento anterógrado apontam para o PN da VTA, como o principal alvo terminal da LHbM (em particular do subnúcleo parvocelular), isso abre a possibilidade intrigante de um circuito fechado VTA-LHbM-VTA, originando principalmente no PN. Embora, a existência de tal circuito fechado ainda deva ser explorado com estudos combinados de rastreamento anterógrado e retrógrado, uma possível função das projeções diretas da LHb para a VTA, pode ser, como proposto por Omelchenko, Bell e Sesack (2009), de regular a alça de retroalimentação entre a VTA e LHb.

Em resumo, os nossos dados de rastreamento neuronal corroboram com o conceito tradicional que a LHb pode ser diferenciada em uma região medial (LHbM) e uma região lateral (LHbL), dando origem a vias diferenciadas do processamento de informações do prosencéfalo para os grupamentos monoaminérgicos do mesencéfalo e tegmento mesopontino (HERKENHAM; NAUTA, 1979; LECOURTIER; KELLY, 2007). Em ratos, a LHbM é innervada por fibras provenientes

de muitas estruturas do prosencéfalo, incluindo o septo lateral, núcleo da banda diagonal, hipotálamo lateral, área pré-óptica lateral e núcleo entopeduncular (homólogo a região interna do globo pálido de primatas), enquanto a LHbL recebe projeções menos diversificadas e está dominada por projeções das partes rostrais e médio-rostrais do núcleo entopeduncular (ARAKI; MCGEER; KIMURA, 1988; HERKENHAM; NAUTA, 1977; KOWSKI et al., 2008; LECOURTIER; KELLY, 2007; LI et al., 1993; RAJAKUMAR; ELISECICH; FLUMERFELT, 1993). No entanto, as projeções dessas importantes fontes para as diferentes regiões da LHb devem ser reexaminadas com técnicas de rastreamento moderno, como feito no caso da área pré-óptica lateral (KOWSKI et al., 2008). De forma interessante, a atividade dos neurônios de projeções da LHb sobre a região interna do globo pálido de primatas, mostrou ser modulada por expectativas de recompensas, com a maioria deles excitados por estímulos relacionados à ausência de recompensas (HONG; HIKOSAKA, 2008). Determinado que a região interna do globo pálido forma a principal entrada da LHbL, Parent, Levesque e Parent (2001), que por sua vez é a principal fonte de projeções para o RMTg (resultados do presente estudo, Jhou et al. (1999b), Kaufling et al. (2009), é instigante especular que a LHbL, assim como o RMTg, podem estar envolvidos no processamento de informações relacionadas a recompensas, especificamente, com participação em eventos aversivos. Por outro lado, a LHbM, que recebe projeções de diversas fontes e se projeta diretamente para sistemas moduladores, como a VTA e núcleos da rafe, pode estar envolvida em funções integrativas mais amplas. Esta observação é suportada pela expressão de Fos em estudos com ratos, os quais demonstraram que a LHbM (especificamente os subnúcleos parvocelular e central), são ativados com predomínio por diferentes tipos de estresse, Sica et al. (2000), Wirtshafter, Asin e Pitzer (1994) e o início do comportamento maternal (LONSTEIN et al., 1998; MATTHEWS-FELTON et al., 1995). Por outro lado, a LHbL está mais propensa a manipulação farmacológica sistêmica do sistema dopaminérgico, Wirtshafter Asin e Pitzer (1994), um efeito que talvez é modulado de forma indireta por supressão dos neurônios no núcleo entopeduncular, pelo estriado dorsal (KOWSKI; VEH; WEISS, 2009).

5.4 Considerações Funcionais

Atualmente existem muitas evidências convincentes de que os neurônios da LHb, Matsumoto e Hikosaka, (2007, 2009) e também do RMTg, Hong et al. (2011), Jhou et al. (2009a) e Lecca et al. (2011, 2012), respondem a estímulos negativos e são excitados por estímulos aversivos, respostas negativas e a omissão de recompensas. Este padrão de resposta dos neurônios da LHb e RMTg é oposta a resposta dos neurônios dopaminérgicos da VTA que respondem com excitação fásica a estímulos de recompensa, estímulos apetitivos e estímulos que predizem recompensas (BROMBERG-MARTIN et al., 2010; SCHULTZ, 1998, 2007). De acordo com um papel chave da LHb em sinalizar estímulos aversivos, um recente estudo mostrou que a exposição a estímulos aversivos, assim como a estimulação optogénética da via LHb–RMTg resultam em ativação de neurônios do RMTg e inibem comportamentos de busca (STAMATAKIS; STUBER, 2012).

Os presentes achados anatômicos estão de acordo que o RMTg deveria ser o principal relé envolvido na sinalização de eventos aversivos para os neurônios dopaminérgicos da VTA (BALCITA-PEDICINO et al., 2011; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; HIKOSAKA, 2010). As frequentes aposições dos axônios da LHb com os neurônios do RMTg que se projetam para a VTA, observados no presente estudo, oferecem evidências claras para uma via bisínaptica que conecta a LHbL a VTA via o RMTg. Esses achados indicam que a ativação dos neurônios GABAérgicos do RMTg pode ser finalmente responsável pela poderosa influência inibitória, Christoph, Leonzio e Wilcox (1986), Ji e Shepard (2007), Matsumoto e Hikosaka (2007), da LHb sobre os neurônios dopaminérgicos da VTA. Os nossos resultados suportam e ampliam os achados do recente estudo ultraestrutural, que demonstrou: 1) axônios da LHb formam sinapses com dendritos GABAérgicos no RMTg e 2) a maioria das sinapses formadas por axônios do RMTg na VTA ocorre em neurônios dopaminérgicos (BALCITA-PEDICINO et al., 2011). Supondo que o traçador CTb forneça apenas uma marcação incompleta da árvore dendrítica e muito das sinapses formadas por axônios da LHb no RMTg foram em dendritos imunomarcados com GABA, Balcita-Pedicino et al. (2011), poderíamos ter subestimado o número de axônios da LHb que contatam dendritos em nosso material. Em virtude disto, torna-se indispensável investigar o padrão sináptico dos contatos dos axônios da LHb com neurônios do RMTg que se projetam para a VTA

em futuros estudos de microscopia eletrônica. Outro forte argumento para uma função relé do RMTg é que o efeito inibitório da estimulação da LHb sobre células dopaminérgicas pode, de forma similar, ser observado na SNc, que recebe ainda menos projeções diretas da LHb, comparado a VTA (nossos resultados; Araki, Mcgeer e Kimura (1988), mas é também muito inervada pelo RMTg (FERREIRA et al., 2008; JHOU et al., 2009a, b). Vale ressaltar que estímulos aversivos podem ser direcionados para o RMTg, não apenas através da LHb, mas também, direta ou indiretamente através de várias outras estruturas implicadas em aspectos distintos de respostas aversivas ou no comportamento de medo (JHOU, 2005; QUIRK; SOTRESS-BAYON, 2009). Assim, o RMTg recebe projeções diretas da substância cinzenta periaquedutal, córtex do cíngulo anterior, septo lateral e núcleo intersticial da estria terminal, Jhou et al. (2009b), Kaufling et al. (2009) e pode receber projeções indiretas do núcleo central da amígdala através da substância cinzenta periaquedutal ventral. No sentido de um papel integrativo do RMTg no processamento de informações aversivas, os resultados dos experimentos comportamentais indicam que os efeitos de lesões no RMTg, associam diferentes propriedades de lesões nas estruturas citadas acima (JHOU et al., 2009a).

Com relação as suas principais eferências, o RMTg pode constituir um nodo chave, pelo qual informações aversivas de múltiplas fontes é sinalizada, por um lado, para sistemas ascendentes modulatórios, como os grupamentos dopaminérgicos, serotoninérgicos e colinérgicos, ou para estruturas do tronco encefálico caudal envolvidas no controle motor (HOLSTEGE, 2009). Assim, adjacente a VTA e SNc, muitas projeções do RMTg são enviadas para o DR, PPTg e LDT. Além disso, o RMTg envia importantes projeções descendentes para uma região do tegmento ventromedial medular rostral, Jhou et al. (2009a, b), considerada um componente chave do sistema motor emocional, Holstege (1992), Holstege e Georgiadis (2004), que por sua vez, envia massivas projeções para todas as partes da medula espinal (HOLSTEGE, 2009; HOLSTEGE; KUYPERS, 1982). Supondo que o efeito modulatório do RMTg GABAérgico seja inibitório nestes sistemas de projeções, a supressão motora em condições aversivas, como discutido de forma convincente na recente revisão de Hikosaka (2010), pode ser o mecanismo chave por trás das diversas funções dos diferentes circuitos envolvendo a LHb e o RMTg. É interessante notar que funções como a supressão motora e controle comportamental foram atribuídos também a estruturas do tegmento mesopontino,

localizadas na região lateral e caudal do RMTg, como a recém descrita área de anestesia tegmental mesopontina, Devor e Zalkind (2001), Sukhotinsky et al. (2005) e o PPTg (WINN, 1998). No entanto, estas estruturas não recebem projeções diretas da LHb (resultados do presente estudo; KIM, 2009). Supondo que a supressão de ações motoras que levam a um resultado prejudicial seja fundamental para ignorar estímulos não salientes e prejudiciais, evitar punições e exibir uma flexibilidade comportamental adaptativa apropriada, Aston-Jones, Rajkowski e Cohen (2000), é possível acreditar que a LHb participe em muitas funções e condições patológicas (GEISLER; TRIMBLE, 2008; HIKOSAKA, 2010; HIKOSAKA et al., 2008; KLEMM, 2004; LECOURTIER; KELLY, 2007). Em particular, vários estudos realizados em animais, Amat et al. (2001), Caldecott-Hazard, Mazziotta, Phelps (1988), Shumake, Edwards e Gonzalez-Lima (2003), bem como estudos invasivos, Sartorius et al. (2010) e não invasivos em humanos, Morris et al. (1999), Shepard, Holcomb, Gold (2006), Ullsperger e Von Cramon (2003), apontam para um importante papel da LHb em mecanismos do estresse e depressão maior. De forma interessante, resultados recentes também implicam a LHb na aprendizagem do tipo esquiva, Shumake et al. (2010) e em processos de plasticidade neural induzido por cocaína em neurônios da VTA (FRIEDMAN et al., 2010). Visto que o RMTg é o campo terminal dominante da LHb e devido as suas ricas conexões com os grupos de células serotoninérgicas e dopaminérgicas, resultados do presente estudo, Balcita-Pedicino et al. (2011), Herkenham e Nauta (1979), Jhou et al. (2009a, b) e Kim (2009), é provável que o RMTg contribua para pelo menos algumas das funções atribuídas a LHb. No entanto, o seu papel em diferentes comportamentos e patologias deve ser desafiado em novos estudos explorando as funções específicas do RMTg (JHOU et al., 2009a; KAUFILING et al., 2010; LECCA et al., 2011, 2012). De forma interessante, os resultados de estudos recentes apontam um papel chave do RMTg na ação de opióides. Receptores de opióides do tipo μ são muito expressos no RMTg, Jhou et al. (2009b) e em neurônios do RMTg que se projetam para a VTA (JALABERT et al., 2011). Além disso, agonistas de opióides do tipo μ são auto-administrados no RMTg mas não na VTA rostral, Jhou et al. (2012), Zangen et al. (2002) e estudos eletrofisiológicos mostraram que os agonistas do tipo μ , de forma poderosa, inibem os neurônios GABAérgicos do RMTg, enquanto eles desinibem neurônios dopaminérgicos da VTA (LECCA et al., 2011, 2012; MATSUI; WILLIAMS 2011). Assim, os neurônios GABAérgicos do RMTg, e não como assumido em trabalhos

anteriores, interneurônios GABAérgicos da VTA, Johnson e North (1992b), podem ser o substrato principal responsável para a desinibição dos neurônios dopaminérgicos da VTA mediado por opióides (BOURDY; BARROT, 2012).

Os nossos resultados topográficos podem ser úteis para acessar o RMTg em futuros estudos de manipulação farmacológica ou lesão. Além disso, a estria medular, o principal fascículo aferente da LHb, tornou-se uma estrutura promissora para o tratamento da estimulação cerebral profunda na depressão maior (SARTORIUS et al., 2010; SARTORIUS; HENN, 2007). Os presentes resultados detalhados sobre a característica topográfica das principais eferências descendentes da LHb podem ajudar a acessar circuitos específicos em futuros tratamentos de estimulação profunda do encéfalo.

6 CONCLUSÕES

1. O RMTg é o principal campo terminal da LHb, assim como o complexo VTA-negra é o principal alvo das projeções do RMTg.
2. As projeções da LHb para o tegmento mesopontino estão organizados de maneira muito topográfica, com massivas projeções para o RMTg, principalmente se originando da LHbL e as projeções para a VTA e DR, predominantemente se originando da LHbM.
3. O estudo morfológico da distribuição dos axônios que se originam na LHbL para a VTA, parecidos com fibras de passagem e no RMTg, exibindo extensivas ramificações e botões sinápticos, claramente indica que a VTA não é o principal campo terminal direto da LHb, comparada ao RMTg que foi massivamente innervado pela LHbL.
4. As aposições encontradas entre os axônios PHA-L+ e os neurônios CTb+ no RMTg após injeções de PHA-L na LHb e CTb na VTA prova a existência de uma importante via bisináptica que conecta a LHbL com a VTA via o RMTg.
5. A distribuição localizada de axônios PHA-L+ e os neurônios CTb+ no RMTg após injeções de PHA-L na LHb e CTb na VTA, desenhando o RMTg, mostra que este núcleo, além de ser explorado com estudos que utilizam psicoestimulantes ou estímulos aversivos, pela ativação do gene Fos ou a densa expressão de neurônios GABAérgicos, também pode ser delimitado ou acessado com estudos de rastreamento anterógrado ou retrógrado.

Esses achados indicam que o RMTg é uma estrutura chave para a sinalização de eventos aversivos e controle inibitório dos neurônios dopaminérgicos do complexo VTA-negra.

