## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

## **STEFANI DE MOURA SOUZA**

## "Caracterização das conexões intrínsecas entre os núcleos dorsal e mediano da rafe e a região supralemniscal do rato"

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo 2019

#### **STEFANI DE MOURA SOUZA**

"Caracterização das conexões intrínsecas entre os núcleos dorsal e mediano da rafe e a região supralemniscal do rato"

> Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana Orientador: Prof. Dr. Martin Andreas Metzger Versão corrigida

São Paulo 2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Souza, Stefani de Moura Caracterização das conexões intrínsecas entre os núcleos dorsal e mediano da rafe e a região supralemniscal do rato / Stefani de Moura Souza; orientador Martin Andreas Metzger. -- São Paulo, 2019. 59 p. Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Núcleos da rafe. 2. Serotonina. 3. Distúrbios afetivos. 4. Rastreamento neural. I. Metzger, Martin Andreas , orientador. II. Título.

#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Stefani de Moura Souza

Título da Dissertação: Caracterização das conexões intrínsecas entre os núcleos dorsal e mediano da rafe e a região supralemniscal do rato

Orientador: Prof. Dr. Martin Andreas Metzger

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada ......, considerou a candidata:

( ) Aprovada ( ) Reprovada

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



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.028/2017

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 153/2012/CEUA, datado de 23/10/2012, renovado até 23/10/2020, e por solicitação do Prof. Dr. **Martin Andreas Metzger**, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Stefani de Moura Souza** ao Projeto de Pesquisa "*Circuitaria e assinatura neuroquímica das conexões de grupamentos monoaminérgicos no mesencéfalo e rombencéfalo do rato*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 06 de março de 2017.

IIIIA

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes** Coordenador da CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.094.16

São Paulo, 14 de outubro de 2016.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "*Circuitaria e assinatura neuroquímica das conexões de grupamentos monoaminérgicos no mesencéfalo e rombencéfalo do rato* ", registrado sob o protocolo nº **153/2012** e aprovado em 23/10/2012 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 23/10/2020**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Rattus norvegicus	Wistar	Macho	120 g	1º: 20
				2º: 20
				3º: 20
				4º: 20

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Bures

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Martin Andreas Metzger** Departamento de **Fisiologia e Biofísica** Instituto de Ciências Biomédicas - USP

#### DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe Luzinete Dias De Moura, por ter me apoiado e me acompanhado durante todo esse processo, sobretudo, por sempre ter acreditado em mim nos meus momentos de vulnerabilidade, e principalmente, por ser o meu maior exemplo de pessoa no mundo.

Quero que saiba que, "diante da vastidão do tempo e da dimensão do universo, é um imenso prazer para eu dividir uma época e um planeta com você." (Carl Sagan)

Você é a minha pessoa favorita no mundo, e todas as minhas conquistas serão sempre dedicadas a você.

Obrigada por ter me dado a vida e por compartilhar sem por que nem para que, a sua sabedoria.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeco, o meu orientador Martin Andreas Metzger, por ter me concedido a oportunidade de ingressar no Mestrado. Agradeço em especial, os meus tios e tias, Elizabeth, Maria da Conceição e Iramar, por terem me apoiado nos momentos em que eu mais precisei vocês me mostraram que até os tropecos empurram a gente pra frente. Aos meus primos Erik de Moura, Karoline Elizabeth, Filipe Eduardo e Guilherme Henrique, pela paciência e pelo companheirismo diário, com as risadas de vocês qualquer obstáculo da vida, com certeza, fica muito mais fácil. Aos meus melhores amigos Luana Maciel, Eduardo Rochaforte, Silvia Sangirotti, por disponibilizarem de graca pra mim algo que não se compra e nem se vende, que é imensurável, e que, sobretudo não existe, o tempo, não existe nada mais grandioso e valioso do que passar "um tempo" da sua vida com alguém, esse, com certeza foi o maior presente que eu já recebi, levo todos vocês no meu pensamento. Gisele Couto, Monique Patricio Singulani e Monique de Paula, vocês fazem parte daqueles encontros mágicos da vida, meu coração transborda de alegria quando estou com vocês, gratidão por absolutamente tudo o que vocês já fizeram e ainda fazem por mim. E além de gratidão, tenho um enorme apreço e respeito por todos os Professores do Departamento do ICB, todos vocês apresentam um conhecimento exímio que dispensa qualquer legenda, aprendi muito com vocês. E, por fim, os meus agradecimentos vão para os amigos de laboratório, por terem sido tão atenciosos e cuidadosos em todos os momentos.

Agradeço o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)- Número do processo 130271/2018-7. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica). Também agradeço a FAPESP - Número do processo 17/16473-9 pelo expressivo apoio financeiro cedido, o qual foi primordial para o desenvolvimento da dissertação do meu Mestrado.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografias mostrando a imunomarcação para serotonina (5-HT) em dois
níveis do núcleo dorsal da rafe26
Figura 2. Fotomicrografias mostrando a imunomarcação para serotonina em quatro níveis do
grupamento B927
Figura 3. Marcação retrógrada resultante da injeção de CTb no MnR29
Figura 4. Desenhos esquemáticos de neurônios retrogradamente marcados no DR30
Figura 5. Desenhos esquemáticos de neurônios retrogradamente marcados no grupamento B9
Figura 6. Marcação anterógrada resultante da injeção de PHA-L no MnR
Figura 7. Desenhos esquemáticos de axônios anterogradamente marcados no DR34
Figura 8. Marcação anterógrada no grupamento B9 resultante da injeção de PHA-L centrada
no MnR
Figura 9. Fotomicrografias da injeção de PHA-L centrada na região caudal do DRL36
Figura 10. Marcação anterógrada no grupamento B9 resultante da injeção de PHA-L centrada
no DRL
Figura 11. Fotomicrografias da dupla-marcação de imunofluorescência para VGLUT3 e 5-
HT no B9 e MnR
Figura 12. Fotomicrografias da dupla-marcação de imunofluorescência para 5-HT/CTb no
DR40
Figura 13. Imagens confocais da dupla-marcação de imunofluorescência para 5-HT/CTb no
DR
Figura 14. Imagem confocal da tripla-marcação de imunofluorescência para 5-
HT/VGLUT3/CTb no DR
Figura 15. Imagens confocais da tripla-marcação de imunofluorescência para 5-
HT/VGLUT3/CTb no DR
Figura 16. Imagens confocais da tripla-marcação de imunofluorescência para PHA-L/5-
HT/VGLUT3 no MnR45

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Casos usados para análise	20
Tabela 2. Lista de anticorpos primários usados	21
Tabela 3. Lista de anticorpos secundários usados	22
Tabela 4. Porcentagens das células expressando 5-HT e/ou VGLUT3 no B9 e no MnR	38

#### **RESUMO**

De Moura Souza, S. **Caracterização das conexões intrínsecas entre os núcleos dorsal e mediano da rafe e a região supralemniscal do rato.** 2019. 59 f, Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A maioria dos neurônios serotonérgicos no cérebro é contido em três grandes grupamentos diferentes, estão presentes nos núcleos dorsal da rafe (DR), no núcleo mediano (MnR) da rafe, e também na região supralemniscal, designada grupamento B9. O DR e MnR foram implicados em uma gama de funções fisiológicas, e particularmente em diferentes respostas fisiológicas relacionada ao estresse. Devido a uma organização difusa, quando comparado com o DR e MnR, pouco é conhecido sobre as conexões e funções do grupamento B9. Apenas poucos dados na literatura indicam que o DR, o MnR e o B9 são interconectados reciprocamente. Contudo, acumulam evidências de que esses núcleos, tradicionalmente considerados serotonérgicos, na verdade, são altamente heterogêneos, apresentam populações de neurônios com fenótipos neuroquímicos, projeções, e propriedades eletrofisiológicas distintas. Porém, até o momento, o exato padrão das conexões intrínsecas entre o DR, o MnR e o B9, assim como o fenótipo neuroquímico dos neurônios dando origem a eles, ainda não foram investigados de forma sistemática. Desta forma, visamos nesse estudo investigar através de métodos de rastreamento neural combinados com métodos de imunofluorescência, a exata topografia e o fenótipo neuroquímico das conexões entre o DR, o MnR e o grupamento B9. As injeções dos traçadores retrógrados e anterógrados no DR e MnR, revelaram que eles são interconectados de forma recíproca. Identificamos as asas laterais do DR (DRL) como a principal fonte das projeções do DR para o MnR e B9, como também, o principal alvo de axônios provenientes do MnR. Através da dupla-marcação para serotonina (5-HT) e para o transportador vesicular de glutamato do tipo 3 (VGLUT3), verificamos que no MnR e no grupamento B9, apenas 50% dos neurônios imunomarcados exibem um fenótipo serotonérgico. As combinações de rastreamento retrógado com imunofluorescência para 5-HT e/ou VGLUT3 revelaram que 95% das aferências do DR para o MnR foi originada de neurônios não-serotonérgicos e não-glutamatérgicos nas asas laterais (DRL). Além disso, poucos neurônios glutamatérgicos, serotonérgicos, ou com um fenótipo misto em outras subregiões do DR contribuíram para as projeções do DR para o MnR. Esses resultados indicam que o DR, o MnR e o B9 são interconectadas de forma recíproca, destacam o DRL como a principal fonte e alvo dessas projeções intrínsecas, e caracterizam ainda mais o DR, MnR e o B9 como grupamentos altamente heterogêneos, apresentando vários tipos de neurônios com fenótipos neuroquímicos distintos.

Palavras chave: Núcleos da rafe. Serotonina. Distúrbios afetivos. Rastreamento neural.

#### ABSTRACT

De Moura Souza, S. **Characterization of the intrinsic connections between the dorsal and median raphe nuclei, and the supralemniscal region of the rat**. 2019. 59 p. Master Thesis (Physiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The majority of serotonergic neurons in the brain are confined to three large distinct cell groups, the dorsal (DR) and median (MnR) raphe nuclei, and a supralemmiscal region, termed B9 cell group. DR and MnR have been implicated in a vast array of physiological functions and specifically in distinct physiological responses to stress. Due to its more diffuse organization in comparison to DR and MnR, little is known about the connections and functions of the B9 cell group. There are only few data in the literature describing that DR, MnR, and B9 are interconnected reciprocally. Moreover, evidence is accumulating that these nuclei traditionally considered as serotonergic, in fact are highly heterogeneous, consisting of cell populations with distinct transmitter phenotypes, connections, and electrophysiological properties. However, till vet the exact pattern of the intrinsic connections between DR, MnR, and B9, as well as the transmitter phenotype of the neurons which give rise to them, were not investigated systematically. Thus, in the present study, we examined by neuronal tracing, combined with immunofluorescence techniques the exact topography and transmitter phenotype of the projections between DR, MnR, and B9. Injections of retrograde and anterograde tracers into the DR and MnR revealed that these regions are robustly interconnected reciprocally. We identified the lateral wings of the DR (DRL) as the principal source of DR projections to the MnR, and B9, as well as the primary target of axons arising from MnR. By double-staining for serotonin (5-HT) and the type 3 vesicular glutamate transporter (VGLUT3) we verified that only about 50% of the immunostained neurons exhibit a purely serotonergic phenotype. By combining retrograde tracing with immunofluorescence staining for 5-HT and/or VGLUT3 we revealed that about 95% of the DR afferents to MnR arose from non-serotonergic, non-glutamatergic DRL neurons, In addition, only few purely glutamatergic, purely serotonergic, or neurons with a mixed phenotype in other DR subregions contributed to DR projections to the MnR. These findings indicate that DR, MnR, and B9 are amply interconnected reciprocally and highlight the DRL as the principal source and target of these intrinsic connections. They also further characterize DR, MnR, and B9 as highly heterogeneous cell groups, which contain various types of neurons with distinct transmitter phenotypes.

Key words: Raphe nuclei. Serotonin. Affective disorders. Neuronal tracing.