REFERÊNCIAS*

- AIZAWA, H.; KOBAYASHI, M.; TANAKA, S.; FUKAI, T.; OKAMOTO, H. Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. **J. Comp. Neurol.**, v. 520, p. 4051-4066, 2012.
- AMAT, J.; SPARKS, P. D.; MATUS-AMAT, P.; GRIGGS, J.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. The role of the habenular complex in the elevation of dorsal raphe nucleus serotonin and the changes in the behavioral responses produced by uncontrollable stress. **Brain. Res.**, v. 917, p.118-126, 2001.
- ANDRES, K. H.; VON DURING, M.; VEH, R. W. Subnuclear organization of the rat habenular complexes. **J. Comp. Neurol.**, v. 407, p. 130-150, 1999.
- 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.
- ASTON-JONES, G.; RAJKOWSKI, J.; COHEN, J. Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention. **Prog. Brain. Res.**, v. 126, p. 165-182, 2000.
- 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.
- BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain. Res. Rev.**, v. 28, p. 309-369, 1998.
- BJÖRKLUND, A.; DUNNETT, S. B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends Neurosci.**, v. 30, p. 194-202, 2007.
- BLAHA, C. D.; ALLEN, L. F.; DAS, S.; INGLIS, W. L.; LATIMER, M. P.; VINCENT, S. R.; WINN, P. Modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens after cholinergic stimulation of the ventral tegmental area in intact, pedunculo pontine tegmental nucleus-lesioned, and laterodorsal tegmental nucleus-lesioned rats. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 714-722, 1996.
- 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.
- 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.

* De acordo com:

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

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.

BRISCHOUX, F.; CHAKRABORTY, S.; BRIERLEY, D. I.; UNGLESS, M. A. Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 106, p. 4894-4899, 2009.

BROMBERG-MARTIN, E. S.; MATSUMOTO, M.; NAKAHARA, H.; HIKOSAKA, O. Multiple timescales of memory in lateral habenula and dopamine neurons. **Neuron**, v. 67, p. 499-510, 2010.

BROZOSKI, T. J.; BROWN, R. M.; ROSVOLD, H. E.; GOLDMAN, P. S. Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. **Science**, v. 205, p. 929-932, 1979.

CALDECOTT-HAZARD, S.; MAZZIOTTA, J.; PHELPS, M. Cerebral correlates of depressed behavior in rats, visualized using ¹⁴C-2-deoxyglucose autoradiography. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 1951-1961, 1988.

CARR, D. B.; SESACK, S. R. GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. **Synapse**, v. 38, p. 114-123, 2000.

CHARARA, A.; SMITH, Y.; PARENT, A. Glutamatergic inputs from the pedunculo-pontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde labeling combined with postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry. **J. Comp. Neurol.**, v. 364, p. 254-266, 1996.

CHEN, S.; ASTON-JONES, G. Evidence that cholera toxin B subunit (CTb) can be avidly taken up and transported by fibers of passage. **Brain. Res.**, v. 674, p. 107-111, 1995.

CHERGUI, K.; CHARLETY, P. J.; AKAOKA, H.; SAUNIER, C. F.; BRUNET, J. L.; BUDA, M.; SVENSSON, T. H.; CHOUVET, G. Tonic activation of NMDA receptors causes spontaneous burst discharge of rat midbrain dopamine neurons in vivo. **Eur. J. Neurosci.**, v. 5, p. 137-144, 1993.

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.

CLIFFER, K. D.; GIESLER, G. J. JR. PHA-L can be transported anterogradely through fibers of passage. **Brain. Res.**, v. 458, p. 185-191, 1988.

COLUSSI-MAS, J.; GEISLER, S.; ZIMMER, L.; ZAHM, D. S.; BEROD, A. Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: a double-labelling study. **Eur. J. Neurosci.**, v. 26, p. 1011-1025, 2007.

CONTESTABILE, A.; VILLANI, L.; FASOLO, A.; FRANZONI, M. F.; GRIBAUDO, L.; OKTEDALEN, O.; FONNUM, F. Topography of cholinergic and substance P pathways in the habenulo-interpeduncular system of the rat. An immunocytochemical and microchemical approach. **Neuroscience**, v. 21, p. 253-270, 1987.

CORNWALL, J.; COOPER, J. D.; PHILLIPSON, O. T. Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. **Brain. Res. Bull.**, v. 25, p. 271-284, 1990.

DADO, R. J.; BURSTEIN, R.; CLIFFER, K. D.; GIESLER, G. J., JR. Evidence that Fluoro-Gold can be transported avidly through fibers of passage. **Brain. Res.**, v. 533, p. 329-333, 1990.

DAHLSTROM, A.; FUXE, K. Localization of monoamines in the lower brain stem. **Experientia**, v. 20, p. 398-399, 1964.

DEVOR, M.; ZALKIND, V. Reversible analgesia, atonia, and loss of consciousness on bilateral intracerebral microinjection of pentobarbital. **Pain**, v. 94, p. 101-112, 2001.

DITTGEN, A.; GRUBER, C.; GEISLER, S.; ZAHM, D. S.; VEH, R. W. Anterior and posterior parts of the rat ventral tegmental area receive topographically distinct afferents from the lateral habenular complex. **Soc. Neurosci. Abstr.**, v. 32, p. 670.624, 2006.

DOBI, A.; MARGOLIS, E. B.; WANG, H. L.; HARVEY, B. K.; MORALES, M. Glutamatergic and nonglutamatergic neurons of the ventral tegmental area establish local synaptic contacts with dopaminergic and nondopaminergic neurons. **J. Neurosci.**, v. 30, p. 218-229, 2010.

DOMMETT, E.; COIZET, V.; BLAHA, C. D.; MARTINDALE, J.; LEFEBVRE, V.; WALTON, N.; MAYHEW, J. E.; OVERTON, P. G.; REDGRAVE, P. How visual stimuli activate dopaminergic neurons at short latency. **Science**, v. 307, p. 1476-1479, 2005.

ELLISON, G. Stimulant-induced psychosis, the dopamine theory of schizophrenia, and the habenula. **Brain. Res. Rev.**, v. 19, p. 223-239, 1994.

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

FORSTER, G. L.; BLAHA, C. D. Laterodorsal tegmental stimulation elicits dopamine efflux in the rat nucleus accumbens by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the ventral tegmental area. **Eur. J. Neurosci.**, v.12, p.3596-3604, 2000.

FRIEDMAN, A.; LAX, E.; DIKSHTEN, Y.; ABRAHAM, L.; FLAUMENHAFT, Y.; SUDAI, E.; BEN-TZION, M.; AMI-AD, L.; YAKA, R.; YADID, G. Electrical stimulation of the lateral habenula produces enduring inhibitory effect on cocaine seeking behavior. **Neuropharmacology**, v.59, p.452-459, 2010.

GARZON, M.; VAUGHAN, R. A.; UHL, G. R.; KUCHAR, M. J.; PICKEL, V. M. Cholinergic axon terminals in the ventral tegmental area target a subpopulation of neurons expressing low levels of the dopamine transporter. **J. Comp. Neurol.**, v. 410, p. 197-210, 1999.

GEISLER, S.; ANDRES, K. H.; VEH, R. W. Morphologic and cytochemical criteria for the identification and delineation of individual subnuclei within the lateral habenular complex of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 458, p. 78-97, 2003.

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.; TRIMBLE, M. The lateral habenula: no longer neglected. **CNS. Spectr.**, v. 13, p. 484-489, 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.

GERFEN, C. R.; SAWCHENKO, P. E. An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). **Brain. Res.**, v. 290, p. 219-238, 1984.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Working memory dysfunction in schizophrenia. **J Neuropsychiatry. Clin. Neurosci.**, v.6, p.348-357, 1994.

GONCALVES, L.; SEGO, C.; 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.

GONZALEZ-HERNANDEZ, T.; RODRIGUEZ, M. Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 421, p. 107-135, 2000.

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

GOTO, Y.; OTANI, S.; GRACE, A. A. The Yin and Yang of dopamine release: a new perspective. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 583-587, 2007.

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

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

GROENEWEEN, H. J.; BERENDSE, H. W.; HABER, S. N. Organization of the output of the ventral striatopallidal system in the rat: ventral pallidal efferents. **Neuroscience**, v. 57, p. 113-142, 1993.

GRUBER, C.; KAHL, A.; LEBENHEIM, L.; KOWSKI, A.; DITTGEN, A.; VEH, R. W. Dopaminergic projections from the VTA substantially contribute to the mesohabenular pathway in the rat. **Neurosci. Lett.**, v. 427, p. 165-170, 2007.

HANCOCK, M. B. Two-color immunoperoxidase staining: visualization of anatomic relationships between immunoreactive neural elements. **Am. J. Anat.**, v. 175, p. 343-352, 1986.

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.

HERKENHAM, M.; NAUTA, W. J. Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. **J. Comp. Neurol.**, v. 173, p. 123-146, 1977.

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

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

HIKOSAKA, O.; SESACK, S. R.; LECOURTIER, L.; SHEPARD, P. D. Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 11825-11829, 2008.

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

HOKFELT, T.; SMITH, C. B.; NORELL, G.; PETERS, A.; CRANE, A.; GOLDSTEIN, M.; BROWNSTEIN, M.; SOKOLOFF, L. Attempts to combine 2-deoxyglucose autoradiography and tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. **Neuroscience**, v. 13, p. 495-512, 1984.

HOLSTEGE, G. The emotional motor system. **Eur. J. Morphol.**, v. 30, p. 67-79, 1992.

HOLSTEGE, G. The mesopontine rostromedial tegmental nucleus and the emotional motor system: role in basic survival behavior. **J. Comp. Neurol.**, v. 513, p. 559-565, 2009.

HOLSTEGE, G.; GEORGIADIS, J. R. The emotional brain: neural correlates of cat sexual behavior and human male ejaculation. **Prog. Brain. Res.**, v. 143, p. 39-45, 2004.

HOLSTEGE, J. C.; KUYPERS, H. G. Brain stem projections to spinal motoneuronal cell groups in rat studied by means of electron microscopy autoradiography. **Prog. Brain. Res.**, v. 57, p. 177-183, 1982.

HONG, S.; HIKOSAKA, O. The globus pallidus sends reward-related signals to the lateral habenula. **Neuron**, v. 60, p. 720-729, 2008.

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.

HORVITZ, J. C. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. **Neuroscience**, v. 96, p. 651-656, 2000.

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

ILANGO, A.; SHUMAKE, J.; WETZEL, W.; SCHEICH, H.; OHL, F. W. The role of dopamine in the context of aversive stimuli with particular reference to acoustically signaled avoidance learning. **Front. Neurosci.**, v. 6, p. 132, 2012.

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.

JALABERT, M.; BOURDY, R.; COURTIN, J.; VEINANTE, P.; MANZONI, O. J.; BARROT, M.; GEORGES, F. Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 108, p. 16446-16450, 2011.

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

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

JHOU, T. C.; FIELDS, H. L.; BAXTER, M. G.; SAPER, C. B.; HOLLAND, P. C. 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. 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 (Berl)**, v.224, p.303-312, 2012.

JHOU, T. C.; GEISLER, S.; MARINELLI, M.; DEGARMO, B. A.; ZAHM, D. S. 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.

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.

JOHNSON, S. W.; NORTH, R. A. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. **J. Neurosci.**, v. 12, p. 483-488, 1992a.

JOHNSON, S. W.; NORTH, R. A. Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. **J. Physiol.**, v. 450, p. 455-468, 1992b.

KAUFLING, J.; VEINANTE, P.; PAWLOWSKI, S. A.; FREUND-MERCIER, M. J.; 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.

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

KIM, U.; LEE, T. Topography of descending projections from anterior insular and medial prefrontal regions to the lateral habenula of the epithalamus in the rat. **Eur. J. Neurosci.**, v. 35, p. 1253-1269, 2012.

KISS, J.; CSAKI, A.; BOKOR, H.; KOCSIS, K.; KOCSIS, B. Possible glutamatergic/aspartatergic projections to the supramammillary nucleus and their origins in the rat studied by selective [(3)H]D-aspartate labelling and immunocytochemistry. **Neuroscience**, v. 111, p. 671-691, 2002.

KLEMM, W. R. Habenular and interpeduncularis nuclei: shared components in multiple-function networks. **Med. Sci. Monit.**, v. 10, p. RA261-273, 2004.

KOOB, G. F. Hedonic valence, dopamine and motivation. **Mol. Psychiatry**, v. 1, p. 186-189, 1996.

KOROTKOVA, T. M.; SERGEEVA, O. A.; ERIKSSON, K. S.; HAAS, H. L.; BROWN, R. E. Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. **J. Neurosci.**, v. 23, p. 7-11, 2003.

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.

KOWSKI, A. B.; VEH, R. W.; WEISS, T. Dopaminergic activation excites rat lateral habenular neurons in vivo. **Neuroscience**, v. 161, p. 1154-1165, 2009.

LAVEZZI, H. N.; PARSLEY, K. P.; ZAHM, D. S. Mesopontine rostromedial tegmental nucleus neurons projecting to the dorsal raphe and pedunculo pontine tegmental nucleus: psychostimulant-elicited Fos expression and collateralization. **Brain. Struct. Funct.**, v. 217, p. 719-734, 2012.

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. 1164-1176, 2012.

LECOURTIER, L.; KELLY, P. H. A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 31, p. 658-672, 2007.

LI, B.; PIRIZ, J.; MIRRIONE, M.; CHUNG, C.; PROULX, C. D.; SCHULZ, D.; HENN, F.; MALINOW, R. Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. **Nature**, v. 470, p. 535-539, 2011.

LI, Y. Q.; TAKADA, M.; SHINONAGA, Y.; MIZUNO, N. The sites of origin of dopaminergic afferent fibers to the lateral habenular nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 333, p. 118-133, 1993.

LISOPRAWSKI, A.; HERVE, D.; BLANC, G.; GLOWINSKI, J.; TASSIN, J. P. Selective activation of the mesocortico-frontal dopaminergic neurons induced by lesion of the habenula in the rat. **Brain. Res.**, v. 183, p. 229-234, 1980.

LODGE, D. J.; GRACE, A. A. The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, p. 5167-5172, 2006.

LONSTEIN, J. S.; SIMMONS, D. A.; SWANN, J. M.; STERN, J. M. Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. **Neuroscience**, v. 82, p. 267-281, 1998.

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.

MATSUI, A.; WILLIAMS, J. T. Opioid-sensitive GABA inputs from rostromedial tegmental nucleus synapse onto midbrain dopamine neurons. **J. Neurosci.**, v. 31, p. 17729-17735, 2011.