## ABREVIAÇÕES

5-HT	serotonina
Aq	aqueduto
<b>B9</b>	grupamento serotonérgico na região supralemniscal
Bar	núcleo de Barrington
CLi	núcleo caudal linear da rafe
ср	pedúnculo cerebral
CTb	subunidade b da cólera-toxina
DMTg	área tegmental dorsomedial
DR	núcleo dorsal da rafe
DRC	núcleo dorsal da rafe, região caudal
DRD	núcleo dorsal da rafe, região dorsal
DRDC	DRD, cerne
DRDCe	DRD, região central
DRDSh	DRD, concha
DRL	núcleo dorsal da rafe, região lateral
DRR	núcleo dorsal da rafe, região rostral
DRV	núcleo dorsal da rafe, região ventral
DTgP	núcleo tegmental dorsal, região pericentral
GLU	glutamato
IP	núcleo interpeduncular
LC	locus coeruleus
LDTg	núcleo tegmental laterodorsal
LDTgV	núcleo tegmental laterodorsal, região ventral
LPAG	substância cinzenta periaquedutal, região lateral
ml	lemnisco medial
mlf	fascículo longitudinal medial
MnR	núcleo mediano da rafe
NIc	núcleo incerto, região compacta
NId	núcleo incerto, região difusa
PaR	núcleo pararubral
PDTg	núcleo tegmental, região posterodorsal
PHA-L	Phaseolus vulgaris leucoaglutinina
PMnR	núcleo paramediano da rafe

núcleo pontino reticular, região oral PnO PVP núcleo paraventricular do tálamo, região posterior RMTg núcleo tegmental rostromedial substância negra, região compacta SNc substância negra, região reticular SNR Sph núcleo esferóide **VGLUT3** transportador de glutamato do tipo 3 substância cinzenta periaquetudal, região ventrolateral VLPAG VTA área tegmental ventral xscp decussação do pedúnculo cerebelar

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVO	18
3.	MATERIAL E MÉTODOS	19
	3.1 Animais	19
	3.2 Experimentos de rastreamento retrógrado e anterógrado	19
	3.3 Perfusão e microtomia	20
	3.4 Anticorpos e controle imunoistoquímicos	21
	3.5 Marcações de imunoperoxidase	22
	3.6 Marcações duplas de imunofluorescência	23
	3.7 Marcações triplas de imunofluorescência	23
	3.8 Análise de dados	24
	3.9 Nomenclatura	25
4.	RESULTADOS	28
	4.1 Injeções do traçador retrógrado no MnR: aferências do DR para o MnR	28
	4.2 Injeções do traçador retrógrado no MnR: aferências do B9 para o MnR	31
	4.3 Injeções do traçador anterógrado no MnR: eferências do MnR para o DR e B9	32
	4.4 Injeções do traçador anterógrado no DRL: eferências do DRL para o MnR e B9	36
	4.5 Dupla marcação para 5-HT/VGLUT3 no grupamento B9 e no MnR	38
	4.6 Fenótipo neuroquímico das projeções do DR para o MnR e do B9 para o Mn	R:
	Dupla marcação para 5-HT/CTb e 5-HT/PHA-L	40
	4.7 Fenótipo neuroquímico das projeções entre DR e MnR: tripla marcação para	5-
	HT/CTb/VGLUT3 e 5-HT/PHA-L/VGLUT3	42
5.	DISCUSSÃO	46
	5.1 Topografia das conexões entre o DR, MnR e B9	46
	5.2 Fenótipos neuroquímicos dos neurônios no B9 e MnR	47
	5.3 Fenótipo neuroquímico dos neurônios que contribuem para projeções intrínseca	ıs
49		
	5.4 Implicações funcionais	50
REF	ERÊNCIAS	53

#### 1. INTRODUÇÃO

A Serotonina (5-HT) é o neuromodulador que apresenta a maior distribuição no SNC (DAHLSTROM & FUXE; 1964; STEINBUSCH, 1981), apresentam axônios serotonérgicos que inervam quase todas as estruturas cerebrais (JACOBS; AZIMITA, 1992). Além disso, vários outros órgãos periféricos como os sistemas cardiovascular, pulmonar e gastrointestinal apresentam grandes quantidades de 5-HT (BERGER; GRAY; ROTH, 2009). A 5-HT atua em pelo menos 14 diferentes tipos de receptores, onde são agrupados em sete famílias que se baseiam em diferentes mecanismos de sinalização (BARNES; SHARP, 1999; NICHOLS 2008; FILIP; BADER, 2009). Desses diferentes tipos de receptores serotonérgicos, o receptor 5-HT1A e 5-HT2A são particularmente relevantes, porque eles apresentam funções opostas (CARHART-HARRIS; NUTT, 2017), e estão envolvidos no tratamento farmacológico dos distúrbios psiquiátricos (ARTIGAS, 2013). No sistema nervoso central, a 5-HT tem sido implicada em diversas funções, incluindo a regulação do humor, do sono, do apetite e também do controle neurovegetativo (GASPAR; LILLESAAR, 2012). A 5-HT apresenta também, um importante papel trófico durante o desenvolvimento da circuitaria cerebral (GASPAR; CASES; MAROTEAUX, 2003). A distribuição dos neurônios serotonérgicos é conhecida desde estudos pioneiros de Dahlstroem e Fuxe (1964) que descreveram nove grupamentos diferentes de neurônios serotonérgicos, denominados alfanumericamente como B1-B9. Os grupamentos caudais B1-B3, inervam essencialmente a medula espinal, os grupamentos rostrais B4-B9 fazem projeções principalmente ascendentes (TORK, 1990). A maioria dos neurônios serotonérgicos no cérebro é contido em três grupamentos diferentes, estão presentes no núcleo dorsal da rafe (DR), no núcleo mediano da rafe (MnR), e também no grupamento serotonérgico localizado na região supralemniscal (DAHLSTROEM; FUXE 1964; VERTES; CRANE, 1997; HALE; SHEKHAR; LOWRY, 2012). Esses grupamentos foram denominados B6 (região caudal do DR), B7 (DR), B5/B8 (MnR) e B9 (região supralemniscal) por Dahlstorem e Fuxe (1964). O DR e MnR (Fig. 1) foram implicados em diversas funções fisiológicas (MICHELSEN; SCHMITZ; STEINBUSCH, 2007; BERGER; GRAY; ROTH, 2009), particularmente na regulação de estados mentais como ansiedade, controle fisiológico do humor, impulsividade e agressividade (REN et al., 2019). O DR e o MnR, parecem ser relevantes para diferentes respostas fisiológicas relacionadas ao estresse e punições, como também para o processamento de eventos aversivos (GRAEFF et al., 1996; MAIER; WATIKINS, 2005; DAYAN; HUYS, 2009; TEISSIER et al., 2015). Tanto o DR quanto o MnR, parecem desempenhar funções diferenciadas na regulação da ansiedade e também dos distúrbios afetivos, a síndrome do pânico e a depressão maior são exemplos desses distúrbios

(ANDRADE; ZANGROSSI; GRAEFF, 2013; PAUL; LOWRY, 2013; TEISSIER et al., 2015). Assim, foi descrito que a ativação optogenética dos neurônios serotonérgicos do MnR, mas não dos neurônios serotonérgicos do DR são ansiogênicos (OHMURA et al., 2014). Tem sido proposto que desarranjos entre as atividades do DR e MnR podem estar na base da depressão maior (DEAKIN; GRAEFF 1991; LECHIN; VAN DER DIJS; HERNANDEZ-ADRIAN, 2006). O DR e o MnR, são as principais fontes de inervação serotonérgica do prosencéfalo e mesencéfalo mas emitem projeções essencialmente complementares (VERTES, 1991; VERTES; FORTIN; CRANE, 1999; MUZERELLE et al., 2016). Desta forma, o MnR é principalmente interligado de forma recíproca com estruturas ao longo da linha média, como o núcleo interpeduncular (IP), o núcleo supramamilar (SuM), o septo medial (MS), e o tegmento mesopontino (BEHZADI et al., 1990; VERTES; FORTIN; CRANE, 1999). O MnR, assim como todos os núcleos supracitados, são considerados estruturas chaves, envolvidos na regulação da atividade teta hipocampal (VERTES; KOCSIS, 1997; LIMA et al., 2017). Por outro lado, o DR projeta para um conjunto mais amplo de alvos, com destaque para densas projeções que inervam o córtex, o estriado dorsal e ventral, o septo lateral (LS), e a amigdala (VERTES; 1991; MUZERELLE, et al., 2016). Devido a uma organização difusa, quando comparado com o DR e MnR, pouco é conhecido sobre as conexões e funções do grupamento B9. Esse grupamento é formado por um conjunto de neurônios serotonérgicos espalhados que se estende bilateralmente em direção mediolateral em uma região extensa dorsal acima do lemnisco medial (Fig. 2). Apesar dessa organização difusa, o grupamento B9 apresenta uma quantidade significante de neurônios serotonérgicos que é somente menor que a do DR (VERTES; CRANE, 1997). As projeções do grupamento B9 foram descritas recentemente (MUZERELLE, et al., 2016). Em geral, os alvos do grupamento B9 são mais disseminados quando comparado ao DR e MnR, mas também incluem projeções para o DR e MnR (STRATFORD; WIRTSHAFTER, 1988; MUZERELLE, et al., 2016). Ainda é muito comum de se pensar que o sistema serotonérgico é um sistema homogêneo, que atua no mesmo conjunto de receptores (GASPAR; LILLESAAR, 2012). Porém, atualmente aumentam as evidências de que o DR é um núcleo altamente heterogêneo, composto por diferentes subnúcleos que apresentam subpopulações neuronais com conexões, propriedades morfológicas, eletrofisiológicas e neuroquímicas distintas (ABRAMS et al., 2005; CALIZO et al., 2011; KIYASOVA et al., 2011; GASPAR; LILLESAAR, 2012; FERNANDEZ et al., 2016; REN et al., 2018; OKATY; COMMONS; DYMECKI, 2019). Além de neurônios serotonérgicos, as diferentes sub-regiões do DR também apresentam uma notável quantidade de neurônios GABAérgicos, dopaminérgicos e principalmente

glutamatérgicos, com glutamato (GLU) sendo amplamente co-expresso com serotonina (HIOKI et al., 2010; SEGO et al., 2014). É importante evidenciar que, os neurônios glutamatérgicos na rafe são caracterizados pela expressão do transportador vesicular do GLU do tipo 3 (VGLUT3), enquanto os transportadores do tipo 1 (VGLUT1) e 2 (VGLUT2) estão ausentes (GRAS et al., 2002; HIOKI et al., 2010). A co-liberação de GLU e 5-HT pelos neurônios do DR, foi reconhecido apenas recentemente, e apresentam também grande relevância funcional (AMILHON et al., 2010), como ilustrado nas projeções do DR para a área tegmental ventral (QI, ZHANG et al., 2014; FISHER; ULLSPERGER, 2017). Além disso, um número expressivo de neuropeptídeos como o fator liberador de corticotrofina (COMMONS; CONNOLLEY; VALENTINO, 2003; FU et al., 2010) também estão presentes no DR. Por outro lado, no MnR as possíveis subdivisões não são reconhecidas tão facilmente quanto no DR. O complexo MnR/núcleo paramediano da rafe (MnR/PMnR) também expressam números elevados de neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos, além de neurônios com fenótipo neuroquímico desconhecido (HIOKI et al., 2010, SOS et al., 2017). Semelhante ao DR (HIOKI et al., 2010), a 5-HT no MnR também é co-localizado com VGLUT3, mas quase nunca com GABA (SOS et al., 2017). Contudo, aumentam as evidências de que os subnúcleos do DR diferem em relação à sua conectividade, e são seletivamente envolvidos na fisiopatologia dos distúrbios afetivos como, a depressão maior e a ansiedade (COMMONS; CONNOLLEY; VALENTINO, 2003; LOWRY et al., 2008; HALE; LOWRY, 2011; SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI Jr, 2012). Além disso, recentes estudos hodológicos indicaram que o terço caudal do DR (DRC ou grupamento B6) possui conexões que são muito mais parecidas com aquelas do MnR, do que aquelas dos dois terços rostrais do DR (GONÇALVES et al., 2012; SEGO et al., 2014; COMMONS, 2016; LIMA et al., 2017). Essa noção também é corroborada por estudos anatômicos, correlacionando a expressão de 5-HT com a de marcadores moleculares para a segmentação do mesencéfalo e rombencéfalo (ALONSO et al., 2013). Existem apenas dados isolados na literatura indicando que o DR, o MnR e o grupamento B9 são interconectados de forma recíproca (STRATFORD; WIRTSHAFTER, 1988; VERTES, 1991; TISCHLER; MORIN, 2003; MUZERELLE et al., 2016). Portanto, até o momento não existe um estudo explorando as conexões intrínsecas entre esses grupamentos de forma sistemática. E, os dados existentes de mapeamento neural dessas conexões intrínsecas, em sua maioria, utilizaram traçadores pouco sensíveis e não detalharam o fenótipo neuroquímico dos neurônios de origem e dos neurônios alvos dessas conexões.

#### 2. OBJETIVO

Devido aos fatos citados acima, o principal objetivo do presente projeto é investigar através de métodos de rastreamento neural combinados com métodos de imunohistoquímica, em detalhe, a topografia e fenótipo neuroquímico das interconexões entre DR, MnR e o grupamento B9.

Na análise dos dados, atenção especial é dada à organização subnuclear do DR pelo fato de que todos os grupamentos investigados são compostos por subpopulações neuronais distintas que diferem a respeito do seu fenótipo neuroquímico. Desta forma, visamos nos nossos experimentos esclarecer tanto o fenótipo dos neurônios de origem como dos neurônios alvos das conexões intrínsecas investigadas. Conhecimentos detalhados sobre as interconexões entre o DR, MnR e o grupamento B9 podem contribuir para um melhor entendimento do papel funcional das sub-regiões da rafe que estão envolvidas na regulação da ansiedade e também dos transtornos afetivos como a depressão maior.

#### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Os experimentos foram realizados em ratos machos adultos albinos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com peso entre 210 a 250 g, criados no Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas I – USP, mantidos sob temperatura constante (21±2°C), iluminação em ciclo de 12 horas e água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos seguiram o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB – USP (Protocolo nº 153/2012, renovado até 23/10/2020) e os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelo "Guia de Uso de Animais em Pesquisas" do National Institutes of Health (NIH publicação No. 80-23, revisão 1996).

#### 3.2 Experimentos de rastreamento retrógrado e anterógrado

Os animais foram profundamente anestesiados pela administração subcutânea de um coquetel anestésico contendo xilazina (Syntec; 1 mg/100 g de peso corporal) e ketamina (Syntec; 5 mg/100 g de peso corporal). Depois de anestesiados os ratos foram posicionados em um instrumento estereotáxico Kopf. Foi realizado tricotomia na região craniana e pequenas trepanações foram feitas com uma broca odontológica. Através deste orifício, pipetas de vidro com diâmetro interno de 10 a 15 µm previamente confeccionadas em estirador de pipetas (Kopf, California) foram inseridas no tecido cerebral. Foram utilizados neste estudo o traçador anterógrado Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L, Vector Laboratories, Burlingame, CA, 2.5 % em 0,01M tampão fosfato, PB) e o traçador retrógrado da subunidade b da cólera-toxina (CTb low salt; List Biological Lab, Campell, CA, 1 % em água destilada). Os dois traçadores foram depositados através de injeções iontoforéticas. O primeiro grupo de ratos recebeu injeções de CTb centrada no MnR. O segundo grupo recebeu injeções unilaterais de PHA-L no DRL (hemisfério direito), e o terceiro grupo recebeu injeções de CTb e/ou PHA-L no MnR (Tabela 1). Os traçadores foram injetados por meio de uma corrente elétrica positiva pulsada (10 segundos "on"/10 segundos "off") de 4 µA no caso de PHA-L e 5 µA no caso de CTb. Em três ratos que receberam injeções de PHA-L no MnR (RD33, RD34, RD59), PHA-L foi injetado como descrito acima, exceto que uma corrente positiva contínua foi usada. As coordenadas estereotáxicas para as injeções no MnR foram inicialmente adquiridas através do atlas de Paxinos e Watson (2007), para o MnR (AP: 7,1 mm; ML: 0,0 mm; DV: -7,6 mm), e refinadas empiricamente de acordo com nossas injeções anteriores. Após a injeção, a micropipeta foi mantida em posição por pelo menos 1 minuto e

uma corrente negativa foi aplicada para minimizar o fluxo retrógrado de traçador pelo rastro da pipeta.

**Observação:** A maior parte dos casos analisados no presente estudo foi constituída por um acervo de encéfalos já existentes em nosso laboratório que já haviam recebido injeções de CTb ou PHA-L em alguns dos alvos desse estudo anteriormente. Esses encéfalos já foram cortados para outros estudos e as séries de cortes foram armazenadas em solução anticongelante. Para minimizar o número de animais sacrificados, analisamos esses casos e paralelamente injetamos novos casos.

Traçadores e local de injeção	Total $n = 13$	Casos analisados
PHA-L – MnR	6	RD33, RD34, RD59
CTb – MnR	5	RD32, RD60, RD80; RD81
PHA-L - DRL	2	RD85, RD87

Tabela 1. Casos usados para análise.

#### 3.3 Perfusão e microtomia

Após uma sobrevida de 7 dias (CTb) ou 10 dias (PHA-L) os ratos foram profundamente anestesiados através de uma injeção subcutânea, foi utilizado um coquetel contendo xilazina e cetamina de acordo com o peso corpóreo. Após verificação do grau de anestesia, eles foram perfundidos transcardiacamente com 100 ml de solução de salina a 0,9%, seguida de uma solução de 500 ml de formaldeído a 4% (adquirido a partir de paraformaldeídeo aquecido a 60-65°C) em tampão fosfato de sódio (PB) a 4°C. A partir disso, os encéfalos foram removidos do crânio e pós-fixados por 2 horas. Os casos que foram usados para rastreamento anterógrado, os encéfalos foram armazenados overnight a 4°C em uma solução de crioproteção de 0,02M KPBS, pH 7,3. Para os casos que foram usados para rastreamento retrógrado, os procedimentos adotados foram em condições de livres de RNase (RNAasefree), pois uma parte dos cortes seria posteriormente usado para experimentos de hibridização in situ. No dia seguinte os encéfalos foram seccionados no plano coronal em micrótomo de congelamento (espessura 40 µm), e coletados em 4 séries em solução anticongelante. Em todos os casos, uma das séries dos cortes foi colecionada em solução de azida de sódio a 0,02% em tampão fosfato de potássio (KPBS) e corada com tionina (Sigma) para a avaliação dos limites das injeções e das regiões imunomarcadas. Em geral, uma das séries foi

processada pelo método de imunoperoxidase para CTb ou PHA-L. Nos ratos que receberam injeções de CTb ou PHA-L no MnR, uma outra série de cortes do tegmento mesopontino, foi processado pela técnica de dupla imunofluorescência para CTb/5-HT, PHA-L/5-HT e pela técnica de tripla imunofluorescência para CTb/5-HT/VGLUT3.

#### 3.4 Anticorpos e controles imunoistoquímicos

Todos os anticorpos primários usados no presente estudo (ver Tabela 2) já foram utilizados em estudos prévios e suas especificidades foram reveladas no encéfalo de rato por análise por Western Blot e em experimentos de pré-incubação com seu imunógeno. Todos os anticorpos primários e secundários (ver Tabela 3), também já foram testados em nosso laboratório e suas diluições já foram determinadas.

Antígeno	Imunogênio	Empresa	Diluições		
7 unitgenio	indiogenio	Empresa	IPe	IF	
5-HT	Serotonina acoplada a albumina de soro bovino (BSA) com paraformaldeído	Immunostar, (Hudson, WI), #200800, produzido em coelho, policlonal	1:80.000	1:40.000	
CTb	Toxina purificada do Vibrião da cólera	List, (Campell, CA), #104, produzido em cabra, policlonal	1:10.000	1:10.000	
PHA-L	Lectina purificada do Phaseolus vulgaris	DAKO, (Carpinteria, CA), #B275, produzido em coelho, policlonal	1:5.000	1:2.500	
PHA-L	Lectina purificada do Phaseolus vulgaris	Vector, (Burlingame, CA), #AS2224, produzido em cabra, policlonal		1:2.500	
VGLUT3	Peptídeo sintético do rato VGLUT3 (aa 569-588)	Millipore, (Temecula, CA), #AB5421, produzido em porquinho da índia, policlonal		1:2.000	

**Tabela 2.** Lista de anticorpos primários usados. Abreviações: 5-HT, serotonina; CTb, subunidade b da cóleratoxina; IF, imunofluorescência; IPe, imunoperoxidase; PHA-L, *Phaseolus vulgaris* leucoaglutinina; VGLUT3, transportador de glutamato do tipo 3.

Conjugado	Anti-	Produzido	Empresa	Diluições	
com	com e		Linpiesa _	IPe	IF
Biotina	Coelho	Cabra	Vector (Burlingame,	1.200	
Diotina	Coemo	Cabla	CA) #BA-1000	1.200	
Dicting	Cabra	Durro	Jackson (West Grove,	1.4 000	
Diotilla	Cabra	Burro	PA), #705-065-147	1.4.000	
A 1 avo 199	Coolho	Dumo	Jackson (West Grove,		1.500
Alexa400	Coelho	Burro	PA) #711-546-152		1:300
$A_{1} = -647$	Coolho	Dumo	Jackson (West Groove,		1.500
Alexa64/	Coemo	Bullo	PA) #711-605-152		1:300
Alere 504	Cabra	Daama	Jackson (West Grove,		1.500
Alexa394	Cabra	Bullo	PA) #705-586-147		1:300
Alexa488	Porquinho	Daama	Jackson (West Grove,		1.500
	da Índia	DuITO	PA) #706-585-148		1:500

Tabela 3. Lista de anticorpos secundários usados. Abreviações: IF, imunofluorescência; IPe, imunoperoxidase.

#### 3.5 Marcações de imunoperoxidase

As etapas de lavagem e incubação foram realizadas em cortes com livre flutuação em temperatura ambiente. Os cortes foram pré-tratados com 1% boroidreto de sódio (Sigma, Deisenhofen, Alemanha) em PB (10 minutos), seguido de lavagem em PB e pré-incubação em 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PB contendo 10% metanol (10 –15 minutos). Os cortes foram então lavados 3 vezes em PB e em seguida pré-incubados durante 30 minutos em PB contendo soro normal a 2% (Jackson) proveniente da espécie em qual foi gerado o anticorpo secundário. Os cortes foram depois incubados durante 72 horas a 4°C com soluções dos respectivos anticorpos primários (ver Tabela 2) diluídos em PB contendo soro normal a 1% proveniente da espécie em qual foi gerado o anticorpo secundário e Triton X-100 a 0,3%.

Os cortes foram lavados novamente em PB e depois incubados durante 2 horas nos respectivos anticorpos secundários biotinilados (ver Tabela 3). Após lavagens em PB, os cortes foram incubados por 2 horas em um kit ABC (ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Depois de outras lavagens em PB, o produto da reação de peroxidase foi visibilizado pelo procedimento de glicose oxidase (ITOH *et al.*, 1979) e o 3,3'-diamenobenzidine (DAB) tetrahidrocloreto sem metal como cromógeno (para demais detalhes, veja Shammah-lagnado e Santiago (1999). Após uma última lavagem em PB, os

cortes foram montados em lâminas gelatinizadas. Para intensificação da marcação, as lâminas foram finalmente mergulhadas em uma solução de tetróxido de ósmio a 0,05% por um período de 15 a 20 segundos e depois desidratadas em concentrações crescentes de etanol, transferidos para xilol e cobertas com DPX (Sigma).

Tanto CTb (LUPPI; FORT; JOUVET, 1990) quanto PHA-L (GERFEN; SAWCHENKO, 1984) foram processados pelos métodos de imunoperoxidase (IPe), como descrito acima. No caso do PHA-L, a solução bloqueadora com soro normal a 2% foi omitida e os cortes foram incubados diretamente na solução do anticorpo primário em PB, contendo leite desnatado a 10% (Nestlé) e Triton X-100 a 0,3%.