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. Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. **Nat. Neurosci.**, v. 12, p. 77-84, 2009.

MATTHEWS-FELTON, T.; CORODIMAS, K. P.; ROSENBLATT, J. S.; MORRELL, J. I. Lateral habenula neurons are necessary for the hormonal onset of maternal behavior and for the display of postpartum estrus in naturally parturient female rats. **Behav. Neurosci.**, v. 109, p. 1172-1188, 1995.

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.

MENA-SEGOVIA, J.; WINN, P.; BOLAM, J. P. Cholinergic modulation of midbrain dopaminergic systems. **Brain. Res. Rev.**, v. 58, p. 265-271, 2008.

MORRIS, J. S.; SMITH, K. A.; COWEN, P. J.; FRISTON, K. J.; DOLAN, R. J. Covariation of activity in habenula and dorsal raphe nuclei following tryptophan depletion. **Neuroimage**, v. 10, p. 163-172, 1999.

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

NISHIKAWA, T.; FAGE, D.; SCATTON, B. Evidence for, and nature of, the tonic inhibitory influence of habenulointerpeduncular pathways upon cerebral dopaminergic transmission in the rat. **Brain. Res.**, v. 373, p. 324-336, 1986.

OADES, R. D.; HALLIDAY, G. M. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. **Brain. Res.**, v. 434, p. 117-165, 1987.

OAKMAN, S. A.; FARIS, P. L.; KERR, P. E.; COZZARI, C.; HARTMAN, B. K. Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 5859-5869, 1995.

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.

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.

OMELCHENKO, N.; SESACK, S. R. Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. **J. Comp. Neurol.**, v. 483, p. 217-235, 2005.

OMELCHENKO, N.; SESACK, S. R. Cholinergic axons in the rat ventral tegmental area synapse preferentially onto mesoaccumbens dopamine neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 494, p. 863-875, 2006.

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.

OVERTON, P.; CLARK, D. Electrophysiological evidence that intrastrially administered N-methyl-D-aspartate augments striatal dopamine tone in the rat. **J. Neural. Transm. Park. Dis. Dement. Sect.**, v. 4, p. 1-14, 1992.

OVERTON, P. G.; CLARK, D. Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. **Brain. Res. Rev.**, v. 25, p. 312-334, 1997.

PARENT, M.; LEVESQUE, M.; PARENT, A. Two types of projection neurons in the internal pallidum of primates: single-axon tracing and three-dimensional reconstruction. **J. Comp. Neurol.**, v. 439, p. 162-175, 2001.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 6th ed. San Diego: Elsevier, 2007.

PERROTTI, L. I.; BOLANOS, C. A.; CHOI, K. H.; 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. **Eur. J. Neurosci.**, v. 21, p. 2817-2824, 2005.

PHILLIPSON, O. T.; PYCOCK, C. J. Dopamine neurones of the ventral tegmentum project to both medial and lateral habenula. Some implications for habenular function. **Exp. Brain. Res.**, v. 45, p. 89-94, 1982.

QUIRK, G. J.; SOTRES-BAYON, F. Signaling aversive events in the midbrain: worse than expected. **Neuron**, v. 61, p. 655-656, 2009.

RAJAKUMAR, N.; ELISEVICH, K.; FLUMERFELT, B. A. Compartmental origin of the striato-entopeduncular projection in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 331, p. 286-296, 1993.

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

REDGRAVE, P.; GURNEY, K.; REYNOLDS, J. What is reinforced by phasic dopamine signals? **Brain. Res. Rev.**, v. 58, p. 322-339, 2008.

REDGRAVE, P.; PRESCOTT, T. J.; GURNEY, K. Is the short-latency dopamine response too short to signal reward error? **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 146-151, 1999.

REYNOLDS, S. M.; GEISLER, S.; BEROD, A.; ZAHM, D. S. Neurotensin antagonist acutely and robustly attenuates locomotion that accompanies stimulation of a neurotensin-containing pathway from rostromedial forebrain to the ventral tegmental area. **Eur. J. Neurosci.**, v. 24, p. 188-196, 2006.

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.

SARTORIUS, A.; HENN, F. A. Deep brain stimulation of the lateral habenula in treatment resistant major depression. **Med. Hypotheses.**, v. 69, p. 1305-1308, 2007.

SARTORIUS, A.; KIENING, K. L.; KIRSCH, P.; VON GALL, C. C.; HABERKORN, U.; UNTERBERG, A. W.; HENN, F. A.; MEYER-LINDENBERG, A. Remission of major depression under deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient. **Biol. Psychiatry.**, v. 67, p. e9-e11, 2010.

SASAKI, K.; SUDA, H.; WATANABE, H.; KANEKO, S.; NOMURA, Y.; NISHINO, H.; ONO, T. Habenular lesion attenuates methamphetamine-induced inhibition of dopamine neuronal activity in the substantia nigra pars compacta of rats. **Neurosci. Lett.**, v. 86, p. 67-71, 1988.

SCAMMELL, T. E.; ESTABROOKE, I. V.; MCCARTHY, M. T.; CHEMELLI, R. M.; YANAGISAWA, M.; MILLER, M. S.; SAPER, C. B. Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 8620-8628, 2000.

SCHEIBEL, M. E.; SCHEIBEL, A. B. Structural substrates for integrative patterns in the brainstem reticular core. In: JASPER, H. H.; PROCTOR, L. D.; KNIGHTON, R. S. NOSHAY, W. C.; COSTELO, R. T. (Ed.). **Reticular formation of the brain**. Boston: Little Brown, p. 31-55, 1958.

SCHEIBNER, T.; TORR, 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.

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

SCHULTZ, W. Behavioral dopamine signals. **Trends. Neurosci.**, v. 30, p. 203-210, 2007.

SCHULTZ, W.; DAYAN, P.; MONTAGUE, P. R. A neural substrate of prediction and reward. **Science**, v. 275, p. 1593-1599, 1997.

SHABEL, S. J.; PROULX, C. D.; TRIAS, A.; MURPHY, R. T.; MALINOW, R. Input to the lateral habenula from the basal ganglia is excitatory, aversive, and suppressed by serotonin. **Neuron**, v. 74, p. 475-481, 2012.

SHAMMAH-LAGNADO, S. J.; SANTIAGO, A. C. Projections of the amygdalopiriform transition area (APir). A PHA-L study in the rat. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 877, p. 655-660, 1999.

SHELTON, L.; BECERRA, L.; BORSOOK, D. Unmasking the mysteries of the habenula in pain and analgesia. **Prog. Neurobiol.**, v. 96, p. 208-219, 2012.

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.

SHUMAKE, J.; EDWARDS, E.; GONZALEZ-LIMA, F. Opposite metabolic changes in the habenula and ventral tegmental area of a genetic model of helpless behavior. **Brain. Res.**, v. 963, p. 274-281, 2003.

SHUMAKE, J.; GONZALEZ-LIMA, F. Brain systems underlying susceptibility to helplessness and depression. **Behav. Cogn. Neurosci. Rev.**, v. 2, p. 198-221, 2003.

SHUMAKE, J.; ILANGO, A.; SCHEICH, H.; WETZEL, W.; OHL, F. W. Differential neuromodulation of acquisition and retrieval of avoidance learning by the lateral habenula and ventral tegmental area. **J. Neurosci.**, v. 30, p. 5876-5883, 2010.

SICA, A. L.; GREENBERG, H. E.; SCHARF, S. M.; RUGGIERO, D. A. Chronic-intermittent hypoxia induces immediate early gene expression in the midline thalamus and epithalamus. **Brain. Res.**, v. 883, p. 224-228, 2000.

SKAGERBERG, G.; LINDVALL, O.; BJORKLUND, A. Origin, course and termination of the mesohabenular dopamine pathway in the rat. **Brain. Res.**, v. 307, p. 99-108, 1984.

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, 2012.

STEPHENSON-JONES, M.; FLOROS, O.; ROBERTSON, B.; GRILLNER, S. Evolutionary conservation of the habenular nuclei and their circuitry controlling the dopamine and 5-hydroxytryptophan (5-HT) systems. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 109, p. E164-173, 2011.

SUKHOTINSKY, I.; HOPKINS, D. A.; LU, J.; SAPER, C. B.; DEVOR, M. Movement suppression during anesthesia: neural projections from the mesopontine tegmentum to areas involved in motor control. **J. Comp. Neurol.**, v. 489, p. 425-448, 2005.

SUTHERLAND, R. J. The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 6, p. 1-13, 1982.

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

TAGLIAFERRO, P.; MORALES, M. Synapses between corticotropin-releasing factor-containing axon terminals and dopaminergic neurons in the ventral tegmental area are predominantly glutamatergic. **J. Comp. Neurol.**, v. 506, p. 616-626, 2008.

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

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.

VAN BOCKSTAELE, E. J.; PICKEL, V. M. GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. **Brain. Res.**, v. 682, p. 215-221, 1995.

VERTES, R. P.; MARTIN, G. F. Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 275, p. 511-541, 1988.

VINCENT, S. R.; STAINES, W. A.; MCGEER, E. G.; FIBIGER, H. C. Transmitters contained in the efferents of the habenula. **Brain. Res.**, v. 195, p. 479-484, 1980.

WANAT, M. J.; HOPF, F. W.; STUBER, G. D.; PHILLIPS, P. E.; BONCI, A. Corticotropin-releasing factor increases mouse ventral tegmental area dopamine neuron firing through a protein kinase C-dependent enhancement of Ih. **J. Physiol.**, v. 586, p. 2157-2170, 2008.

WANG, H. L.; MORALES, M. Pedunculo pontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. **Eur. J. Neurosci.**, v. 29, p. 340-358, 2009.

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

WEINER, D. M.; LEVEY, A. I.; SUNAHARA, R. K.; NIZNIK, H. B.; O'DOWD, B. F.; SEEMAN, P.; BRANN, M. R. D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 88, p. 1859-1863, 1991.

WINN, P. Frontal syndrome as a consequence of lesions in the pedunculo pontine tegmental nucleus: a short theoretical review. **Brain. Res. Bull.**, v. 47, p. 551-563, 1998.

WIRTSHAFTER, D.; ASIN, K. E.; PITZER, M. R. Dopamine agonists and stress produce different patterns of Fos-like immunoreactivity in the lateral habenula. **Brain. Res.**, v. 633, p. 21-26, 1994.

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

WISE, R. A. Forebrain substrates of reward and motivation. **J. Comp. Neurol.**, v. 493, p. 115-121, 2005.

WOUTERLOOD, F. G.; GOEDE, P. H.; GROENEWEGEN, H. J. The in situ detectability of the neuroanatomical tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L). **J. Chem. Neuroanat.**, v. 3, p. 11-18, 1990.

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

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

ZAHM, D. S. The evolving theory of basal forebrain functional-anatomical 'macrosystems'. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 30, p. 148-172, 2006.

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

APÊNDICE - Publicação do presente estudo

Differential Projections From the Lateral Habenula to the Rostromedial Tegmental Nucleus and Ventral Tegmental Area in the Rat

Luciano Gonçalves,^{1,3} Chemutai Sego,^{1,2} and Martin Metzger^{1*}

¹Department of Physiology & Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-900 São Paulo, Brazil

²Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-900 São Paulo, Brazil

³Department of Human Anatomy, Federal University of the Triângulo Mineiro, 38025-180 Uberaba, Brazil

ABSTRACT

The mesopontine rostromedial tegmental nucleus (RMTg) is a mostly γ -aminobutyric acid (GABA)ergic structure believed to be a node for signaling aversive events to dopamine (DA) neurons in the ventral tegmental area (VTA). The RMTg receives glutamatergic inputs from the lateral habenula (LHb) and sends substantial GABAergic projections to the VTA, which also receives direct projections from the LHb. To further specify the topography of LHb projections to the RMTg and VTA, small focal injections of the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin were aimed at different subdivisions of the LHb. The subnuclear origin of LHb inputs to the VTA and RMTg was then confirmed by injections of the retrograde tracer cholera toxin subunit b into the VTA or RMTg. Furthermore, we compared the topographic position of retrogradely labeled

neurons in the RMTg resulting from VTA injections with that of anterogradely labeled axons emerging from the LHb. As revealed by anterograde and retrograde tracing, LHb projections were organized in a strikingly topographic manner, with inputs to the RMTg mostly arising from the lateral division of the LHb (LHbL), whereas inputs to the VTA mainly emerged from the medial division of the LHb (LHbM). In the RMTg, profusely branched LHb axons were found in close register with VTA projecting neurons and were frequently apposed to the latter. Overall, our findings demonstrate that LHb inputs to the RMTg and VTA arise from different divisions of the LHb and provide direct evidence for a disynaptic pathway that links the LHbL to the VTA via the RMTg. *J. Comp. Neurol.* 520:1278–1300, 2012.

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

INDEXING TERMS: dopamine; mesopontine tegmentum; raphe nuclei; aversion; reward; motor suppression

In an article describing the efferent connections of the habenular nuclei in the rat, Herkenham and Nauta (1979) documented a dense presumptive terminal field in the mesopontine tegmentum in a territory laterally adjacent to the median raphe nucleus (MnR), resulting from tracer injections restricted to the lateral habenula (LHb). Nowadays there is evidence that this terminal field is part of a brain structure recently termed the rostromedial tegmental nucleus (RMTg; Jhou et al., 2009a,b) that extends from the caudal pole of the ventral tegmental area (VTA) into the mesopontine tegmentum and presumably constitutes an important node for signaling aversive events to the midbrain (Jhou et al., 2009b; Hikosaka, 2010).

Interest in this brain region resurged when Perrotti et al. (2005) demonstrated Δ FosB expression in response to chronic forced administration of psychostimulant

drugs in a γ -aminobutyric acid (GABA)ergic cell population at the caudal pole of the VTA, termed the “posterior tail of the VTA.” It was then found that this region, situated dorsolateral to the caudal half of the interpeduncular

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Grant numbers: 07/59799-7 and 04/06790-4; Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Grant number: 143177/2008-7.