#### 3.6 Marcações duplas de imunofluorescência

Através da técnica de imunofluorescência (IF) realizamos dois diferentes tipos de marcações duplas de imunofluorescência: 1) CTb/5-HT e 2) PHA-L/5-HT. A primeira deles visa esclarecer um possível fenótipo serotonérgico dos neurônios do DR que se projetam para o MnR e a segunda é para identificar, se os axônios do MnR que inervam o DR possuem um fenótipo serotonérgico. As etapas de lavagem e incubação foram realizadas em cortes imersos em solução a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados por 3 vezes em PB e depois foram pré-incubados em 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PB contendo 10% álcool metílico por 30 minutos, seguido de mais lavagens em PB. Então, os cortes foram pré-incubados durante 30 minutos em PB contendo soro normal de burro a 2% (Jackson). Os cortes foram incubados durante 72 horas a 4°C em um "coquetel" de dois anticorpos primários (ver Tabela 2) em PB, contendo soro normal de burro a 1% e Triton X-100 a 0,3%. Para esse "coquetel" foi usado a combinação de anti-coelho Alexa 488/anti-cabra Alexa 594 (ver Tabela 3).

Após lavagens finais em 0,05M Tris-HCL, os cortes foram montados em lâminas microscópicas gelatinizadas, cobertos com lamínulas usando uma solução "slow-fade" (MOLECULAR PROBES), e finalmente foram selados com esmalte de unha. Vários controles foram realizados, incluindo a omissão de um ou dois anticorpos primários, omissão de um ou dois 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 2 anticorpos primários, na ausência total de marcação de fluorescência.

#### 3.7 Marcações triplas de imunofluorescência

A fim de verificar se neurônios com um fenótipo neuroquímico glutamatérgico (VGLUT3+/5-HT-) ou com um fenótipo misto (5-HT+/VGLUT3+) contribuem para as conexões intrínsecas entre os núcleos DR e MnR, assim como o grupamento B9, realizamos marcações triplas de imunofluorescência para CTb/5-HT/VGLUT3. Os cortes foram lavados e pré-incubados como descrito acima. Os cortes foram então incubados durante 72 horas a 4°C em um "coquetel" de três anticorpos primários (ver Tabela 2) em PB, contendo soro normal de burro a 1% e Triton X-100 a 0,3%. Para esse "coquetel" foi usado a combinação de anti-coelho Alexa 647/anti-cabra Alexa 594/anti-porco da Índia 488 (ver Tabela 3).

#### 3.8 Análise de dados

Os cortes marcados pelas técnicas de IPe foram examinados ao microscópio óptico de campo claro e escuro com microscópio Zeiss Axioimager A1 (Zeiss, Muenchen, Alemanha). Os cortes marcados pela técnica de IF foram examinados com o mesmo microscópio sob iluminação de epifluorescência. Fotomicrografias digitais foram adquiridas usando uma câmera Zeiss Axiocam HRc (Zeiss). As imagens dos cortes de dupla IF foram adquiridas e analisadas com uso do software Axiovision (Zeiss), que permite a aquisição de imagens de diferentes canais de fluorescência e uma sobreposição subsequente destas imagens. Este software também foi usado para contagem de eventos e medidas.

A distribuição global das marcações anterógradas e retrógradas dos casos representativos foi mapeada usando o software Canvas (ACD Systems, Victoria, Canada, Version 9,0). Para esse propósito usamos fotografias tiradas com objetiva 5x em campo claro (marcação retrógrada) ou objetiva 10x em campo escuro (marcação anterógrada). Desenhos dos contornos das estruturas de interesse e plotagens das estruturas imunomarcadas foram feitos em cima dessas fotografias. As duplas- e tripla-marcações de imunofluorescência foram analisadas através de imagens adquiridas com o microscópio confocal (Zeiss LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha do CEFAP/ICB-USP). As imagens foram capturadas em um formato 2048 x 2048 pixels. Tipicamente foram capturados 8 imagens ao longo do eixo-Z usando objetivas de 10, 20, 40 ou100x. Os intervalos ao longo do eixo-Z variaram de 200 até 250 nm. O processamento das imagens foi realizado com o auxílio do software Zen (Zeiss, version 11.00.190).

A quantificação das populações neuronais com um fenótipo 5-HT+/VGLUT3-, VGLUT3+/5/HT-, VGLUT3+/5-HT+ no MnR/PMnR e no grupamento B9, foi realizado em

cortes de dupla-imunofluorescência para 5-HT/VGLUT3 distantes 160 µm entre si. Utilizamos entre 6 - 8 imagens no caso do MnR, e entre 12 - 14 imagens no caso do grupamento B9, ao longo do eixo rostro-caudal dessas estruturas foram capturados com objetiva de 20x no microscópio Zeiss Axioimager A1. Todas as células simples ou duplamente marcadas nitidamente em foco no MnR/PMnR foram plotados eletronicamente com o auxílio do software Axiovision (Zeiss, versão 4.8.2). Essa quantificação foi realizada em dois casos que não receberam injeções de traçador. Os dados foram tabelados com a ajuda do software Microsoft Excel (Versão 2010, Microsoft Corporation). A identificação de neurônios simples, dupla- ou triplamente marcados em cortes submetidos à duplaimunofluorescência para 5-HT/CTb ou a tripla-imunofluorescência para 5-HT/CTb/VGLUT3 em imagens confocais, foi realizada usando o mesmo software. As fotomicrografias foram processadas e montadas com o programa Adobe Photoshop (Versão 7.0). O equilíbrio de cor, contraste e brilho das imagens foram ajustados de maneira variável. O programa Canvas (ACD Systems, Victoria, Canada, Version 9,0) foi utilizado para desenhos dos contornos das estruturas investigadas, e a plotagem de neurônios ou axônios foram realizadas em cima das fotomicrografias.

#### 3.9 Nomenclatura

A nomenclatura utilizada no presente estudo é baseada no atlas de Paxinos e Watson (2007). Para os diferentes grupamentos serotonérgicos usamos a nomenclatura de Dahlstrom e Fuxe (1964). Esses autores distinguiram 9 diferentes grupamentos de neurônios serotonérgicos no sistema nervoso central. No presente trabalho, os seguintes grupamentos são de interesse:

Grupamento B6 = núcleo dorsal da rafe, região caudal

Grupamento B7 = núcleo dorsal da rafe, região anterior

Grupamento B8 = núcleo mediano da rafe

Grupamento B9 = neurônios serotonérgicos na região supralemniscal

Referente às subdivisões do DR adotamos a nomenclatura utilizada por Hioki *et al.* (2010), e ainda distinguimos uma sub-região adicional, o DRD central (DRDCe) que é pobre em neurônios serotonérgicos e foi descrito recentemente por Sego *et al.* (2014). Os grupamentos serotonérgicos analisados, assim como as subdivisões do DR são mostrados nas Figuras 1 e 2.



**Figura 1:** Fotomicrografias mostrando a imunomarcação para serotonina (5-HT) em dois níveis do núcleo dorsal da rafe (grupamento B7, **A**, **B**), assim como no nível da região caudal do DR (grupamento B6) e do núcleo mediano da rafe (B8). Em **B**, também é ilustrado as diferentes subdivisões do DR. Em (**D**, **E**), são fotomicrografias mostrando a imunomarcação para o transportador do glutamato do tipo 3 (VGLUT3, **D**) e a dupla-imunomarcação para 5-HT/VGLUT3 (**E**). Note em **B** e **E** que a sub-região central do DR (DRDCe) apresenta poucos neurônios serotonérgicos. Note também o expressivo número de neurônios duplamente marcados para 5-HT/VGLUT3 (indicado pela cor branca em **E**). Barra = 200 µm em A (vale para A - C) e 100 µm em D (vale para D, E). Para abreviações ver a lista.



**Figura 2:** Fotomicrografias mostrando a imunomarcação para serotonina em quatro níveis do grupamento B9 ao longo do eixo rostro-caudal. Repare a organização difusa desse grupamento. Barra = 400 µm em D (vale para A - D). Para abreviações ver a lista.

#### 4. **RESULTADOS**

#### 4.1 do traçador retrógrado no MnR: Aferências do DR para o MnR

Analisamos as aferências do DR para o MnR em quatro casos com injeção de CTb no MnR (RD 32, RD 60, RD80, RD81). O caso RD 60 foi escolhido para representar melhor o espectro das aferências do DR para o MnR. Esse caso teve a injecão restrita no MnR centrada na linha média (Fig. 3A). Consequentemente, a marcação resultante no DR e nas estruturas adjacentes foi essencialmente bilateral (Figs. 3B, C, Fig. 4). No nível do DR, essa injeção resultou em marcações densas no DR, na região ventrolateral da substância cinzenta periaquetudal (VLPAG) e no núcleo tegmental laterodorsal (LDTg), com neurônios retrogradamente marcados encontrados ao longo de todo eixo rostro-caudal dessas estruturas (Fig. 4). Porém, a distribuição das células retrogradamente marcadas no DR, não foi homogênea. Apenas poucas células CTb+ foram encontradas espalhadas na região rostral do DR (DRR), enquanto que na VLPAG adjacente, foi densamente marcado. Nos níveis médiorostro-caudais do DR, a maioria das células CTb+ foram aglomeradas nas asas laterais do DR (DRL), mas poucos neurônios CTb+ foram espalhados nas outras sub-regiões do DR, como a região dorsal (DRD) e ventral (DRV) do DR (Fig. 3C, 4B, C). A região caudal do DR (DRC) foi moderadamente marcada, e um grande número de células CTb+ foram encontrados no LDTg e na VLPAG adjacente (Fig. 4D). Em todos os outros três casos com injeção de CTb no MnR, a marcação retrógrada foi essencialmente semelhante.



**Figura 3:** Marcação retrógrada resultante da injeção de CTb no MnR no caso RD60. **A**) Fotografia de baixo aumento da injeção no MnR e fotografia de uma dupla marcação para 5-HT/CTb em um corte adjacente, ilustrando que a injeção é centrada no MnR/PMnR. Em (**B**, **C**) a marcação retrógrada é resultante dessa injeção no nível rostral (**B**) e medial (**C**) do núcleo dorsal da rafe (DR). Note em **C** que a maioria dos neurônios retrogradamente marcados são encontrados nas asas laterais do DR (DRL). Barra = 200 µm em A, 50 µm em C (vale para B, C).



**Figura 4:** Desenhos esquemáticos de neurônios retrogradamente marcados no DR resultante da injeção de CTb centrada no MnR (caso RD60, Figura **1A**). As secções são ordenadas de rostral para caudal e cada neurônio retrogradamente marcado é representado por um ponto. Para abreviações ver a lista.

#### 4.2 Injeções do traçador retrógrado no MnR: Aferências do B9 para o MnR

A fim de investigar as aferências do grupamento B9 para o MnR, analisamos a marcação retrógrada no grupamento B9 em dois casos com injeção de CTb no MnR (RD 60 e RD 80). Em ambos os casos as injeções foram restritas no MnR e resultaram em marcação retrógrada em toda a extensão rostro-caudal do grupamento B9 (Fig. 5). A maior parte das células CTb+ foi localizada imediatamente acima do lemnisco medial (ml) com algumas células CTb+ também presentes dentro do ml.



**Figura 5:** Desenhos esquemáticos de neurônios retrogradamente marcados no grupamento B9 resultantes da injeção de CTb centrada no MnR (caso RD60, Figura **1A**). As secções são ordenadas de rostral para caudal e cada neurônio retrogradamente marcado é representado por um ponto. Para abreviações ver a lista.