*CORRESPONDENCE TO: Martin Metzger, Ph.D., Dept. of Physiology & Biophysics, Institute of Biomedical Sciences I, University of São Paulo, USP, Av. Prof. Lineu Prestes 1524, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: metzger@icb.usp.br

Received March 21, 2011; Revised June 29, 2011; Accepted October 4, 2011

DOI 10.1002/cne.22787

Published online 20 October 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

nucleus, contains almost exclusively GABAergic neurons (Olson and Nestler, 2007) and projects extensively to the entire VTA-nigra complex (Geisler and Zahm, 2005; Ferreira et al., 2008; Geisler et al., 2008). In simultaneously published studies from two groups, the connections of this newly described region, as well as Fos gene expression patterns, were examined in more detail, revealing that variants of the Fos gene are essentially expressed in GABAergic neurons that project to the VTA (Jhou et al., 2009b) in response to psychostimulant administration (Kaufling et al., 2009) and also in response to aversive stimuli (Jhou et al., 2009a). Importantly, Fos gene expression under the conditions cited above is not limited to the conspicuous cluster at the caudal pole of the VTA first described by Perrotti et al. (2005), but is present in a continuous cell population extending from the caudal pole of the VTA deeply into the mesopontine tegmentum approaching caudally the rostral pole of the pedunclopontine tegmental nucleus (Geisler et al., 2008; Jhou et al., 2009b).

Besides the prominent output to dopaminergic cell groups (Ferreira et al., 2008; Jhou et al., 2009a,b), a substantial input from the LHb (Herkenham and Nauta, 1979; Araki et al., 1988; Kim, 2009) is another anatomical hallmark of the RMTg. Until recently the exact functions of the LHb were rather enigmatic. In rodents, the LHb receives major inputs from the ventral pallidum, lateral preoptic area, and entopeduncular nucleus (Herkenham and Nauta, 1977; Groenewegen et al., 1993; Kowski et al., 2008) and projects to major monoaminergic and cholinergic cell groups in the pons and midbrain (Herkenham and Nauta, 1979; Araki et al., 1988; Cornwall et al., 1990; Kim, 2009). Because of this singular set of connections, the LHb has been considered a crossroad between the basal forebrain and monoaminergic cell groups in the midbrain and mesopontine tegmentum (Lecourtier and Kelly, 2007; Geisler and Trimble, 2008; Hikosaka et al., 2008).

Abbreviations

BST	bed nucleus of the stria terminalis
CLi	caudal linear nucleus of the raphe
cp	cerebral peduncle
CPu	caudate putamen
DBB	nucleus of diagonal band of Broca
DMTg	dorsomedial tegmental area
DR	dorsal raphe nucleus
DRC	dorsal raphe nucleus, caudal part
DTgP	dorsal tegmental nucleus, pericentral part
EP	entopeduncular nucleus
fr	fasciculus retroflexus
GPI	globus pallidus, internal segment
IF	interfascicular nucleus
IP	interpeduncular nucleus
IPC	IP, caudal subnucleus
IPi	IP, intermediate subnucleus
LH	lateral hypothalamus
LHb	lateral habenular nucleus
LHbL	LHb, lateral part
LHbLB	basal subnucleus of the lateral part of the LHb
LHbLMc	magnocellular subnucleus of the lateral part of the LHb
LHbLMg	marginal subnucleus of the lateral part of the LHb
LHbLO	oval subnucleus of the lateral part of the LHb
LHbLPc	parvocellular subnucleus of the lateral part of the LHb
LHbM	LHb, medial part
LHbMA	anterior subnucleus of the medial part of the LHb
LHbMC	central subnucleus of the medial part of the LHb
LHbMMg	marginal subnucleus of the medial part of the LHb
LHbMPc	parvocellular subnucleus of the medial part of the LHb
LHbMS	superior subnucleus of the medial part of the LHb
LPO	lateral preoptic area
MHb	medial habenular nucleus
ml	medial lemniscus
mlf	medial longitudinal fasciculus
MnR	median raphe nucleus
PBP	parabrachial pigmented nucleus
PMnR	paramedian raphe nucleus
PN	paranigral nucleus
PTg	pedunclopontine tegmental nucleus
PVP	paraventricular thalamic nucleus, posterior part
RLi	rostral linear nucleus of the raphe
RMTg	rostromedial tegmental nucleus
RRF	retrotrubral field
S	septum
sm	stria medullaris thalamus
SNC	substantia nigra, compact part
SNR	substantia nigra, reticular part
VLPAG	ventrolateral periaqueductal gray
xscp	decussation superior cerebellar peduncle

TABLE 1.
Primary Antibodies Used in This Study

Antigen	Immunogen	Source	Dilution	
			IPe	IF
CTb	Purified toxin from <i>Vibrio cholera</i>	List Laboratories, (Burlingame, CA), #104, goat polyclonal	1:10,000	1:10,000
PHA-L	Purified lectin from <i>Phaseolus vulgaris</i>	DAKO, (Carpinteria, CA), #B275, rabbit polyclonal	1:5,000	1:2,500

Abbreviations: CTb, cholera toxin, subunit b; IF, immunofluorescence staining; IPe, immunoperoxidase staining; PHA-L, *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin.

It is well documented that VTA dopamine (DA) neurons respond with short bursts to unexpected rewards and novel salient stimuli (Overton and Clark, 1997; Schultz, 1998, 2007; Tobler et al., 2005), whereas inhibitory pauses are evoked by reward omission and aversive events (Horvitz, 2000; Ungless et al., 2004; Brischoux et al., 2009). Until recently, there was little information about the inhibitory control of VTA DA neuronal firing patterns (Erhardt et al., 2002a,b) and the source of negative reward information conveyed to the VTA (for review, see Bromberg-Martin et al., 2010). Elegant electrophysiological studies in monkeys (Matsumoto and Hikosaka 2007, 2009) as well as functional magnetic resonance imaging (fMRI) studies in humans (Ullsperger and von Cramon, 2003) demonstrated that LHB neurons are powerfully activated by aversive stimuli and reward omission and inhibited by reward-predictive cues or unexpected rewards. Furthermore, electrical stimulation of the LHB powerfully suppresses VTA DA neuron activity at short latency through a GABA-mediated mechanism (Christoph et al., 1986; Ji and Shepard, 2007). In the VTA, it seems unlikely that this inhibitory effect results from a monosynaptic input to DA or GABA neurons (Ji and Shepard, 2007).

There is now overwhelming evidence that a direct projection from the LHB to the VTA proper is glutamatergic (Geisler et al., 2007; Brinschwitz et al., 2010) and comparatively sparse, forming only a few synapses with no overt selectivity for GABA versus DA neurons (Omelchenko et al., 2009). Altogether, these findings indicate that the LHB may only exert a modest direct influence on VTA neurons, suggesting that the mostly GABAergic RMTg might be a critical relay for LHB inputs to the VTA.

To address this hypothesis and to better characterize the anatomical position of the RMTg, we here compared the topographic position of retrogradely labeled neurons in the RMTg resulting from injections of the retrograde tracer cholera toxin subunit b (CTb) into the VTA and anterogradely labeled fibers resulting from small topical injections of the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) into different divisions of the LHB complex. Tracer injections into these targets were made separately or in the same animal. Furthermore, we confirmed LHB projections to the RMTg by retrograde tracing and included

the VTA proper in our analysis to compare the extent and origin of LHB inputs to the VTA with those to the RMTg.

MATERIALS AND METHODS

Animals and surgery

Adult male Wistar rats (180–220 g; $n = 33$) obtained from a local breeding facility at the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, were used in all experiments. The animals were kept in group cages under controlled temperature (23°C) and illumination (12-hour cycle), with water and food ad libitum. All experiments were carried out in compliance with NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23, revised 1996) and were approved by the institutional Animal Ethics Committees of the Institute for Biomedical Sciences at the University of São Paulo (Protocol 061/04). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Rats were anesthetized by subcutaneous injections with a cocktail consisting of ketamine (Syntec, Hortolândia, Brazil; 5 mg/100 g body weight), acepromazine (Univet, São Paulo, Brazil) 0.04 mg/100 g bw), and xylazine (Syntec; 1 mg/100 g bw) diluted in distilled water. Rats were placed into a Kopf stereotaxic instrument. The skulls were exposed, and small bore holes were drilled with a dental burr to allow selected brain structures to be targeted by borosilicate glass pipettes. The anterograde tracer *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin (PHA-L; 2.5% in 0.01 M phosphate buffer; Vector, Burlingame, CA,) and the retrograde tracer CTb (low salt, 1% in distilled water; List Biological Laboratories, Campell, CA) were used in the present study. Both tracers were injected iontophoretically and all injections were performed in the right hemisphere.

One group of rats received single unilateral injections of CTb into the VTA ($n = 14$) or PHA-L into the LHB ($n = 5$). To identify LHB neurons projecting to the RMTg, CTb was also injected into the RMTg ($n = 6$). Another group of rats received PHA-L injections into the LHB together with CTb injections into the VTA ($n = 8$). All tracers were injected by using a positive pulsed current (7 seconds on, 7 seconds off) set at 5 μ A for 20 minutes (for CTb injections into the VTA) or 10–15 minutes (for CTb injections into the RMTg), and at 4 μ A for 15 minutes (for PHA-L

injections into the LHB) through glass micropipettes (10–15 μm internal tip diameter for PHA-L, 15–20 μm for CTb). The stereotaxic coordinates were obtained from the rat brain atlas of Paxinos and Watson (2007) and subsequently refined empirically. Before withdrawal, the pipettes were left in position for at least 3 minutes, and a negative continuous current, set at 3 μA , was applied to minimize tracer backflow along the pipette tract.

Perfusion and tissue sectioning

Following a survival period of 7 days for CTb injections and 10 days for PHA-L or combined PHA-L/CTb injections, the rats were deeply anesthetized and perfused transcardially with 90 ml of 0.9% saline solution followed by 500 ml 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.3) at 4°C. The brains were postfixed for 4 hours at 4°C and cryoprotected with 20% sucrose solution in PB at 4°C. Brains were sectioned in the coronal plane at 40 μm into four series on a sliding microtome. One series of sections was processed immunohistochemically for CTb or PHA-L. In the case of rats, which received injections of CTb together with injections of PHA-L, another series was processed by using a double immunoperoxidase or double immunofluorescence staining protocol. An additional series of sections was stained with thionin to serve as a reference for cytoarchitecture.

Antibody characterization and immunohistochemical controls

The primary antibodies used in this study (Table 1) have been fully characterized and tested for specificity. The goat antibody against CTb (List, #104) was raised against the purified toxin from *Vibrio cholerae* (List datasheet), which is not physiologically present in the organism. The rabbit antibody against PHA-L (Dako, Carpinteria, CA, #B275) was produced by hyperimmunizing rabbits with the purified lectin, which is also not found in mammalian brain (Dako datasheet). Importantly, sections from brains that did not receive a PHA-L or CTb injection were devoid of reaction product when immunoreacted with the respective primary anti-PHA-L or anti-CTb antibody at optimal dilutions. Optimal antibody concentrations were individually determined for each antibody. Specificity of the secondary antibodies was indicated by the observed absence of specific labeling in tissue sections collected from naive animals and animals that had received a tracer injection, to which the immunocytochemical method was applied with omission of the primary antibody step.

Immunoperoxidase staining

Immunohistochemical procedures were carried out on free-floating sections at room temperature unless otherwise stated. Both CTb (Luppi et al., 1990) and PHA-L (Gerfen and Sawchenko, 1984) were processed immunohistochemically. In the case of CTb, sections were preincubated for 30 minutes in 2% normal goat serum (NGS, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and then incubated with a polyclonal anti-CTb antibody raised in goat (List) diluted 1:10,000 in PB containing 0.3% Triton X-100 for 24–48 hours at 4°C. In the case of PHA-L, the preincubation with 2% normal serum was omitted and sections were incubated directly with a polyclonal anti-PHA-L antibody raised in rabbit (Dako) diluted 1:5,000 in PB containing 0.3% Triton X-100 and 10% skimmed milk for 24–48 hours at 4°C. Sections were subsequently rinsed in PB and incubated for 2 hours in the appropriate affinity-purified biotinylated secondary antibodies (goat anti-rabbit IgG, #BA-1000, Vector, dilution: 1:200 for PHA-L; donkey anti-goat, #705-066-147, Jackson ImmunoResearch, dilution: 1:4,000 for CTb). Sections were rinsed again followed by 2 hours of incubation in an ABC Kit (ABC Elite Kit, Vector). After thorough rinsing in PB, the peroxidase reaction product was visualized by using the glucose oxidase procedure (Itoh et al., 1979) and metal-free 3,3'-diaminobenzidine (DAB) tetrahydrochloride as chromogen (for more details, see Shammah-Lagnado and Santiago, 1999). Finally, the sections were rinsed again in PB, mounted on gelatin-coated slides, dipped for 20 seconds in a 0.05% aqueous solution of osmium tetroxide, dehydrated through a series of ascending concentrations of ethanol, transferred into xylene, and coverslipped with DPX (Sigma) mounting medium.

For selected cases in which PHA-L was injected into the LHB together with CTb into the VTA, a double immunoperoxidase labeling protocol was used for the simultaneous detection of PHA-L-labeled fibers/terminals and CTb-positive cell bodies in the RMTg. Sections were first treated for PHA-L immunohistochemistry by using the nickel-intensification method of Hancock (1986) and then immunostained for CTb by using the glucose oxidase protocol described above and metal-free DAB as chromogen.

Immunofluorescence staining

Sections were pretreated as described above and then incubated for 72 hours at 4°C in a cocktail of rabbit anti-PHA-L diluted 1:2,500 and goat anti-CTb diluted 1:10,000 in PB, containing 1% normal donkey serum (NDS) and 0.3% Triton X-100. Sections were subsequently rinsed in PB and incubated for 1 hour in a second cocktail consisting of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated donkey anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch) and

Figure 1. A–C: Photomicrographs of a representative CTb injection site centered in the parabrachial pigmented subnucleus (PBP) of the ventral tegmental area (VTA; A) and the resulting retrograde labeling at a rostral (B) and a midrostral (C) level of the rostromedial tegmental nucleus (RMTg). For other abbreviations, see list. Scale bar = 250 μ m in A; 200 μ m in C (applies to B,C).

Texas Red-conjugated donkey anti-goat antibody (Jackson ImmunoResearch), both diluted 1:200 in PB containing 1% NDS. The sections were finally thoroughly rinsed in 0.05 M Tris-HCl, mounted on gelatin-coated slides, coverslipped with slow-fade-medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), and sealed with nail polish. Several sets of controls were performed, including the omission of one or both primary antibodies, omission of one of the secondary antibodies, and switching of the fluorophores related to the different markers. All these control procedures resulted in the expected single fluorescence labeling or, in the case of omission of both primary antisera, in the absence of fluorescence labeling.

Data analysis

Immunoperoxidase-stained sections were examined under both bright- and darkfield illumination, and immunofluorescence-stained sections were examined under epifluorescence illumination by using a Zeiss Axioimager A1 microscope (Zeiss, Muenchen, Germany). Digital color photomicrographs were acquired by using a Zeiss Axio-cam HRc camera. Images of double immunofluorescence-stained sections were acquired and analyzed with the Axiovision software (Zeiss), which permits the acquisition of images from several separate fluorescence channels, as well as the subsequent superposition of these images. Selected double immunofluorescence-stained sections were analyzed with a Zeiss LSM 510 confocal

Figure 2. A–H: Semi-schematic drawings of a CTb injection site in the rostral VTA (A) and the resulting retrograde labeling in frontal sections (B–H) through the mesopontine tegmentum. Sections are presented in a rostrocaudal sequence and each dot represents approximately two retrogradely labeled neurons. Note the close anatomic relationship of the RMTg (indicated by the gray shaded area) with fibers of the decussating superior cerebellar peduncle (xscp). For abbreviations, see list.

laser scanning microscope (Zeiss, Goettingen, Germany) by using step intervals of about 200 nm along the z-axis.

Image processing and lettering was carried out with the Adobe Photoshop software (version 7.0; Adobe Systems, Mountain View, CA). Color balance, contrast, and

Figure 3. A–E: Photomicrographs of PHA-L injection sites centered in the medial one-third (case R81; A), in the magnocellular subnucleus (case R82; B), and in the oval subnucleus (case R77; C) of the lateral habenula (LHb) alongside subnuclear organization of the habenula as illustrated in a Nissl-stained section (D) and a scheme of the delineation of individual LHb subnuclei (E), modified from Geisler et al. (2003). White dots indicate the positions of PHA-L-impregnated neurons marking the core region of the injection sites. For abbreviations, see list. Scale bar = 300 μ m in C (applies to A–C); 250 μ m in D.

brightness of the images were adjusted to a variable extent. The Canvas software (version 9.0; ACD Systems, Victoria, BC, Canada) was used for line drawings.

The nomenclature used in the present study is based on the atlas of Paxinos and Watson (2007) with few exceptions. In the present article we adhere to the term RMTg as first defined by Jhou et al. (2009a,b). For reasons further detailed in the discussion, we consider the structure termed in previous publications as the “retro-VTA” (Scamell et al., 2000), the “posterior tail of the VTA” (Perrotti et al., 2005; Kaufling et al., 2009), or the “VTA caudal pole” (Ferreira et al., 2008) as an integral part of the RMTg. In order to specify the exact position of retrogradely labeled neurons and injection sites in the LHb, we adhered to the nomenclature of Andres et al. (1999) for the different subnuclei within the LHb complex (see also Geisler et al., 2003). According to these authors the LHb complex may be subdivided into a medial (LHbM) and a lateral (LHbL) division, each one further subdivided on morphologic and cytochemical grounds into five distinct subnuclei (see also our Fig. 4E).

RESULTS

Retrograde tracing experiments: RMTg inputs to the VTA

CTb injections into the VTA were typically placed in the rostralateral part of the parabrachial pigmented subnucleus (Fig. 1A). Some of the injections were mostly confined to this subnucleus, whereas others also involved the paranigral subnucleus or, peripherally, the dorsal part of the substantia nigra, pars compacta. Very small injections in the VTA, which resulted in weak labeling throughout the mesopontine tegmentum, and large injections in the caudal part of the parabrachial pigmented subnucleus, which slightly encroached into the RMTg or into the interpeduncular nucleus, were discarded from analysis. Of the 14 animals that received single CTb injections into the VTA, eight cases were selected for analysis. In these cases, we observed a highly consistent pattern of retrograde labeling in numerous structures of the mesopontine tegmentum including the RMTg, the dorsal (DR) and median (MnR) raphe nuclei, the periaqueductal gray, and the pedunculopontine tegmental nucleus. The

Figure 4. A–C'': Photomicrographs illustrating the distribution of anterograde labeling resulting from PHA-L injections centered in the medial one-third (case R81; A–A''), in the magnocellular subnucleus (case R82; B–B'') and oval subnucleus (case R77; C–C'') of the LHb at three successively more caudal levels through the mesopontine tegmentum. Note the pronounced topography of LHb projections. The inset in A' illustrates patchy PHA-L-labeled terminal fields in the median raphe nucleus (MnR). The respective injection sites are illustrated in Figure 3. For abbreviations, see list. Scale bar = 500 μ m in C'' (applies to A–C''); 10 μ m in inset to A'.

Figure 5. Photomicrographs illustrating the distribution of anterograde labeling in the mesopontine tegmentum following PHA-L injections centered on the medial one-third (case R81; A,C,D) and the magnocellular subnucleus (case R82; B) of the LHb. **A,B:** Anterograde labeling at a level through the caudal part of the dorsal raphe nucleus (DRC). Note the complementary pattern of anterograde labeling in these two cases. Whereas in case R81 robust anterograde labeling was found in the DRC and MnR, these regions were largely avoided in case R82. **C,D:** Anterograde labeling at a level through the rostral pole of the RMTg. Note that PHA-L-labeled axons in the caudalmost part of the VTA show characteristics of fibers of passage (C, inset), whereas those in the RMTg exhibit numerous bouton-like swellings and terminal ramifications (D). Arrows indicate the same axons at low and high magnification (inset) and arrowheads terminal ramifications. For abbreviations, see list. Scale bar = 500 μ m in C (applies to A–C); 100 μ m in D and inset to C.

distribution of retrograde labeling from a large representative CTb injection into the VTA (case R694; Fig. 1) is shown in Figure 2. Substantial bilateral retrograde label-

ing was observed in the RMTg, with ipsilateral CTb labeling being only slightly more prominent than the contralateral component.

Figure 6. A–E': Semi-schematic drawings illustrating the distribution of anterogradely labeled fibers in the VTA proper and mesopontine tegmentum following PHA-L injections into the medial (A–E; case R81) and lateral (A'–E'; case R82) division of the LHb. Sections are presented in a rostrocaudal sequence and the respective injection sites are shown in Figure 3. For abbreviations, see list.

CTb-labeled neurons in the RMTg extended from about 6.4 to about 7.6 mm posterior to bregma, being at all rostrocaudal levels closely associated with fibers of the decussation of the superior cerebellar peduncle. At rostral levels, the RMTg became apparent in coronal sections as a more or less egg/ball-like structure located immediately dorsal to the dorsomedial edge of the medial lemniscus and slightly dorsolateral to the caudal half of the interpeduncular nucleus (Figs. 1B, 2B,C). At this level, the majority of retrogradely labeled RMTg neurons were found ventral

to the fibers of the decussation of the superior cerebellar peduncle. Caudalward, the cluster of CTb-labeled neurons in the RMTg shifted dorsally, most of them lying now amid fibers of the superior cerebellar peduncle (Figs. 1C, 2D,E). Still more caudally, at about 7 mm posterior to bregma, CTb-labeled neurons in the RMTg occupied a broader mediolateral extent and the form of the cluster now resembled more a peanut than an egg/ball (Fig. 2F). At the caudal pole of the RMTg, CTb-labeled neurons thinned out and progressively merged with retrogradely labeled

Figure 7. A–D: Photomicrographs illustrating the distribution and morphological characteristics of PHA-L-labeled axons in the VTA (A,C) and RMTg (B,D), following a PHA-L injection centered in the magnocellular subnucleus (case R82) of the LHb. Note the predominant non-varicose character of LHb axons in the VTA (C, inset in C) in contrast to the terminal-like character in the RMTg (D, inset in D). Arrows indicate the same axons at low and high magnification (inset) and arrowheads terminal ramifications. For abbreviations, see list. Scale bar = 500 μ m in B (applies to A,B); 100 μ m in D (applies to C,D); 20 μ m in insets to C and D.

neurons in the laterally adjacent pedunclopontine tegmental nucleus (Fig. 2G,H). At these levels, the bulk of the retrogradely labeled neurons in the RMTg were found again ventral to the fibers of the decussation of the superior cerebellar peduncle. It should be noted that VTA injections located medial to that shown in Figure 1 resulted in fewer retrogradely labeled neurons in the RMTg, located predominantly in the medial part of this nucleus.

Anterograde tracing experiments: LHb projections to the mesopontine tegmentum

Because there is increasing evidence that the LHb contains distinct subfields (Andres et al., 1999; Geisler et al.,

2003) that might conceivably give rise to differential streams of information processing from the forebrain to monoaminergic cell groups in the midbrain and mesopontine tegmentum (Kowski et al., 2008; Kim, 2009), injections into the LHb were aimed at different locations along the mediolateral axis of the LHb complex. Of the 13 PHA-L injections aimed at the LHb, 7 were mostly confined to the LHb and did not encroach into the medial habenula (MHb). The remaining six injections, centered in thalamic nuclei, were discarded from analysis or served as control cases. Most of the PHA-L injection sites in the LHb had a similar appearance, with a dense core containing a variable small number of darkly stained neurons, surrounded

by a diffuse background labeling. Three cases with injections confined to the LHb were chosen as prototypes to illustrate our results (Fig. 3). Case R81 had a small injection centered in the medialmost portion (Fig. 3A), and case R82 had a larger injection involving the central and lateral one-thirds (Fig. 3B), whereas in case R77 the injection was mostly confined to the ventrolateral portion of the LHb complex (Fig. 3C). In cases R77 and R82, the injection peripherally involved parts of the centrolateral and mediodorsal thalamic nucleus. Because control injections in these thalamic districts did not result in anterograde labeling in the RMTg, we retained these two cases.

In all analyzed cases, PHA-L labeling in the midbrain and mesopontine tegmentum resulting from injections in the LHb complex was bilateral, with notably fewer fibers in the contralateral hemisphere. As reported recently in an anterograde tracing study by Kim (2009), who did not recognize the recently described RMTg as a separate entity, we found that LHb projections to the mesopontine tegmentum were organized in a highly topographic manner. In summary, our PHA-L injections into the LHb complex revealed a strikingly point-to-point topography for these projections.

Following a PHA-L injection centered in the medialmost portion of the LHb complex and involving the marginal, parvocellular, and central subnuclei of the LHbM (case R81; Fig. 3A), anterograde labeling in the mesopontine tegmentum was almost completely restricted to midline and paramedian structures. These structures included the interpeduncular nucleus (Fig. 4A'), the MnR, the DR (Figs. 5A, 6D,E), and the paramedian raphe nucleus, whereas only sparse terminal-like labeling was found in the laterally adjacent RMTg. Several prominent patchy terminal fields were located throughout the whole rostro-caudal extent of the MnR and, to a minor degree, in the paramedian raphe nucleus (Figs. 4A',A'', 6D). Considerably fewer PHA-L-labeled fibers and terminals were noted in the DR. Terminal-like PHA-L labeling in the DR was most prominent in its caudal division (Fig. 5A). In contrast, only scattered poorly branched PHA-L-labeled fibers were detected in the rostral part of the DR (Fig. 6D). In addition, the interpeduncular nucleus displayed a prominent terminal field in the intermediate subnucleus (Figs. 4A', 6C).

In contrast, a comparatively large PHA-L injection in case R82 (Fig. 3B), centered in the magnocellular subnucleus of the LHbL and involving the central and lateral one-thirds of the LHb, without encroaching into the medial, resulted in prominent terminal labeling in the RMTg and paramedian raphe nucleus. Considerably fewer PHA-L-labeled fibers and terminals than in case R81 were found along the midline in the interpeduncular nucleus, caudal division of the DR and MnR (Figs. 4B-B'',

5B). A prominent terminal field with many axons exhibiting bouton-like swellings and terminal ramifications was observed in the RMTg (Figs. 4B-B'', 5C,C', 6C',D'', 7B). At rostral RMTg levels, this terminal field showed a ball-like focal appearance (Fig. 4B, 5C), whereas more caudally, it was displaced in the dorsal direction and occupied a broader mediolateral extent (Figs. 4B',B', 6D'). Focal terminal-like PHA-L labeling in the RMTg could be followed up until about 7.5 mm posterior to bregma. Still more caudally, many PHA-L-labeled fibers fanned out of the RMTg core region, and some terminals were found in the dorsomedial tegmental area (Fig. 5B).

Finally, injections centered in the oval subnucleus and involving lateral parts of the magnocellular subnucleus of the LHbL (exemplified by case R77; Fig. 3C) resulted in considerably less anterograde labeling in the RMTg, with the bulk of PHA-L-labeled terminals in the RMTg restricted to its lateralmost part (Fig. 4C-C''). Additionally, few PHA-L-labeled fibers and terminals were still present in the paramedian raphe nucleus, whereas midline structures such as the interpeduncular nucleus, MnR, and DR were now virtually devoid of labeling. More caudally, very few PHA-L-labeled fibers were found in and nearby the ventral part of the laterodorsal tegmental nucleus and even fewer in the pedunculo-pontine tegmental nucleus (not shown).

In all cases that received PHA-L injections into the LHb, substantial PHA-L labeling could also be observed in the VTA proper (Figs. 6, 7). However, terminal-like PHA-L labeling in the VTA was considerably less dense than in the RMTg (compare Fig. 7A,C with 7B,D). Thus, in contrast to the predominant beaded appearance of labeled axons in the RMTg, the majority of PHA-L-labeled axons in the VTA showed morphologic characteristics suggestive of fibers of passage (i.e., they were poorly branched and beaded and often traveled in bundles). The predominant nonvaricose character of LHb axons in the VTA became particularly evident in cases with PHA-L injections involving the LHbL, which consistently resulted in stronger anterograde labeling in the VTA than injections confined to the LHbM. Thus, following central and lateral injections in the LHb complex, the highest density of PHA-L-labeled fibers was detected in the rostral VTA along the sheath of the fasciculus retroflexus and in the paranigral subnucleus (Fig. 6A'). At more caudal levels through the VTA, PHA-L labeling in the paranigral subnucleus persisted, and a broad stream of labeled fibers could be observed in lateral parts of the parabrachial pigmented subnucleus (Figs. 6B',C', 7A). Many of the poorly branched nonvaricose fibers in this stream seemed to continue caudal to the VTA (Fig. 5C).