#### 4.3 Injeções do traçador anterógrado no MnR: Eferências do MnR para o DR e B9

Analisamos dois casos (RD 33 e RD 34) com injeção de PHA-L no MnR. Nos dois casos, a injeção foi restrita ao complexo MnR/PMnR. A injeção no caso RD 33 é ilustrada na Figura 6A e do caso 34 na Figura 12C. As injeções no MnR resultaram em uma marcação anterógrada expressiva no DR. A maioria dos axônios PHA-L+ no DR, foram formados por axônios de forma irregular apresentando numerosas varicosidades grandes e esféricas (Fig. 6D, F). Menos frequentemente foram observados longos axônios lisos e de calibre menor. (Fig. 6E). Esse último tipo de axônio seguiu muitas vezes por longas distâncias.

A distribuição dos axônios anterogradamente marcados ao longo do eixo rostro-caudal do DR no caso RD 33 é plotado na Figura 7. A inervação do DR por axônios provenientes do MnR, claramente não foi homogênea. Em particular, em níveis médio-rostro-caudais do DR, os terminais axônicos PHA-L+ foram enriquecidos nas asas laterais do DR (DRL, Fig. 6C, 7B). Em contraste, o DRD e o DRV foram inervados de forma mais fraca, com boa parte dos axônios apresentando características de axônios de passagem. Observamos uma densidade rostro-caudal dos axônios PHA-L+ no DR. A densidade desses axônios claramente aumentou em direção caudal, sendo o DRC a região com maior inervação. Nessas regiões caudais, além do DRC, o núcleo tegmental laterodorsal (LDTg) e o núcleo incerto (NI) também apresentaram- se inervados pelo MnR.

Nos mesmos casos (RD 33 e RD 34), constatamos uma forte inervação do grupamento B9 por axônios provenientes do MnR. A maior parte dos axônios PHA-L+ foi encontrado imediatamente dorsal ao ml, cobrindo toda a extensão do grupamento B9 (Fig. 8A). Quando observados com objetivas de 40x ou 100x, os axônios PHA-L+ no B9 apresentaram muitas ramificações e varicosidades (Fig. 8B), características típicas para um campo terminal local.



**Figura 6:** Marcação anterógrada resultante da injeção de PHA-L no MnR no caso RD33. **A**) Fotografia de baixo aumento da injeção centrada na região caudal do MnR. Marcação anterógrada em nível rostral (**B**) e medial (**C**) do DR. Note em **C**, que os axônios marcados de forma anterógrada são encontrados nas asas laterais do DR (DRL). Detalhes da marcação no DRL (**D**, **E**,) e na região caudal do DR (DRC) em (**F**). Observe que os axônios do MnR apresentam varicosidades grandes e esféricas (indicado por setas). Também existem segmentos longos e lisos de calibre menor (indicado por ponta de seta). Barra = 200 µm em A, 100 µm em C (vale para B, C), 10 µm em F (vale para D, E, F).



Figura 7: Desenhos esquemáticos de axônios anterogradamente marcados no DR resultantes da injeção de PHA-L centrada no MnR (caso RD33, Figura 6A). As secções são ordenadas de rostral para caudal. Para abreviações ver a lista. As fibras em vermelho indicam axônios varicosos de calibre grande. As fibras em azul indicam axônios lisos de calibre menor apresentando poucas varicosidades.



**Figura 8:** Marcação anterógrada no grupamento B9 resultante da injeção de PHA-L centrada no MnR no caso RD34. Essa injeção é ilustrada na Figura **12A, C**. Note em **B**, que os axônios PHA-L+ no B9 apresentam muitas varicosidades. Barra =  $100 \mu m em A$ ,  $20 \mu m em B$ .

#### 4.4 Injeções do traçador anterógrado no DRL: Eferências do DRL para o MnR e B9

Para confirmar os resultados do rastreamento retrógrado, indicando que o DRL é a principal fonte das aferências do DR para o MnR/PMnR, analisamos dois casos com injeções de PHA-L no DRL (RD85, RD87). No caso RD85 a injeção foi restrita para o DRL (Figs. 9A, B). Essa injeção deu origem para projeções intrínsecas para todas as outras sub-regiões do DR (Fig. 9C), como também para o MnR/PMnR. No complexo MnR/PMnR, axônios PHA-L+ foram encontrados ao longo do seu eixo rostro-caudal, a maioria deles ocupando o PMnR no lado ipsilateral (Fig. 9D). Essas duas injeções também resultaram em marcação anterógrada em toda a extensão do grupamento B9. Axônios PHA-L+ foram principalmente encontrados sobrepondo o ml, com poucos axônios PHA-L+ também presentes dentro do ml (Fig. 10).



**Figura 9:** Fotomicrografias da injeção de PHA-L centrado na região caudal do DRL em dois cortes adjacentes (**A**, **B**) a marcação anterógrada foi resultante no DR e no complexo MnR/PMnR (**D**). Em **A**, PHA-L foi revelado pela técnica de immunoperoxidase e em (**B**) pela técnica de dupla imunofluorescência para 5-HT/PHA-L. Note que a injeção é quase restrita ao DRL e que, o DRL emite projeções intrínsecas para o restante das subdivisões do DR e para o MnR/PMnR. Barra = 100 μm.

B Δ Pal R0 m SNC IP ml IP ср n C **B**9 **B**9 IP ml IP ml ср ср

**Figura 10:** Marcação anterógrada no grupamento B9 resultante da injeção de PHA-L centrada no DRL no caso RD85. Essa injeção é ilustrada nas Figuras **8A**, **B**. Barra = 100 μm.

#### 4.5 Dupla marcação para 5-HT/VGLUT3 no grupamento B9 e no MnR

Nos últimos anos, acumularam as evidências de que existe uma enorme diversidade molecular nos diferentes grupamentos serotonérgicos (OKATY; COMMONS; DYMECKI, 2019; REN et al., 2019). Desta forma, já está bem esclarecido que o DR, além de expressar os neurotransmissores clássicos como, 5-HT, GABA e dopamina, as subdivisões do DR, também apresentam proeminentes populações de neurônios com um fenótipo misto ou apenas glutamatérgico, com todos esses fenótipos neuroquímicos diferentes e misturados em proporções distintas nas diferentes subdivisões do DR (FU et al., 2010; HIOKI et al., 2010; SHIKNAI et al., 2012; SEGO et al., 2014). Um possível fenótipo glutamatérgico nos núcleos da rafe é evidenciado pela expressão de VGLUT3 (GRAS et al., 2002; HIOKI et al., 2010). A porcentagem das diferentes populações 5-HT+/VGLUT3-; VGLUT3+/5/HT-; VGLUT3+/5-HT+, já é bem estabelecida em ratos (HIOKI; NAKAMURA et al., 2010, SEGO, GONCALVES et al., 2014), por outro lado, existem apenas poucas informações sobre esses parâmetros no MnR/PMnR e nenhuma informação no grupamento B9. Para especificar o fenótipo dos neurônios no MnR e B9, processamos cortes de 2 ratos (De 83 e 87) pela técnica de dupla-imunofluorescência para 5-HT/VGLUT3. Plotamos todas as células 5-HT+/VGLUT3-; VGLUT3+/5/HT-; ou VGLUT3+/5-HT+ com foco nítido em imagens tiradas ao longo do eixo rostro-caudal dessas estruturas.

Os resultados são ilustrados na Tabela 4 e na Figura 10. Foram analisados e plotados 1557 células no grupamento B9. Desse total, 45,3% foram marcados para 5-HT (VGLUT3-/5-HT+) e 34.5% foram marcados para VGLUT3 (VGLUT3+/5-HT-), enquanto 22% exibiram um fenótipo misto (VGLUT3+/5-HT+). O MnR/PMnR apresentou uma composição neuronal diversificada. De um total de 2473 células, 56% foram marcados para 5-HT, e 30,5% foram marcados para VGLUT3. A porcentagem das células duplamente marcadas para VGLUT3+/5-HT no MnR/PMnR foi de 13,5%.

	Fenótipo neuroquímico	Grupamento B9	MnR
	5-HT+/ VGLUT3-	43,5% (n=815)	56% (n=1358)
Frequência relativa de fenótipo neuroquímico	VGLUT3+/ 5-HT-	34,5% (n=531)	30,5% (n=852)
	VGLUT3+/ 5-HT+	22% (n=211)	13,5% (n=263)
Total		(n=1557)	(n=2473)

Tabela 4. Porcentagens das células expressando 5-HT e/ou VGLUT3 no B9 ou MnR



**Figura 11:** Fotomicrografias da dupla-marcação de imunofluorescência para VGLUT3 e 5-HT no grupamento B9 e no MnR. As fotomicrografias mostram os canais para VGLUT3 (verde, **A**, **D**, **G**) e 5-HT (magenta, **B**, **E**, **H**) separados, e também sobrepostos (**C**, **F**, **I**). As pontas de setas indicam células duplamente marcadas. Os símbolos de x branco em G indicam células VGLUT3+ e os símbolos de x verde em H indicam células 5-HT+. Em **I**, as células que apresentam os dois símbolos são células duplamente marcadas. Barra = 100 µm.

# 4.6 Fenótipo neuroquímico das projeções do DR para o MnR e do B9 para o MnR:Dupla marcação para 5-HT/CTb e 5-HT/PHA-L

Analisamos cortes de dois casos com injeção de CTb no MnR (RD 32 e RD 60) que foram submetidos a dupla-imunomarcação para CTb/5-HT. O padrão de imunomarcação para CTb foi semelhante como descrito no parágrafo 4.1. Mas houve exceção, poucas células foram duplamente marcadas no DRD e DRV, (somente 5%, 14/255 dos neurônios obtiveram marcação retrógrada), a maioria, (cerca de 95%) dos neurônios CTb+ foram imunonegativos para 5-HT. Em particular, todos os numerosos neurônios CTb encontrados na VLPAG e no DRL apresentaram marcações simples.



**Figura 12**: Fotomicrografias da dupla-marcação de imunofluorescência para 5-HT/CTb (**A**, **B**) ou 5-HT/PHA-L (**C**, **D**) no DR. A marcação de CTb e PHA-L é resultante de injeções desses traçadores no MnR. Note em **A** que as células retrogradamente marcadas encontram- se na VLPAG, fora da região rostral do DR (DRR), e em **B** quase exclusivamente nas asas laterais do DR (DRL). Em **C** e **D**, as fotomicrografias ilustram a injeção de PHA-L no MnR (**C**, fluorescência vermelha) e a marcação anterógrada resultante no DR. Note que a maioria dos axônios PHA-L+ são encontrados nas asas laterais do DR (DRL). Barra = 100 µm em A (vale para A, B, D); 150 µm em C.



**Figura 13**: Imagens confocais da dupla-marcação de imunofluorescência para 5-HT/CTb no DR (**A**) e no grupamento B9 (**B**), ou 5-HT/PHA-L (**C**, **D**) em dois níveis ao longo do eixo rostro-caudal do DR. A marcação de CTb e PHA-L é resultante das injeções desses traçadores no MnR. Note em **A** que as células retrogradamente marcadas encontram- se quase exclusivamente nas asas laterais do DR (DRL). As setas apontam para neurônios duplamente marcados e os asteriscos marcam o mesmo sítio nas fotografias de baixa e alta resolução. Em (**C**, **D**) são fotomicrografias mostrando a marcação anterógrada no DR, resultando da injeção de PHA-L no MnR. Note que maioria dos axônios PHA-L+ são encontrados também nas asas laterais do DR (DRL), e que a densidade da marcação anterógrada aumenta em direção caudal. Note também que os axônios PHA-L+ não marcam para 5-HT. Barra = 100 µm em A (vale para A, B, C); 50 µm em D; 10 µm na imagem inserida em B.

## 4.7 Fenótipo neuroquímico das projeções entre DR e MnR: Tripla marcação para 5-HT/CTb/VGLUT3 e 5-HT/PHA-L/VGLUT3

Para verificar se o fenótipo glutamatérgico ou um fenótipo misto 5-HT+/VGLUT3+ participam das conexões intrínsecas entre os núcleos DR, MnR e o grupamento B9, realizamos tripla-marcações para 5-HT/CTb/VGLUT3 e 5-HT/PHA-L/VGLUT3. Esse material foi exclusivamente analisado no microscópio confocal, porque um dos fluoróforos usados (Alexa 647) pode ser visualizado somente por laser. Infelizmente, o microscópio confocal do CEFAP/ICB-USP quebrou durante o período desse Mestrado. Esse fato e a grande dificuldade de reservar períodos para esse equipamento, não permitiram analisar o nosso material de forma sistemática e quantitativa como planejado. Contudo, os dados são restritos para as projeções do DR para o MnR.