Following injections in the LHbM, PHA-L labeling in the VTA was densest in the paranigral nucleus, with some additional weak labeling in the interfascicular nucleus

Figure 8. A-E': Photomicrographs of CTb injection sites in the RMTg (A-C) and VTA proper (D,E) and the resulting retrograde labeling (A'-E') in the LHb complex. A: A very small injection centered on the RMTg (case R62). B: An injection centered in the medial part of the RMTg (case R61). C: An injection centered in the lateral part of the RMTg (case R64). D: An injection centered in the PBP (case R696). E: An injection mostly involving the paranigral subnucleus (PN) of the VTA (case R70). Note the absence of retrograde labeling in the medial habenula (MHb). For abbreviations, see list. Scale bar = 1,000 μ m in E (applies to A-E); 300 μ m in E' (applies to A'-E').

Figure 9. A–E'': Semi-schematic drawings illustrating the distribution of retrogradely labeled neurons at three successively more caudal levels through the LHb complex resulting from CTb injections in the RMTg (cases R62, R61, R64) or VTA proper (cases R696, R70), respectively. Note that the RMTg receives most of its inputs from neurons in the lateral division of the LHb, whereas the VTA is mainly innervated by neurons of the medial division of the LHb. Each dot represents one retrogradely labeled neuron. For abbreviations, see list.

and parabrachial pigmented nucleus (Fig. 6A–C). In all these VTA subregions, some varicose PHA-L-labeled axons could also be observed. Additionally, all of our LHb injections resulted in only meager anterograde labeling in the compact part of the substantia nigra.

Retrograde tracing experiments: LHb inputs to the RMTg and VTA proper

To confirm that the RMTg receives topographically organized inputs from the LHb complex, in another group

of rats, small CTb deposits were placed into the RMTg. In addition, the pattern of retrograde labeling in the LHb resulting from injections into the RMTg was compared with that resulting from injections into the VTA proper. In general, the retrograde experiments allowed a more precise assignment of the neurons of origin of LHb inputs to the RMTg and VTA. Out of a total of six CTb injections into the RMTg, three (cases R61, R62, and R64) were largely restricted to the RMTg and resulted in robust bilateral retrograde labeling in the LHb complex, with fewer CTb-labeled neurons found on the contralateral side.

Figure 10. A–D: Low- and high-power photomicrographs of double immunofluorescence (A–C) and double immunoperoxidase (D) staining for PHA-L (green fluorescence, black peroxidase product) and CTb (red fluorescence, brown peroxidase product) in the rostromedial tegmental nucleus (RMTg). PHA-L labeling results from a large injection centered in the magnocellular subnucleus of the LHb (case R82) and CTb labeling from a large VTA injection centered in the PBP. Note that varicose PHA-L-labeled axons are found in close register with CTb-labeled neurons and form numerous close appositions with the latter (indicated by arrowheads). A magenta-green version of this figure is provided as Figure 1 in the Supplementary Material. Scale bar = 100 μ m in A; 10 μ m in B–D.

Retrograde labeling resulting from these three cases as well as from two representative cases (cases R696 and R70) that received CTb injections into the VTA proper is documented in Figures 8 and 9. Although retrogradely labeled neurons were scattered throughout several subnuclei of the LHb complex, the observed pattern in these cases largely confirmed the topographic organization of LHb projections detected by anterograde tracing from the LHb. Most importantly, the findings from this retrograde approach revealed that the RMTg receives most of its inputs from subnuclei belonging to the LHbL, whereas the VTA is mainly innervated by subnuclei of the LHbM.

Following a very small CTb injection practically confined to the RMTg (case R62; Fig. 8A), the bulk of labeled neurons in the LHb was restricted to the magnocellular and oval subnucleus of the LHbL (Figs. 8A', 9A',A''). In addition, more rostral, few retrogradely labeled neurons were detected in the anterior subnucleus of the LHbM (Fig. 9A). In case R61, a larger injection was centered in

the medial division of the RMTg involving caudally parts of the paramedian raphe nucleus (Fig. 8B). Again, most of the CTb-labeled neurons were found in the magnocellular and to a minor degree in the oval subnucleus of the LHbL. However, in this case CTb labeling in the magnocellular subnucleus shifted more medially (Fig. 8B'), and considerably more CTb-labeled neurons than in case R62 were now additionally found in subnuclei that belong to the LHbM, such as the central, the parvocellular, and the anterior subnucleus (Fig. 9B–B''). Finally, in one case in which the CTb injection into the RMTg was centered considerably more laterally and slightly caudally (R64, Fig. 8C) to that in case R61, CTb labeling in the LHb shifted laterally with many labeled neurons found in the lateralmost portion of the magnocellular subnucleus and in the oval subnucleus. Clustering of retrogradely labeled neurons in the LHbL could particularly be observed at caudal levels through the LHb (Figs. 8C', 9C''). Except for the anterior subnucleus, very

Figure 11. A–D: Semi-schematic drawings illustrating the distribution of anterogradely PHA-L-labeled axons and retrogradely labeled neurons in the RMTg region in case R82, which received a PHA-L injection centered in the magnocellular subnucleus of the LHbL together with a CTb injection mostly involving the parabrachial pigmented subnucleus of the VTA. Sections are presented in a rostrocaudal sequence. Black squares represent retrogradely labeled neurons and the dashed lines the midline. Note that all retrogradely labeled neurons were charted, whereas the density of PHA-L-labeled axons was adjusted so as not to obscure retrograde labeling. For abbreviations, see list.

few retrogradely labeled neurons were detected in other subnuclei of the LHbM.

In contrast, injections into the VTA proper consistently resulted in more retrogradely labeled neurons in subnuclei of the LHbM than in those of the LHbL. Thus, the parvocellular and central subnuclei of the LHbM were in all cases heavily labeled following VTA injections. A pronounced agglomeration of retrogradely labeled neurons in the parvocellular subnucleus became particularly obvious in case R70, in which the CTb injection mostly involved the VTA paranigral subnucleus (Fig. 8E,E'). In this case, the medial shift of retrograde labeling following injections into the VTA could also be observed in the anterior subnucleus of the LHbM (Fig. 9E). In contrast, injections mostly involving lateral parts of the parabrachial pigmented subnucleus of the VTA led to a lateral shift of retrograde labeling within the LHb (not shown).

In addition, RMTg as well as VTA injections resulted in scattered CTb-labeled neurons in the initial segment of

the fasciculus retroflexus and in the paraventricular and mediodorsal nuclei of the thalamus.

Combined retrograde/anterograde tracing experiments

To test whether PHA-L-labeled axons emerging from the LHb complex are found in the same topographic position as CTb-labeled neurons resulting from VTA injections and whether these axons are apposed to VTA projecting neurons in the RMTg, both tracers were injected in the same animal, and the resulting labeling was revealed by using a double immunofluorescence or double immunoperoxidase protocol. Of the 13 animals that received PHA-L injections into the LHb (previously described), 8 also had CTb injections into the VTA. In three cases (cases R71, R77, and R82), both injections were confined to their respective target regions and showed satisfying transport of both tracers. In these cases there was substantial overlap in the distribution of retrogradely labeled neurons and PHA-L-labeled fibers in the RMTg, with numerous PHA-L-

Figure 12. Schematic diagram of major afferent and efferent connections of the habenula. This diagram is based on connections defined in the present study (solid lines) and literature data (dashed lines). Note that the diagram is highly simplified. Thus, many of the depicted connections are reciprocal, and there are rich interconnections between most of the mesopontine and mesencephalic structures included in the diagram. For reasons of simplicity, these connections are not shown. A magenta-green version of this figure is provided as Figure 2 in the Supplementary Material. Scheme partially adapted from Hikosaka et al. (2008). For abbreviations, see list.

labeled axon terminals and fibers closely apposed to CTb-labeled cell bodies and dendrites (Fig. 10).

Remarkably, terminal-like PHA-L labeling was mostly restricted to the RMTg core region and extended over a highly similar rostrocaudal distance to cluster-like retrograde labeling resulting from VTA injections. In particular, in case R82 that received a large PHA-L injection centered in the magnocellular subnucleus of the LHbL and a large CTb injection mostly involving the parabrachial pigmented subnucleus of the VTA, most of the RMTg core region was invested by PHA-L-labeled terminals and CTb-labeled neurons; it was noteworthy that both markers were in remarkable register (Fig. 11). However, dorsomedial parts of the RMTg were only sparsely innervated by PHA-L-labeled fibers and contained numerous CTb-labeled neurons (Figs. 10A, 11A–D). Caudally, many retrogradely labeled neurons were found amid the fibers of the decussation of the superior cerebellar peduncle just dorsal to the PHA-L-labeled RMTg core region (Fig. 11B,D). The ventral part of the caudal RMTg was invested by PHA-L-labeled axons and did not contain retrogradely labeled neurons (Fig. 11D).

In the remaining two cases, the PHA-L injections were centered in the lateralmost portion of the LHb and, as observed in the immunoperoxidase material, resulting PHA-L labeling in the RMTg was now mostly confined to the lateralmost part of the RMTg. Nevertheless, several close appositions of PHA-L-labeled fibers to CTb-labeled neurons could be observed in these two cases in the lat-

eral part of the RMTg in which both tracers were in register.

DISCUSSION

In the present study we systematically investigated afferents from the newly described RMTg to the VTA as well as Lhb projections to the RMTg and VTA. A summary diagram of our results is shown in Figure 12. The main findings are: 1) the RMTg is the major terminal field of the Lhb; 2) Lhb projections to the mesopontine tegmentum are organized in a strikingly topographic manner, with projections to the RMTg mostly arising from the LHbL, whereas those to the VTA and DR predominantly emerged from the LHbM; and 3) in the RMTg, varicose axons from the Lhb are found in register with VTA projecting neurons and are frequently closely apposed to the latter. Our results will be discussed with reference to the findings of previous gene expression and tract-tracing studies and with reference to the functional role of the RMTg as an interface between the Lhb and monoaminergic cell groups in the mesencephalon and mesopontine tegmentum.

Methodological considerations

An inherent limitation for the interpretation of tracing results is the potential uptake and transport of anterograde and retrograde tracers by injured fibers passing through the injection site (Cliffer and Giesler, 1988; Dado et al., 1990; Chen and Aston-Jones, 1995). Substantial necrosis at the injection site has been considered as the principal cause of tracer uptake by injured fibers (Dado et al., 1990; Luppi et al., 1995). Thus, in the present study, PHA-L as well as CTb was injected iontophoretically by using discontinuous currents to minimize the development of heat and consequent tissue damage near the electrode tips (Groenewegen and Wouterlood, 1990; Luppi et al., 1990). Because our tracer injections targeted structures crisscrossed by or closely associated with fiber bundles such as the VTA, the RMTg, and the habenula, they might be particularly prone to the occurrence of tracer uptake by damaged fibers. However, there is little evidence that this phenomenon might have significantly affected major results of the present study. Overall, our anterograde data about Lhb projections to the VTA and RMTg are in good agreement with previous anterograde studies (Herkenham and Nauta, 1979; Araki et al., 1988; Kim, 2009; Jhou et al., 2009b; Omelchenko et al., 2009) and were largely supported by the pattern of retrograde labeling in the LHb resulting from CTb injections into these structures. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that some minor uptake of PHA-L or CTb occurred by damaged fibers of passage.

Another challenge of the present study was to place topical injections in immediately adjacent structures such as the VTA and RMTg. Thus, special care was taken to obtain small tracer deposits in these structures. That this attempt was mostly successful is indicated by the differential pattern of retrograde labeling in the LHb we obtained.

Another obvious methodological limitation was the accurate assignment of our PHA-L injections to distinct subnuclei of the LHb complex. None of the PHA-L injections placed in the LHb complex was small enough to be confined to one of the 10 subnuclei (Andres et al., 1999; Geisler et al., 2003). Thus, it was often impossible to decide if only one or several subnuclei contribute to the resulting pattern of anterograde labeling in the mesopontine tegmentum (see also Kim, 2009). Similarly, we considered that our attempt to assign retrogradely labeled neurons resulting from CTb injections into the RMTg or VTA to distinct subnuclei of the LHb without counterstaining the material by immunohistochemical and/or histochemical methods was not always unambiguous. Nevertheless, this approach rendered valuable information about which LHb subnuclei provide major afferents to the VTA and RMTg and largely validated our anterograde tracing data.

Topographical position of the RMTg

In our present tracing experiments we tried to specify the exact topographical position of the RMTg by further exploring two of its previously identified anatomical hallmarks, a massive projection to the VTA–nigra complex (Vertes and Martin, 1988, see their Fig. 3; Jhou, 2005; Geisler et al., 2008; Ferreira et al., 2008; Jhou et al., 2009a,b), as well as a substantial topographically organized input from the LHb (Herkenham and Nauta, 1979; Araki et al., 1988; Kim, 2009). The structure now known as the RMTg was initially identified in studies examining Fos activation by psychostimulants (Scammell et al., 2000; Perrotti et al., 2005; Colussi-Mas et al., 2007; Geisler et al., 2008; Kaufling et al., 2009; Jhou et al., 2009a,b). In general, our findings on the topographical position of the RMTg are in good agreement with the results of these Fos activation studies and extend them in some aspects. Importantly, they indicate that the RMTg core region may also be outlined by the overlapping distribution of retrogradely labeled neurons from the VTA and anterogradely labeled fibers from the LHb. Thus, the position of the bulk of retrogradely labeled neurons from the VTA and anterograde terminal-like fiber labeling resulting from PHA-L injections into the LHb shown in the present material undoubtedly corresponds to the position of the core region of Fos-labeled neurons activated by psychostimulant application in previous studies (e.g., compare Fig. 5 of Geisler et al., 2008 with our Fig. 2). Consistent with this, it has previously been demonstrated that LHb

axons in the RMTg are distributed coextensively with methamphetamine-induced Fos immunoreactivity (Jhou et al., 2009b).