Os resultados da análise das tripla-marcações, confirmaram alguns dos mais relevantes resultados da análise das duplas-marcações para 5-HT/CTb e 5-HT/PHA-L. Desta forma, os principais resultados da análise da tripla-marcação para 5-HT/CTb/VGLUT3 em casos com injeção de CTb no MnR foram: No DR, as células duplamente marcadas para 5-HT/CTb ou triplamente marcados para 5-HT/CTb/VGLUT3, foram raros e, geralmente localizados na sub-região dorsal (DRD) ou central (DRDCe ). Células duplamente marcadas para VGLUT3 e CTb foram mais comuns (Figs. 14, 15A), sendo encontrado no DRD, DRDCe e DRV, mas nunca no DRL. Vale ressaltar que, houve exceção de uma única célula duplamente marcada para 5-HT/CTb, as numerosas células CTb+ no DRL foram negativas para 5-HT-/VGLUT3-(Fig. 15B). Nossos dados também confirmaram os resultados de um estudo prévio do nosso grupo (SEGO *et al.*, 2014) mostrando que particularmente no DRV e DRD, mais de 50% dos neurônios 5-HT+ foram duplamente marcados para VGLUT3.

Analisamos poucos cortes de casos com injeção de PHA-L no DRL triplamente marcados para 5-HT/PHA-L/VGLUT3. O escaneamento desse material com objetivas de 40x ou 100x permitiu a identificação de poucos exemplos de terminais axônicos duplamente marcados para VGLUT3/PHA-L fazendo aposições no corpo celular de neurônios 5-HT+ (Fig. 16). Em contraste, não encontramos nesses cortes axônios ou terminais axônicos duplamente marcados para 5-HT/PHA-L.

#### 5-HT/VGLUT3/CTb



**Figura 14:** Imagem confocal da tripla-marcação de imunofluorescência para 5-HT/VGLUT3/CTb no DR. A marcação de CTb é resultante da injeção desse traçador no MnR. As setas apontam para neurônios duplamente marcados para VGLUT3/CTb, as pontas de setas apontam para neurônios duplamente marcados para 5-HT/VGLUT3 e os asteriscos indicam neurônios triplamente marcados para CTb/5-HT/VGLUT3. Note o grande número de neurônios marcados para VGLUT3 no DRDCe e duplamente marcados para 5-HT/VGLUT3 nos outros subnúcleos do DR. Barra = 50 μm



**Figura 15:** Imagens confocais da tripla-marcação de imunofluorescência para 5-HT/VGLUT3/CTb no DR. A marcação de CTb é resultante da injeção desse traçador no MnR. As setas em **A** apontam para neurônios duplamente marcados para CTb/VGLUT3 e o asterisco indica um neurônio triplamente marcado para 5-HT/VGLUT3/CTb. A ponta de seta em **B**, aponta para um neurônio duplamente marcado para 5-HT/CTb. Note o grande número de neurônios marcados para CTb no DRL (indicados pelo símbolo da cerquilha). Barra = 25 µm.



**Figura 16:** Fotomicrografias confocais da tripla-marcação de imunofluorescência para PHA-L/5-HT/VGLUT3 no MnR. A marcação de PHA-L é resultante da injeção de PHA-L no DRL. As setas apontam para neurônios duplamente marcados para VGLUT3/5-HT. As pontas de setas em **B** apontam para terminais de axônios duplamente marcados para VGLUT3/PHA-L. A seta na imagem **D**, aponta para um axônio marcado para PHA-L. O símbolo de # indica um neurônio marcado para VGLUT-3. Os asteriscos indicam os mesmos sítios nas imagens de média e alta magnificação. Barra = 25 µm em A (vale para A, C); 10 µm em B (vale para B, D).

#### 5. DISCUSSÃO

No presente estudo investigamos através de técnicas de rastreamento neural combinado com métodos de imunofluorescência a topografia e o fenótipo neuroquímico das projeções entre o DR, MnR e o grupamento B9. Injeções dos traçadores retrógrado e anterógrado no MnR e no DR revelaram que esses três grupamentos são conectados de forma recíproca. Combinando rastreamento retrógrado com imunofluorescência para 5-HT e/ou VGLUT3, um marcador para neurônios glutamatérgicos, verificamos que a maioria das aferências do DR para o MnR foi originada de neurônios não-serotonérgicos e não-glutamatérgicos do DRL. Além disso, o DRL também é inervado por axônios provenientes do MnR. Nossos resultados caracterizam o DR, o MnR e o B9, ainda mais como grupamentos altamente heterogêneos em relação ao seu fenótipo neuroquímico, e destacam o DRL como principal fonte e alvo das projeções intrínsecas entre esses três grupamentos.

#### 5.1 Topografia das conexões entre DR, MnR e B9

Até o momento, existe na literatura poucas descrições sobre as conexões intrínsecas dos grupamentos serotonérgicos. Em um estudo clássico de VERTES et al. (1999), que descreve as projeções eferentes do MnR, foi brevemente mencionado densas projeções do MnR para as asas laterais do DR, e entradas fracas para a divisão medial do DR. Contudo, sem especificar a localização dos neurônios retrogradamente marcados, BEHZADI et al. (1990), descreveram uma marcação expressiva no DR resultante de injeções do traçador retrógrado no MnR. Além disso, conexões recíprocas parcialmente serotonérgicas entre o DR e MnR já foram descritos em estudos com hamsters sírios (TISCHLER; MORIN, 2003). Em um outro estudo breve em ratos, foram descritos aferências parcialmente serotonérgicas do grupamento B9 para o MnR (STRATFORD; WIRTHSHAFTER, 1988). Nos últimos anos, também foram publicados vários estudos usando modernas técnicas virais de rastreamento (MUZERELLE et al., 2016, OGAWA et al., 2014; POLLAK DOROCIC et al., 2014; WEISSBOURD et al., 2014). Porém, esses estudos apresentam informações resumidas sobre as conexões entre o MnR e o DR. Desta forma, POLLAK DOROCIC et al. (2014), indicaram em uma tabela onde ilustrava que, as projeções do MnR para o DR são mais substanciais que as projeções do DR para o MnR. Os nossos dados corroboram com os principais resultados dos estudos prévios citados acima, e colaboram com novos aspectos importantes em relação à exata topografia e fenótipo neuroquímico das projeções recíprocas entre o DR, o MnR e o grupamento B9. Um dos principais novos resultados de nosso estudo foi que, as projeções do DR para o MnR essencialmente emergem de neurônios não-serotonérgicos no DRL. Esse resultado obtido em casos com injeção do traçador retrógrado no MnR/PMnR, também foi confirmado por injeções do traçador anterógrado no DRL. Digno de nota, como ilustrado por Tischler e Morin (2003), em nosso material o PMnR e não o MnR foi o principal alvo de axônios provenientes do DR. Ademais, esclarecemos em nosso estudo através de injeções do traçador anterógrado no DR, que existe uma pronunciada marcação anterógrada no sentido rostro-caudal no DR, com a região caudal do DR apresentando a maior inervação. Conforme descrito por Vertes *et al.* (1999) em níveis médio-rostro-caudais do DR, identificamos as asas laterais do DR como principal alvo dos axônios provenientes do MnR.

Em relação às conexões entre o MnR e B9, confirmamos os resultados de Stratford e Wirtshafter (1988), descrevendo números elevados de neurônios retrogradamente marcados no grupamento B9, uma parte deles sendo serotonérgico, seguido de injeções do traçador retrógrado no MnR. Além disso, mostramos através de injeções do traçador anterógrado no MnR, que as conexões entre B9 e MnR são recíprocas, sendo o B9 alvo de um pronunciado campo terminal de axônios provenientes do MnR. Também revelamos através de injeções do traçador anterógrado no DR que o B9 recebe projeções do DRL. Infelizmente, não realizamos injeções de traçadores retrógrados ou anterógrados no grupamento B9 para confirmar se o DR e o B9 são conectados reciprocamente. Consideramos que injeções nesse núcleo estreito e difuso iria contaminar as estruturas adjacentes, como a substância negra e a formação reticular ponto-mesencefálica. Porém, Muzerelle *et al.* (2016), recentemente, realizaram injeções de traçadores virais anterógrados no grupamento B9 e confirmaram que B9 emite projeções para o DR e o DRC.

#### 5.2 Fenótipos neuroquímicos dos neurônios no B9 e MnR

Em um elegante trabalho de duplas marcações pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente, Hioki *et al.* (2010), demonstraram que os neurônios serotonérgicos formam em muitas subdivisões do DR, somente minoria entre todos os neurônios existentes nessas regiões. Antes desse estudo inovador, foi bem conhecido que o DR além de expressar neurônios serotonérgicos, apresentam também quantidades substanciais de neurônios GABAérgicos, glutamatérgicos, e dopaminérgicos (DESCARRIES *et al.*, 1982; FORD *et al.*, 1995; CHARARA; PARENT, 1998, GRAS *et al.*, 2002), e que neurônios não-serotonérgicos contribuem para as projeções do DR (PETROV *et al.*, 1992, HALBERSTADT; BALABAN, 2008). Hioki *et al.* (2010), então especificaram que em distintas subdivisões do DR como o DRV existe uma ampla co-localização (em cerca 65% dos neurônios) do marcador

glutamatérgico VGLUT3 com triptofano hidroxilase 2, a enzima que catalisa a hidroxilação de triptofano em 5-HT. Enquanto que, em outras sub-regiões, como o DRDSh, a maioria (75%) dos neurônios VGLUT3+ foi classificado como glutamatérgico (HIOKI et al., 2010). Além disso, Hioki et al. (2010) esclareceram que a 5-HT no DR e MnR é co-localizado somente com VGLUT3, mas quase nunca com marcadores GABAérgicos e dopaminérgicos. Essa característica da distribuição em sub-regiões específicas de marcadores serotonérgicos e glutamatérgicos no DR, foi depois confirmado pelo nosso grupo aplicando duplaimunoflurescência para 5-HT/VGLUT3 (SEGO et al., 2014). Existem muitas informações sobre a distribuição de VGLUT3 e sua co-localização com 5-HT no DR, entretanto, relativamente é pouco conhecido sobre esses parâmetros no MnR (HIOKI et al., 2010, SOS et al., 2016) e quase nada no grupamento B9. Os resultados da nossa semi- quantificação desses parâmetros em material duplamente marcado para 5-HT/VGLUT3 indicam também que o B9 e MnR são núcleos heterogêneos compostos por diferentes tipos de neurônios com um fenótipo neuroquímico distinto. Desse modo, semelhante ao DR, encontramos no B9 e no complexo MnR/PMnR neurônios com um fenótipo serotonérgico (5-HT+/VGLUT3-),glutamatérgico (VGLUT3+/5-HT-), assim como um fenótipo misto (VGLUT3+/5-HT+), sendo em ambas regiões os neurônios 5-HT+/VGLUT3 a classe mais comum, e os neurônios VGLUT3+/5-HT+ a classe menos comum. Nossos dados para o MnR não podem ser diretamente comparados com dados existentes (HIOKI et al., 2010, SOS et al., 2016), porque nesses trabalhos, os neurônios GABAérgicos também foram inclusos na análise. Dessa maneira, em um recente trabalho no complexo MnR/PMnR (SOS et al., 2016), além das três classes encontradas em nosso material, 61% do total de neurônios foram classificados como GABAérgico e 25% apresentaram-se triplo-negativo para 5-HT/VGLUT3/GABA. Mesmo assim, nossos dados claramente indicam que, semelhante ao DR, neurônios com um fenótipo VGLUT3+/5-HT- ou VGLUT3+/5-HT+ são muito comuns no complexo MnR/PMnR e no grupamento B9. Vale notar que, apesar de apresentar características morfológicas diferentes (VERTES; CRANE, 1997), as porcentagens de neurônios expressando 5-HT e/ou VGLUT3 no MnR e B9 não diferem muito. Ademais, nossos dados de tripla-marcação de imunofluorescência para VGLUT3/5-HT/CTb indicam que todas as três classes analisadas, ao lado da maioria de neurônios imunonegativos para VGLUT3/5-HT, contribuem para as projeções intrínsecas entre DR, MnR e o grupamento B9.