Initially, Fos-labeled neurons in the mesencephalon and mesopontine tegmentum resulting from psychostimulant treatment were primarily described in a mostly GABAergic cell population at the caudal pole of the VTA, designated as the “retroVTA” (Scammell et al., 2000) or the “posterior tail of the VTA” (Perrotti et al., 2005). In contrast, more recent studies showed that psychostimulant- (Geisler et al., 2008; Jhou et al., 2009b) and footshock-induced (Jhou et al., 2009a) Fos immunoreactivity extends considerably more caudally and is present in a continuous GABAergic cell population (Kaufling et al., 2009; Jhou et al., 2009b) that stretches from the caudal pole of the VTA deeply into the mesopontine tegmentum. Overall, our tracing data are in line with the view that the RMTg is not a caudal extension of the VTA, as assumed by Kaufling et al. (2009), but instead a separate entity of the mesopontine tegmentum as proposed by Jhou et al. (2009a,b). Considering the caudal limits of the RMTg, progressing caudally we found that both retrograde and anterograde labeling became sparser and more diffuse, with LHb efferents spreading out of the RMTg and retrogradely labeled neurons in the RMTg becoming progressively intermingled with those in laterally adjacent structures, such as the pedunclopontine tegmental nucleus. These observations are in line with the view of Jhou et al. (2009a) of a compact RMTg part and a diffuse RMTg part that blends at caudal levels with surrounding elements of the mesopontine tegmentum.

Topography of habenular projections to the mesopontine tegmentum and VTA

Prominent projections from the LHb to the mesopontine tegmentum, including the site now recognized as the RMTg, have been demonstrated in several previous studies (Herkenham and Nauta, 1979; Araki et al., 1988; Kim, 2009; Kaufling et al., 2009; Jhou et al., 2009b). Because of the outstanding functional importance of the LHb–RMTg projection, we here reexamined it in detail by using anterograde and retrograde tracing methods. Furthermore, we included the VTA proper in our analysis to compare the extent and origin of LHb inputs to the VTA with that to the RMTg. In general, most of our findings on LHb projections to the mesopontine tegmentum are in good agreement with those of the aforementioned studies and extend them in several aspects. Major newly discovered features revealed in the present study include a detailed description of the complex topography of LHb projections to the mesopontine tegmentum and the notable finding that LHb projections to the RMTg almost exclusively arise from the LHbL, whereas those to the VTA

mainly emerge from the LHbM. The topographical character of LHb projections to the mesopontine tegmentum was first described in the seminal study of Herkenham and Nauta (1979). Injecting tritiated amino acids into different parts of the LHb, these authors unraveled an important key aspect of LHb projections to the mesopontine tegmentum, namely, that LHb inputs to midline structures primarily originate from the LHbM, whereas those to paramedian structures, including a prominent one to the site now known as the RMTg, arise from the LHbL.

Later, Kim (2009) extended these findings using small topical injections of biotinylated dextran amines into different parts of the LHb complex. The pronounced medial-lateral topography of LHb projections to the mesopontine tegmentum may best be recognized by comparing our results with those of Kim (2009). In general, in both studies, midline structures were the preferential target of medial injections into the LHb complex, whereas sequentially more lateral injections into the LHb produced labeling in proportionally more lateral parts of the mesopontine tegmentum (also see Jhou et al., 2009b). In many aspects, our findings and those of Kim are complementary. For example, in our study a medial injection centered at the border with the MHb produced labeling mostly confined to the MnR and DR, whereas a slightly more lateral injection of Kim (2009) resulted in additional prominent labeling in the paramedian raphe nucleus. In both studies, the RMTg was labeled by injections into the central and lateral one-thirds of the LHb complex. However, whereas in the study of Kim (2009), a central injection only labeled medial parts of the RMTg, one of our injections, centered slightly more laterally, labeled most of the RMTg.

There are discrepancies between our findings and those of Jhou et al. (2009b), who found that topographically ordered LHb projections to the RMTg come from across the LHb. In contrast, our anterograde and retrograde data indicate that the LHbM contributes little to LHb projections to the RMTg. Given the intricate topography of LHb projections to the mesopontine tegmentum shown here, this major discrepancy might be due to the larger size of their injections in the RMTg and LHbM. Thus, the Fluoro-Gold injections of Jhou et al. (2009b) into the RMTg may have involved the paramedian raphe nucleus leading to retrograde labeling across the LHb (see their Figs. 4I–K and 9A), whereas their PHA-L injections into the LHbM may have spread into the LHbL, leading to additional labeling of medial parts of the RMTg (see their Fig. 9E,F). Our findings that LHb projections to the RMTg mainly originate from the LHbL were largely corroborated by our retrograde tracing data. Both our anterograde and retrograde tracing findings point to the magnocellular and oval subnuclei of the LHbL as major sources of LHb inputs to the RMTg and further specify that the oval subnucleus

mainly innervates the lateral RMTg, whereas the magnocellular subnucleus innervates most of the RMTg.

Such a view is supported by analysis of figures from previous studies showing that the RMTg was most convincingly labeled following anterograde tracer injections involving these two subnuclei (see Fig. 9 of Herkenham and Nauta, 1979 and Fig. 9 of Jhou et al., 2009b). However, our findings also indicate that other subnuclei of the LHb complex, including some of the LHbM, contribute, although to a lesser extent, afferents to the RMTg.

When we compared LHb projections to the VTA with those to the RMTg, we were able to draw three major conclusions from our findings: 1) LHb projections to the VTA are more modest; 2) whereas LHb axons in the RMTg exhibit extensive branching and beading suggestive of a prominent focal terminal field, PHA-L-labeled axons in the VTA are less varicose, consisting mainly of fibers of passage; and 3) in contrast to the LHb inputs to the RMTg, which mainly arise from the LHbL, those to the VTA mainly emerge from the LHbM. These observations are mostly in line with those of previous studies. Thus, the position and density of anterogradely labeled fibers in the VTA proper described here are similar to those described in previous studies examining LHb inputs to the VTA (e.g., Herkenham and Nauta, 1979; Araki et al., 1988; Omelchenko et al., 2009; Brinschwitz et al., 2010). Our observation of many PHA-L-labeled LHb axons in the VTA interpreted as fibers of passage is supported by the findings of recent ultrastructural studies that estimated a much lower synaptic incidence of LHb axons in the VTA (Omelchenko et al., 2009) than in the RMTg (Balcita-Pedicino et al., 2011).

However, the observation of modest numbers of LHb axons forming synapses onto GABAergic and dopaminergic VTA neurons (Omelchenko et al., 2009; Brinschwitz et al., 2010), as well as the distinct pattern of retrograde labeling in the LHb resulting from VTA versus RMTg injections described in the present study, indicates that the VTA proper receives a functionally direct input from the LHb. It is noteworthy that in our study many of the LHb axons in the VTA and also in the DR showed a morphology (i.e., axons with a mostly straight appearance, short collaterals, and poor terminal branching) similar to that described by Geisler and Zahm (2005) as characteristic of afferents to the VTA arising from different sites of the so-called “isodendritic core” (Scheibel and Scheibel, 1958; Ramón-Moliner and Nauta, 1966; see also Zahm, 2006). In sharp contrast, in the RMTg and also in the MnR, LHb axons were profusely branched and beaded.

With regard to the subnuclear origin of LHb afferents to the VTA proper, there has been little specific information in the literature. In perfect agreement with our findings, two subnuclei of the LHbM, namely, the parvocellular and central subnucleus, have been assigned in an abstract as

the major but not exclusive sources of LHb afferents to the VTA (Dittgen et al., 2006). It is well known that the LHb is reciprocally interconnected with the VTA and that the LHbM is the primary target of the mesohabenular pathway (Phillipson and Pycck, 1982; Skagerberg et al., 1984; Li et al., 1993). Interestingly, among all VTA subnuclei, the paranigral nucleus has been reported to contribute most to this pathway (Gruber et al., 2007). Given that our tracing data point to the paranigral subnucleus of the VTA as a major terminal target of the LHbM (and in particular of the parvocellular subnucleus), this opens the intriguing possibility of a closed VTA–LHbM–VTA loop mainly originating in the paranigral subnucleus. Although the existence of such a closed loop remains to be verified in combined retrograde/anterograde tracing studies, one possible function of the direct projection from the LHb to the VTA may be, as proposed by Omelchenko et al. (2009), to regulate the modulatory feedback from the VTA to the LHb.

In summary, our findings give strong hodological evidence for the historic view that the LHb may be differentiated in a medial division (LHbM) and a lateral division (LHbL) that give rise to differential streams of information processing from the forebrain to monoaminergic cell groups in the midbrain and mesopontine tegmentum (Herkenham and Nauta, 1979; Lecourtier and Kelly, 2007). In rats, the LHbM is targeted by fibers originating in a wide array of forebrain structures, including the lateral septum, nucleus of the diagonal band, lateral hypothalamus, lateral preoptic area, and entopeduncular nucleus (rat homologue of the internal portion of the globus pallidus of primates), whereas the LHbL receives less diverse inputs and is largely dominated by afferents from rostral and midrostral parts of the entopeduncular nucleus (Herkenham and Nauta, 1977; Araki et al., 1984; Li et al., 1993; Rajakumar et al., 1993; Kowski et al., 2008; for review, see Lecourtier and Kelly, 2007). However, the projections of these major afferents to distinct divisions of the LHb should be carefully reexamined with modern tracing techniques as was recently done in the case of the lateral preoptic area (Kowski et al., 2008).

Interestingly, the activity of LHb-projecting neurons in the internal portion of the globus pallidus of primates has been shown to be modulated by expected reward outcomes, with a majority of them excited by no reward-predicting cues (Hong and Hikosaka, 2008). Given that the internal portion of the globus pallidus is the dominant input of the LHbL (Parent et al., 2001), which in turn is the major source of projections to the RMTg (present findings; Jhou et al., 2009b; Kaufling et al., 2009), it is tempting to speculate that the LHbL, as well as the RMTg, may be primarily involved in reward-related processing and specifically in the processing of aversive events. In contrast, the LHbM,

which receives inputs from diverse sources and projects directly to modulatory systems such as the VTA and raphe nuclei, might be involved in more integrative functions. Such a view is supported by Fos expression studies in rats demonstrating that the LHbM (and specifically the parvocellular and central subnucleus) is preferentially activated by different forms of stress (Wirtshafter et al., 1994; Sica et al., 2000) and the onset of maternal behavior (Matthews-Felton et al., 1995; Lonstein et al., 1998). In contrast, the LHbL is more prone to systemic pharmacological manipulations of the dopaminergic system (Wirtshafter et al., 1994), an effect probably mediated indirectly by striatum-mediated suppression of neurons in the entopeduncular nucleus (Kowski et al., 2009).

General functional comments

There is now overwhelming evidence that neurons in the LHb (Matsumoto and Hikosaka, 2007, 2009) and also in the RMTg (Jhou et al., 2009a; Lecca et al., 2010; Hong et al., 2011) respond to the negative value of a stimulus and are primarily excited by aversive stimuli, aversive outcomes, and reward omission. Importantly, this firing pattern of LHb and RMTg neurons is inverse to that of putative VTA DA neurons, which primarily respond with phasic excitations to rewarding, reward-predicting, and appetitive stimuli (Schultz, 1998, 2007; Bromberg-Martin et al., 2010). The present anatomical findings strongly support the view that the RMTg should be the major relay involved in the signaling of negative reward processes to DA neurons in the VTA (Hikosaka, 2010; Balcita-Pedicino et al., 2011). Importantly, the appositions of LHb axons to VTA-projecting RMTg neurons observed in the present study give direct evidence for a disynaptic pathway that links the LHbL to the VTA via the RMTg and makes it conceivable that activation of the mostly GABAergic RMTg may be finally responsible for the powerful inhibitory influence (Christoph et al., 1986; Ji and Shepard, 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2007) of the LHb onto VTA DA neurons.

Our findings support and extend recent ultrastructural findings, demonstrating that: 1) LHb axons form synapses with GABAergic dendrites in the RMTg; and 2) most of the synapses formed by RMTg axons in the VTA contact DA neurons (Balcita-Pedicino et al., 2011). Given that CTb provides only poor labeling of the dendritic tree and that most of the synapses formed by LHb axons in the RMTg were onto GABA-labeled dendrites (Balcita-Pedicino et al., 2011), we might have underestimated the number of LHb axons apposed to dendrites in our material. However, it remains imperative to verify the synaptic character of LHb axonal inputs to VTA-projecting RMTg neurons in future electron microscopic studies. Another strong argument for a major relay function of the RMTg is that the above-cited inhibitory effect of LHb stimulation on DA

cells can similarly be observed in the substantia nigra, which receives even weaker direct inputs from the LHB than the VTA (present results; Araki et al., 1988) but is also densely innervated by the RMTg (Ferreira et al., 2008; Jhou et al., 2009a,b). It is noteworthy that aversive stimuli may be signaled to the RMTg not only by the LHB, but also directly or indirectly by several other structures implicated in distinct aspects of aversive responses and fear behavior (Jhou, 2005; Quirk and Sotres-Bayon, 2009). Thus, the RMTg receives direct inputs from the ventral periaqueductal gray, anterior cingulate cortex, lateral septum, and bed nucleus of the stria terminalis (Kaufling et al., 2009; Jhou et al., 2009b) and may receive indirect inputs from the central nucleus of the amygdala via the ventral periaqueductal gray. In line with such an integrative role in the processing of aversive information, the results from behavioral lesion experiments indicate that the RMTg combines properties of the aforementioned structures (Jhou et al., 2009a).

In terms of its major outputs, the RMTg might constitute a key node by which aversive information from multiple sources is fed forward on the one hand to ascending modulatory dopaminergic, serotonergic, and cholinergic systems and on the other hand to caudal brainstem structures involved in motor control (Holstege, 2009). Thus, in addition to the VTA and substantia nigra, prominent RMTg outputs are directed to the DR, the pedunculopontine tegmental and laterodorsal tegmental nuclei. In addition, the RMTg sends major descending projections to a region of the rostral medullary ventromedial tegmentum (Jhou et al., 2009a,b), considered as a key component of the emotional motor system (Holstege, 1992; Holstege et al., 2004), which in turn sends massive projections to all parts of the spinal cord (Holstege and Kuypers, 1982; Holstege, 2009). Assuming that the net modulatory effect by the mostly GABAergic RMTg should be inhibitory in these projection systems, motor suppression under adverse conditions, as convincingly outlined in a recent review (Hikosaka, 2010), might be the key mechanism that underlies the various functions of the different circuits involving the LHB and the RMTg. Interestingly, functions such as motor suppression and behavioral control have also been attributed to structures of the mesopontine tegmentum situated laterally and caudally of the RMTg, such as the newly described mesopontine tegmental anesthesia area (Devor and Zalkind, 2001; Sukhotinsky et al., 2005) and the pedunculopontine tegmental nucleus (Winn, 1998). However, these structures do not receive any substantial direct input from the LHB (present findings; Kim, 2009).