#### 5.3 Fenótipo neuroquímico dos neurônios que contribuem para projeções intrínsecas

Antes de entrar na discussão dos nossos resultados dos experimentos de rastreamento retrógado combinado com imunofluorescência para 5-HT e/ou VGLUT3, é importante ressaltar que a identificação de neurônios dupla- ou triplamente marcados foi somente possível em imagens confocais, capturados com objetiva de 40x ou 100x. O mesmo vale ainda mais para a detecção de axônios dupla- ou triplamente marcados para PHA-L e 5-HT e/ou VGLUT3. Esse fato, e a grande dificuldade de reservar períodos no microscópio confocal do CEFAP não permitiram a análise de nosso material de forma sistemática e quantitativa como planejado.

Os nossos dados claramente indicam que, a maioria das projeções do DR e do grupamento B9 para o MnR emerge de neurônios não-serotonérgicos/não-glutamatérgicos. Desta forma, as fotografias obtidas no microscópio confocal, ou com microscópio convencional de epifluorescência, constantemente observamos que a maioria (entre 90 e 95%) das células retrogradamente marcadas no DR e B9, seguidas de injeção de CTb no MnR, foi imunonegativa para 5-HT e/ou VGLUT3.

Principalmente as asas laterais do DR (DRL), se destacaram em nossos experimentos de múltipla marcação de imunofluorescência por conter elevados números de neurônios marcados para CTb. Já está bem esclarecido que os neurônios GABAérgicos dentro do DR são enriquecidos no DRL (HIOKI et al., 2010, SHIKANAI et al., 2012 CRAWFORD et al., 2013, GOCHO et al., 2013). Ademais, recentes trabalhos do nosso grupo mostraram que os neurônios GABAérgicos do DRL são em sua maioria neurônios de projeção que inervam preferencialmente alvos subcorticais como o IP (LIMA et al., 2017) e o núcleo tegmental laterodorsal (BUENO et al., 2019). Devido ao fato de que os neurônios dopaminérgicos são restritos para a divisão rostral do DR (FU et al., 2010) que contribui muito pouco para as projeções do DR para o MnR, é pertinente especular que a maioria das projeções do DR para o MnR emerge de neurônios GABAérgicos. Porém, os resultados de estudos recentes indicaram que DR e MnR (SOS et al., 2016, OKATY et al., 2019), também apresentam uma porcentagem considerável (cerca 25% no MnR/PMnR) de neurônios com um fenótipo neuroquímico até agora desconhecido. Sendo assim, experimentos de múltiplas marcações de imunofluorescência que permitem a identificação de neurônios GABAérgicos são indispensáveis, para postular que a maioria dos neurônios de projeção VGLUT3-/5-HT, em nosso material é composto por neurônios GABAérgicos. Planejamos inicialmente experimentos de hibridização in situ para identificar neurônios GABAérgicos. Porém, os kits

para a hibridização *in situ* fluorescente chegaram atrasados demais para executar esses experimentos no âmbito desse projeto de Mestrado.

No DR e B9, ao lado da maioria de neurônios de projeção imunonegativa para 5-HT e/ou VGLUT3, também identificamos uma minoria de neurônios duplamente marcados para 5-HT/CTb ou VGLUT3/CTb, além de poucos exemplos de neurônios triplamente marcados para 5-HT/VGLUT3/CTb. Isso indica que todas as principais populações neuronais presentes no DR (HIOKI *et al.*, 2010, SEGO *et al.*, 2014) e no B9 (VERTES; CRANE, 1997 resultados do presente estudo), emitem entradas para o MnR. A maioria dos neurônios duplamente marcados para CTb/VGLUT3 no DR, seguidos de injeções no MnR, foi localizado no DRDCe, conhecido por conter principalmente neurônios glutamatérgicos (HIOKI *et al.*, 2010; SEGO *et al.*, 2014). Ademais nossa análise das triplas-marcações no microscópio confocal claramente confirmou <u>os dados</u> de estudos prévios (HIOKI *et al.*, 2010, SEGO *et al.*, 2014), mostrando que em sub-regiões como o DRV, a maioria dos neurônios serotonérgicos apresenta um fenótipo misto VGLUT3+/5-HT+.

#### 5.4 Implicações funcionais

Os dados do presente projeto sublinham a existência de uma enorme diversidade molecular nos três principais grupamentos serotonérgicos (OKATY et al., 2019; REN et al., 2019). Eles estendem conhecimentos essencialmente adquiridos no DR (HIOKI et al., 2010, SEGO et al., 2014), sobre a presença acentuada de neurônios com um fenótipo 5-HT-/VGLUT3+ ou 5-HT+/VGLUT3+ para o grupamento B9 e o MnR. Esses resultados levam questões sobre a importância funcional desses dois subtipos de neurônios glutamatérgicos presentes nos grupamentos serotonérgicos e uma possível co-liberação de 5-HT e GLU. Porém, até agora poucos estudos exploraram essas questões e quase todos focaram neurônios VGLUT3+ do DR. Em um estudo pioneiro, Amilhon et al. (2010) mostraram que a deleção de VGLUT3 em camundongos geneticamente modificados aumenta comportamentos associados a ansiedade, diminui a neurotransmissão serotonérgica mediado pelo receptor do tipo 5-HT1A e aumenta a transmissão serotonérgica no hipocampo e córtex cerebral. Ademais, VGLUT3 possivelmente facilita o empacotamento de 5-HT em vesículas sinápticas e dessa forma funciona para aumentar a neurotransmissão serotonérgica (AMILHON et al., 2010). Estudos anatômicos verificaram que VGLUT3 e o transportador de 5-HT (SERT) são amplamente colocalizados em axônios serotonérgicos no telencéfalo de camundongos (BELMER et al., 2019). Estudos optogéneticos indicaram que 5-HT e GLU são co-liberados em regiões como a amigdala basolateral (SENGUPTA et al., 2017) e na área tegmental ventral (VTA) (WANG et

*al.*, 2019). A estimulação optogenética de neurônios do DR aumentam mecanismos de recompensa na VTA, e esse efeito pode ser bloqueado pela inativação local de receptores de 5-HT e GLU na VTA (WANG *et al.*, 2019). Finalmente, estudos eletrofisiológicos conduzidos no DR (FERNANDEZ *et al.*, 2015) e no MnR (DOMONKOS *et al.*, 2016) mostraram que neurônios do fenótipo VGLUT3+/5-HT+ diferem em suas propriedades de disparo de neurônios do fenótipo VGLUT3+/5-HT+. Baseado nessas observações, tem sido proposto que neurônios com fenótipo VGLUT3+/5-HT+ formam um subtipo entre os neurônios serotonérgicos que deveria ser recrutado especificamente através de estímulos fortes com o intuito de mediar uma neurotransmissão rápida e amplificada (FERNANDEZ *et al.*, 2015).

Nossos resultados mostram que a maioria das aferências do DR para o MnR foi originada de neurônios 5-HT-/VGLUT3- do DRL, e que o DRL também é um dos principais alvos de axônios provenientes do MnR, onde claramente possuem uma relevância funcional potencial. Nos últimos anos ficou cada vez mais evidente que o DR é uma estrutura altamente heterogênea, composto por várias subpopulações neurais que diferem com respeito a seu fenótipo neuroquímico, suas projeções e funções, assim como suas propriedades eletrofisiológicas (COMMONS et al., 2003, HIOKI et al., 2010, CALIZO et al., 2011, HALE e LOWRY, 2011, SEGO et al., 2014, OKATY et al., 2019). Como primeiramente postulado por Deakin e Graeff (1991), distintas subpopulações neuronais no DR e MnR parecem desempenhar funções diferenciadas na regulação da ansiedade e em distúrbios afetivos como a síndrome do pânico e a depressão maior (GRAEFF et al., 1996, ANDRADE et al., 2013, PAUL; LOWRY, 2013, TEISSIER et al., 2015). Desse modo, existem muitas evidências de que os neurônios não-serotonérgicos do DRL são seletivamente ativados frente a estímulos ou situações que induzem pânico (JOHNSON et al., 2008, SPIACCI JR. et al., 2012, MATTHIESEN et al., 2017). Enquanto isso, neurônios serotonérgicos nas porções médiorostro-caudais e caudais do DR (região caudal do DRD, DRDSh, e DRC) estariam particularmente envolvidos no processamento da ansiedade (GRAHN et al., 1999, ABRAMS et al., 2005, HALE et al., 2012). Ademais, fica cada vez mais evidente que o MnR também é criticamente envolvido na ansiedade. Recentes abordagens genéticas em camundongos (OHMURA et al., 2014, TEISSIER et al., 2015), evidenciaram que a ativação de neurônios serotonérgicos do MnR, mas não do DR é ansiogênico. Esses dados confirmam evidentemente resultados prévios mostrando que, lesões do MnR causam efeitos ansiolíticos (ANDRADE; GRAEFF, 2001; ANDRADE et al., 2004; ANDRADE; ZANGROSSI Jr; GRAEFF, 2013). Estudos recentes também postularam certo antagonismo funcional entre MnR e DR, revelando que apenas a hiperatividade do MnR aumenta a ansiedade (OHMURA

*et al.*, 2014), enquanto um relação baixa das atividades serotonérgicas no DR/MnR impulsiona comportamentos depressivos (LECHIN; VAN DER DIJIS; HERNANDEZ-ADRIAN; 2006, TEISSIER *et al.*, 2015).

Considerando, a escassez de estudos funcionais (MOKLER *et al.*, 2009), podemos atualmente, somente especular sobre como as conexões intrínsecas entre DR e MnR podem ser envolvidos no ajuste das atividades do DR/MnR de modo geral, e especificamente na regulação do humor e na fisiopatologia de doenças afetivas. O fato é que neurônios nãoserotonérgicos e não-glutamatérgicos no DRL são a principal fonte das projeções do DR para o MnR, pode sugerir uma influência inibitória do DRL sobre o MnR. Porém, nossos resultados de rastreamento anterógrado sugerem que o PMnR e não o MnR é o principal alvo dos axônios provenientes do DRL. Os neurônios GABAérgicos do complexo MnR/PMnR são altamente enriquecidos no PMnR (SOS *et al.*, 2016). Desse modo uma possível ativação de neurônios GABAérgicos no DRL pode resultar em desinibição de células excitatórias no complexo MnR/PMnR, como mostrado em vários outros circuitos subcorticais (LIMA *et al.*, 2017, LI *et al.*, 2019, KAUER; POLTER, 2019). Portanto, estudos genéticos almejando seletivamente a ativação ou inibição de neurônios com diferentes fenótipos neuroquímicos no DR, MnR e no grupamento B9 são necessários para esclarecer as exatas funções das conexões intrínsecas entre essas estruturas.