Given that the suppression of body movements that lead to an aversive outcome is critical to ignore non-salient and harmful stimuli, to avoid punishment, and to ex-

hibit an appropriate adaptive behavioral flexibility (Aston-Jones et al., 2000), it is conceivable that the LHB has been implicated in a very broad array of functions and pathologic conditions (for reviews, see Klemm, 2004; Lecourtier and Kelly, 2007; Geisler and Trimble, 2008; Hikosaka et al., 2008; Hikosaka, 2010). In particular, several animal studies (Caldecott-Hazard et al., 1988; Amat et al., 2001; Shumake et al., 2003), as well as invasive (Sartorius et al., 2010) and noninvasive studies in humans (Morris et al., 1999; Ullsperger and von Cramon, 2003; Shepard et al., 2006), point to a major role of the LHB in stress mechanisms and depression. Interestingly, recent findings also implicate the LHB in the acquisition of avoidance learning (Shumake et al., 2010) and in cocaine-induced plasticity of VTA neurons (Friedman et al., 2010). Because the RMTg is the dominant terminal field of the LHB and also because of its rich connections to serotonergic and dopaminergic cell groups (present findings; Herkenham and Nauta, 1979; Jhou et al., 2009a,b; Kim, 2009; Balcita-Pedicino et al., 2011), it is likely that the RMTg contributes to at least some of the functions attributed to the LHB. However, its role in distinct behaviors and pathologies should clearly be challenged by further studies exploring specific RMTg functions (Jhou et al., 2009a; Lecca et al., 2010; Kaufling et al., 2010). Our findings on its topographical position might be helpful to target the RMTg in future lesion and pharmacological manipulation studies. Moreover, the stria medullaris, the major afferent bundle of the LHB, has become a promising structure for deep brain stimulation treatment of major depression (Sartorius and Henn, 2007; Sartorius et al., 2010). The present detailed findings about the topographical character of major descending LHB outputs might aid in targeting specific circuits in future deep brain stimulation trials.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ana M.P. Campos for expert technical assistance, Roberto Cabado Modia Junior for help with confocal microscopy procedures, and Prof. Sara Shammah-Lagnado for many fruitful discussions and critical reading of the manuscript.

LITERATURE CITED

- Amat J, Sparks PD, Matus-Amat P, Griggs J, Watkins LR, Maier SF. 2001. The role of the habenular complex in the elevation of dorsal raphe nucleus serotonin and the changes in the behavioral responses produced by uncontrollable stress. *Brain Res* 917:118–126.
- Andres KH, von Düring M, Veh RW. 1999. Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *J Comp Neurol* 407: 130–150.
- Araki M, McGeer PL, McGeer EG. 1984. Retrograde HRP tracing combined with a pharmacohistochemical method for

- GABA transaminase for the identification of presumptive GABAergic projections to the habenula. *Brain Res* 304: 271–277.
- Araki M, McGeer PL, Kimura H. 1988. The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method. *Brain Res* 441:319–330.
- Aston-Jones G, Rajkowski J, Cohen J. 2000. Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention. *Prog Brain Res* 126:165–182.
- Balcita-Pedicino JJ, Omelchenko N, Bell R, Sesack SR. 2011. 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* 519:1143–1164.
- Brinschwitz K, Dittgen A, Madai VI, Lommel R, Geisler S, Veh RW. 2010. Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168:463–476.
- Brischoux F, Chakraborty S, Brierley DI, Ungless MA. 2009. Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4894–4899.
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O. 2010. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* 68:815–834.
- Caldecott-Hazard S, Mazziotta J, Phelps M. 1988. Cerebral correlates of depressed behavior in rats, visualized using ¹⁴C-2-deoxyglucose autoradiography. *J Neurosci* 8: 1951–1961.
- Chen S, Aston-Jones G. 1995. Evidence that cholera toxin B subunit (CTb) can be avidly taken up and transported by fibers of passage. *Brain Res* 674:107–111.
- Christoph GR, Leonzio RJ, Wilcox KS. 1986. Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J Neurosci* 6:613–619.
- Cliffer KD, Giesler GJ Jr. 1988. PHA-L can be transported anterogradely through fibers of passage. *Brain Res* 458: 185–191.
- Colussi-Mas J, Geisler S, Zimmer L, Zahm DS, Berod A. 2007. Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: a double-labelling study. *Eur J Neurosci* 26:1011–1025.
- Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT. 1990. Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain Res Bull* 25:271–284.
- Dado RJ, Burstein R, Cliffer KD, Giesler GJ Jr. 1990. Evidence that Fluoro-Gold can be transported avidly through fibers of passage. *Brain Res* 533:329–333.
- Devor M, Zalkind V. 2001. Reversible analgesia, atonia, and loss of consciousness on bilateral intracerebral microinjection of pentobarbital. *Pain* 94:101–112.
- Dittgen A, Gruber C, Geisler S, Zahm DS, Veh RW. 2006. Anterior and posterior parts of the rat ventral tegmental area receive topographically distinct afferents from the lateral habenular complex. *Soc Neurosci Abstr* 32:670.624.
- Erhardt S, Mathe JM, Chergui K, Engberg G, Svensson TH. 2002a. GABA(B) receptor-mediated modulation of the firing pattern of ventral tegmental area dopamine neurons in vivo. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365: 173–180.
- Erhardt S, Schwieler L, Engberg G. 2002b. Excitatory and inhibitory responses of dopamine neurons in the ventral tegmental area to nicotine. *Synapse* 43:227–237.
- Ferreira JG, Del-Fava F, Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ. 2008. Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience* 153:196–213.
- Friedman A, Lax E, Dikshtein Y, Abraham L, Flaumenhaft Y, Sudai E, Ben-Tzion M, Ami-Ad L, Yaka R, Yadid G. 2010. Electrical stimulation of the lateral habenula produces enduring inhibitory effect on cocaine seeking behavior. *Neuropharmacology* 59:452–459.
- Geisler S, Trimble M. 2008. The lateral habenula: no longer neglected. *CNS Spectr* 13:484–489.
- Geisler S, Zahm DS. 2005. Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J Comp Neurol* 490:270–294.
- Geisler S, Andres KH, Veh RW. 2003. Morphologic and cytochemical criteria for the identification and delineation of individual subnuclei within the lateral habenular complex of the rat. *J Comp Neurol* 458:78–97.
- Geisler S, Derst C, Veh RW, Zahm DS. 2007. Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci* 27:5730–5743.
- Geisler S, Marinelli M, Degarmo B, Becker ML, Freiman AJ, Beales M, Meredith GE, Zahm DS. 2008. Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 33: 2688–2700.
- Gerfen CR, Sawchenko PE. 1984. An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res* 290:219–238.
- Groenewegen HJ, Wouterlood FG. 1990. Light and electron microscopic tracing of neuronal connections with *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin (PHA-L), and combinations with other anatomical techniques. In: Björklund A, Hökfelt T, editors. *Analysis of neuronal microcircuits and synaptic interactions. Handbook of chemical neuroanatomy*, vol 8. Amsterdam: Elsevier.
- Groenewegen HJ, Berendse HW, Haber SN. 1993. Organization of the output of the ventral striatopallidal system in the rat: ventral pallidal efferents. *Neuroscience* 57: 113–142.
- Gruber C, Kahl A, Lebenheim L, Kowski A, Dittgen A, Veh RW. 2007. Dopaminergic projections from the VTA substantially contribute to the mesohabenular pathway in the rat. *Neurosci Lett* 427:165–170.
- Hancock MB. 1986. Two-color immunoperoxidase staining: visualization of anatomic relationships between immunoreactive neural elements. *Am J Anat* 175:343–352.
- Herkenham M, Nauta WJ. 1977. Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. *J Comp Neurol* 173:123–146.
- Herkenham M, Nauta WJ. 1979. Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 187:19–47.
- Hikosaka O. 2010. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci* 11: 503–513.
- Hikosaka O, Sesack SR, Lecourtier L, Shepard PD. 2008. Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *J Neurosci* 28:11825–11829.
- Holstege G. 1992. The emotional motor system. *Eur J Morphol* 30:67–79.
- Holstege G. 2009. The mesopontine rostromedial tegmental nucleus and the emotional motor system: role in basic survival behavior. *J Comp Neurol* 513:559–565.
- Holstege G, Kuypers HG. 1982. The anatomy of brain stem pathways to the spinal cord in cat. A labeled amino acid tracing study. *Prog Brain Res* 57:145–175.

- Holstege G, Mouton LJ, Gerrits MN. 2004. Emotional motor system. In: Paxinos G, Mai JK, editors. The human nervous system. Amsterdam: Elsevier.
- Hong S, Hikosaka O. 2008. The globus pallidus sends reward-related signals to the lateral habenula. *Neuron* 60: 720–729.
- Hong S, Jhou TC, Smith M, Saleem KS, Hikosaka O. 2011. Negative reward signals from the lateral habenula to dopamine neurons are mediated by rostromedial tegmental nucleus in primates. *J Neurosci* 31:11457–11471.
- Horvitz JC. 2000. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 96:651–656.
- Itoh K, Konishi A, Nomura S, Mizuno N, Nakamura Y, Sugimoto T. 1979. Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. *Brain Res* 175: 341–346.
- Jhou T. 2005. Neural mechanisms of freezing and passive aversive behaviors. *J Comp Neurol* 493:111–114.
- Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC. 2009a. The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61:786–800.
- Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS. 2009b. 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* 513:566–596.
- Ji H, Shepard PD. 2007. Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *J Neurosci* 27:6923–6930.
- Kauffling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M. 2009. Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 513:597–621.
- Kauffling J, Waltisperger E, Bourdy R, Valera A, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Barrot M. 2010. Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br J Pharmacol* 161:1677–1691.
- Kim U. 2009. Topographic commissural and descending projections of the habenula in the rat. *J Comp Neurol* 513: 173–187.
- Klemm WR. 2004. Habenular and interpeduncular nuclei: shared components in multiple-function networks. *Med Sci Monit* 10:RA261–273.
- Kowski AB, Geisler S, Krauss M, Veh RW. 2008. Differential projections from subfields in the lateral preoptic area to the lateral habenular complex of the rat. *J Comp Neurol* 507:1465–1478.
- Kowski AB, Veh RW, Weiss T. 2009. Dopaminergic activation excites rat lateral habenular neurons in vivo. *Neuroscience* 161:1154–1165.
- Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Ennas MG, Castelli MP, Muntoni AL, Pistis M. 2010. Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology* 36:589–602.
- Lecourtier L, Kelly PH. 2007. A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 658–672.
- Li YQ, Takada M, Shinonaga Y, Mizuno N. 1993. The sites of origin of dopaminergic afferent fibers to the lateral habenular nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 333:118–133.
- Lonstein JS, Simmons DA, Swann JM, Stern JM. 1998. Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. *Neuroscience* 82:267–281.
- Luppi PH, Fort P, Jouvét M. 1990. 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* 534:209–224.
- Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvét M. 1995. Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *Neuroscience* 65:119–160.
- Matsumoto M, Hikosaka O. 2007. Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447:1111–1115.
- Matsumoto M, Hikosaka O. 2009. Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat Neurosci* 12:77–84.
- Matthews-Felton T, Corodimas KP, Rosenblatt JS, Morrell JL. 1995. Lateral habenula neurons are necessary for the hormonal onset of maternal behavior and for the display of postpartum estrus in naturally parturient female rats. *Behav Neurosci* 109:1172–1188.
- Morris JS, Smith KA, Cowen PJ, Friston KJ, Dolan RJ. 1999. Covariation of activity in habenula and dorsal raphe nuclei following tryptophan depletion. *Neuroimage* 10:163–172.
- Olson VG, Nestler EJ. 2007. Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* 61:87–95.
- Omelchenko N, Bell R, Sesack SR. 2009. Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 30:1239–1250.
- Overton PG, Clark D. 1997. Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 25:312–334.
- Parent M, Levesque M, Parent A. 2001. Two types of projection neurons in the internal pallidum of primates: single-axon tracing and three-dimensional reconstruction. *J Comp Neurol* 439:162–175.
- Paxinos G, Watson C. 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th ed. San Diego: Elsevier.
- Perrotti LI, Bolanos CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Utery PG, Wallace DL, Self DW, Nestler EJ, Barrot M. 2005. DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* 21:2817–2824.
- Phillipson OT, Pycocock CJ. 1982. Dopamine neurones of the ventral tegmentum project to both medial and lateral habenula. Some implications for habenular function. *Exp Brain Res* 45:89–94.
- Quirk GJ, Sotres-Bayon F. 2009. Signaling aversive events in the midbrain: worse than expected. *Neuron* 61:655–656.
- Rajakumar N, Elisevich K, Flumerfelt BA. 1993. Compartmental origin of the striato-entopeduncular projection in the rat. *J Comp Neurol* 331:286–296.
- Ramón-Moliner E, Nauta WJH. 1966. The isodendritic core of the brainstem. *J Comp Neurol* 126:331–336.
- Sartorius A, Henn FA. 2007. Deep brain stimulation of the lateral habenula in treatment resistant major depression. *Med Hypotheses* 69:1305–1308.
- Sartorius A, Kiening KL, Kirsch P, von Gall CC, Haberkorn U, Unterberg AW, Henn FA, Meyer-Lindenberg A. 2010. Remission of major depression under deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient. *Biol Psychiatry* 67:e9–e11.
- Scammell TE, Estabrooke IV, McCarthy MT, Chemelli RM, Yanagisawa M, Miller MS, Saper CB. 2000. Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. *J Neurosci* 20:8620–8628.
- Scheibel ME, Scheibel AB. 1958. Structural substrates for integrative patterns in the brainstem reticular core. In: Jasper HH, Proctor LD, Knighton RS, Noshay WC, Costello RT,