#### 6. REFERÊNCIAS

ABRAMS, J. K. et al. Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. **Neuroscience**, v. 133, n. 4, p. 983-97, 2005. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15916857

ALONSO, A. et al. Development of the serotonergic cells in murine raphe nuclei and their relations with rhombomeric domains. **Brain Structure & Function**, v. 218, n. 5, p. 1229-1277, 2013. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23052546

AMILHON, B. et al. VGLUT3 (Vesicular Glutamate Transporter Type 3) Contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety. **Journal of Neuroscience,** v. 30, n. 6, p. 2198-2210, 2010. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20147547</u>

ANDRADE, T. G. C. S.; GRAEFF, F. G. Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 70, n. 1, p. 1-14, 2001. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566137</u>

ANDRADE, Telma GCS et al. Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. **Behavioural brain research**, v. 153, n. 1, p. 55-60, 2004. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15219706

ANDRADE, T. G.; ZANGROSSI, H., JR.; GRAEFF, F. G. The median raphe nucleus in anxiety revisited. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 12, p. 1107-15, 2013. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23999409

ARTIGAS, F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. **Pharmacol Ther,** v. 137, n. 1, p. 119-31, 2013. <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022360</u>

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology,** v. 38, n. 8, p. 1083-1152, 1999. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10462127

BEHZADI, G. et al. Afferents to the median raphe nucleus of the rat - retrograde choleratoxin and wheat-germ conjugated horseradish-peroxidase tracing, and selective d-[3H]aspartat labeling of possible excitatory amino-acid inputs. **Neuroscience**, v. 37, n. 1, p. 77-100, 1990. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2243599</u>

BERGER, M.; GRAY, J. A.; ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. Annu Rev Med, v. 60, p. 355-66, 2009. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630576</u>

CALIZO, L. H. et al. Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 3, p. 524-43, 2011. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530552</u>

CARHART-HARRIS, R. L.; NUTT, D. J. Serotonin and brain function: a tale of two receptors. **J Psychopharmacol**, v. 31, n. 9, p. 1091-1120, 2017. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28858536

COMMONS, K. G. Ascending serotonin neuron diversity under two umbrellas. **Brain Struct Funct**, v. 221, n. 7, p. 3347-60, 2016. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26740230</u>

COMMONS, K. G.; CONNOLLEY, K. R.; VALENTINO, R. J. A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with а potential role in affective disorders. Neuropsychopharmacology, 2003. 28. 2. 206-15. v. n. p. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12589373

CRAWFORD, L. K.; RAHMAN, S. F.; BECK, S. G. Social stress alters inhibitory synaptic input to distinct subpopulations of raphe serotonin neurons. **ACS Chem Neurosci**, v. 4, n. 1, p. 200-9, 2013. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23336059</u>

DAHLSTROEM, A.; FUXE, K. Evidence for the Existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. i. demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. Acta Physiol Scand Suppl, p. SUPPL 232:1-55, 1964. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14229500

DAYAN, P.; HUYS, Q. J. Serotonin in affective control. Annu Rev Neurosci, v. 32, p. 95-126, 2009. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400722</u>

DEAKIN, J. F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. Author's response. **J Psychopharmacol**, v. 5, n. 4, p. 339-41, 1991. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22282838

DESCARRIES, L. et al. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. **J Comp Neurol**, v. 207, n. 3, p. 239-54, 1982. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7107985</u>

FERNANDEZ, S. P. et al. Multiscale single-cell analysis reveals unique phenotypes of raphe 5-HT neurons projecting to the forebrain. **Brain Struct Funct,** v. 221, n. 8, p. 4007-4025, 2016. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26608830</u>

FILIP, M.; BADER, M. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. **Pharmacological Reports,** v. 61, n. 5, p. 761-777, 2009. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19903999</u>

FISCHER, A. G.; ULLSPERGER, M. An update on the role of serotonin and its interplay with dopamine for reward. **Front Hum Neurosci,** v. 11, p. 484, 2017. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29075184

FORD, B. et al. GABAergic neurons in the rat pontomesencephalic tegmentum: codistribution with cholinergic and other tegmental neurons projecting to the posterior lateral hypothalamus. **J Comp Neurol,** v. 363, n. 2, p. 177-96, 1995. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642069

FU, W. et al. Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain. **J Comp Neurol,** v. 518, n. 17, p. 3464-94, 2010. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20589909

GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: News from mouse molecular genetics. **Nature Reviews Neuroscience,** v. 4, n. 12, p. 1002-1012, 2003. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14618156</u>

GASPAR, P.; LILLESAAR, C. Probing the diversity of serotonin neurons. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences,** v. 367, n. 1601, p. 2382-2394, 2012. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22826339</u>

GERFEN, Charles R.; SAWCHENKO, Paule 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 Research**, v. 290, n. 2, p. 219-238, 1984. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6198041

GONCALVES, L.; SEGO, C.; METZGER, M. Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial tegmental nucleus and ventral tegmental area in the rat. **Journal** of Comparative Neurology, v. 520, n. 6, p. 1278-1300, 2012. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020635

GOCHO, Y. et al. Electrophysiological and pharmacological properties of GABAergic cells in the dorsal raphe nucleus. **Journal of Physiological Sciences**, v. 63, n. 2, p. 147-154, 2013. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23275149

GRAEFF, F. G. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 1, p. 129-41, 1996. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8728550</u>

GRAHN, R. E. et al. Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. **Brain Research**, v. 826, n. 1, p. 35-43, 1999. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10216194</u>

GRAS, C. et al. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotoninergic neurons. Journal of Neuroscience, v. 22, n. 13, p. 5442-5451, 2002. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10216194

HALE, M. W.; LOWRY, C. A. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. **Psychopharmacology** (**Berl**), v. 213, n. 2-3, p. 243-64, 2011. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21088958</u>

HALE, M. W.; SHEKHAR, A.; LOWRY, C. A. Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 5, p. 695-708, 2012. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22484834</u>

HIOKI, H. et al. Vesicular glutamate transporter 3-expressing nonserotonergic projection neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei. Journal of Comparative Neurology, v. 518, n. 5, p. 668-686, 2010. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034056</u>

ITOH, K. et al. Application of coupled oxidation reaction to electron-microscopic demonstration of horseradish-peroxidase - cobalt-glucose oxidase method. **Brain Research**, v. 175, n. 2, p. 341-346, 1979. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/90544</u>

JACOBS, B. L.; AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain-serotonin system. **Physiological Reviews,** v. 72, n. 1, p. 165-229, 1992. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1731370 JOHNSON, P. L. et al. Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 19, n. 4, p. 327-341, 2005. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15982987</u>

JOHNSON, P. L. et al. Disruption of GABAergic tone in the dorsomedial hypothalamus attenuates responses in a subset of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus following lactate-induced panic. **Journal of Psychopharmacology**, v. 22, n. 6, p. 642-652, Aug 2008. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18308791

KIYASOVA, V. et al. A genetically defined morphologically and functionally unique subset of 5-HT neurons in the mouse raphe nuclei. **J Neurosci,** v. 31, n. 8, p. 2756-68, 2011. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21414898

LECHIN, F.; VAN DER DIJS, B.; HERNANDEZ-ADRIAN, G. Dorsal raphe vs. median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: relevance for neuropharmacological therapy. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 30, n. 4, p. 565-85, 2006. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436311

LIMA, L. B. et al. Afferent and efferent connections of the interpeduncular nucleus with special reference to circuits involving the habenula and raphe nuclei. **Journal of Comparative Neurology,** v. 525, n. 10, p. 2411-2442, 2017. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28340505

LOWRY, C. A. et al. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1148, p. 86-94, 2008. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120094

LUPPI, P. H.; FORT, P.; JOUVET, M. Iontophoretic application of unconjugated cholera toxin B subunit (CTb) combined with immunohistochemistry of neurochemical substances: a method for transmitter identification of retrogradely labeled neurons. **Brain Research**, v. 534, n. 1-2, p. 209-24, 1990. <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1705851</u>

MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Stressor controllability and learned helplessness: The roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews,** v. 29, n. 4-5, p. 829-841, 2005. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15893820

MATTHIESEN, M.; SPIACCI, A.; ZANGROSSI, H. Effects of chemical stimulation of the lateral wings of the dorsal raphe nucleus on panic-like defensive behaviors and Fos protein expression in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 326, p. 103-111, 2017. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28274653

MICHELSEN, K. A.; SCHMITZ, C.; STEINBUSCH, H. W. M. The dorsal raphe nucleus -From silver stainings to a role in depression. **Brain Research Reviews,** v. 55, n. 2, p. 329-342, 2007. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17316819</u>

MUZERELLE, A. et al. Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5-B9) to the forebrain and brainstem. **Brain Structure & Function**, v. 221, n. 1, p. 535-61, 2016. <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25403254</u>

NICHOLS, D. E.; NICHOLS, C. D. Serotonin receptors. Chemical Reviews, v. 108, n. 5, p. 1614-1641, 2008. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476671</u>

OGAWA, S. K. et al. Organization of monosynaptic inputs to the serotonin and dopamine neuromodulatory systems. **Cell Rep,** v. 8, n. 4, p. 1105-18, 2014. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25108805

OHMURA, Y. et al. Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behaviour in mice. **Int J Neuropsychopharmacol,** v. 17, n. 11, p. 1777-83, 2014. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24834486

OKATY, B. W.; COMMONS, K. G.; DYMECKI, S. M. Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. **Nat Rev Neurosci,** v. 20, n. 7, p. 397-424, 2019. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30948838

PAXINOS, G; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, San Diego, 6<sup>th</sup> ed., 2007.

PAUL, E. D.; LOWRY, C. A. Functional topography of serotonergic systems supports the hypothesis Deakin/Graeff of anxiety and affective disorders. Journal of Psychopharmacology, v. 27, 12. 1090-106. 2013. n. p. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23704363

POLLAK DOROCIC, I. et al. A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei. **Neuron,** v. 83, n. 3, p. 663-78, 2014. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25102561

QI, J. et al. A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons. **Nat Commun**, v. 5, p. 5390, 2014. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25388237

REN, J. et al. Serotonin neurons in the dorsal and medial raphe nuclei: from single-cell transcriptomes to whole-brain projections. **bioRxiv**, p. 674697, 2019. https://www.biorxiv.org/content/10.1101/674697v1

REN, J. et al. Anatomically Defined and Functionally Distinct Dorsal Raphe Serotonin Subsystems. **Cell**, v. 175, n. 2, p. 472-+, 2018. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30146164</u>

SEGO, C. et al. Lateral habenula and the rostromedial tegmental nucleus innervate neurochemically distinct subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat. **Journal of Comparative Neurology,** v. 522, n. 7, p. 1454-84, 2014. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24374795

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. 655-60, 1999. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415677</u>

SHIKANAI, H. et al. Distinct neurochemical and functional properties of GAD67-containing 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 41, p. 14415-26, 2012. <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055511</u>

SOS, K. E. et al. Cellular architecture and transmitter phenotypes of neurons of the mouse median raphe region. **Brain Structure & Function,** v. 222, n. 1, p. 287-299, 2017. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27044051

SPIACCI, A.; COIMBRA, N. C.; ZANGROSSI, H. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. **Neuroscience**, v. 227, p. 350-360, 2012. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23041762</u>

STEINBUSCH, H. W. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. **Neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 557-618, 1981. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7017455

STRATFORD, T. R.; WIRTSHAFTER, D. Evidence for a projection from the b9 serotonergic cell group to the median raphe nucleus. **Brain Research Bulletin,** v. 21, n. 2, p. 325-328, 1988. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3191415</u>

TEISSIER, A. et al. Activity of raphe serotonergic neurons controls emotional behaviors. **Cell Rep,** v. 13, n. 9, p. 1965-1976, 2015. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26655908</u>

TISCHLER, R. C.; MORIN, L. P. Reciprocal serotonergic connections between the hamster median and dorsal raphe nuclei. **Brain Research**, v. 981, n. 1-2, p. 126-132, 2003. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12885433</u>

TORK, I. Anatomy of the serotonergic system. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 600, p. 9-33, 1990. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2252340</u>

VERTES, R. P. A Pha-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. **Journal of Comparative Neurology,** v. 313, n. 4, p. 643-668, 1991. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1783685

VERTES, R. P.; CRANE, A. M. Distribution, quantification, and morphological characteristics of serotonin-immunoreactive cells of the supralemniscal nucleus (B9) and pontomesencephalic reticular formation in the rat. **J Comp Neurol**, v. 378, n. 3, p. 411-24, 1997. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9034900</u>

VERTES, R. P.; FORTIN. W. J; CRANE, A .M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. **Journal of Comparative Neurology,** v. 407, n. 4, p. 555-82, 1999. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10235645

VERTES, R. P.; KOCSIS, B. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. **Neuroscience**, v. 81, n. 4, p. 893-926, 1997. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9330355

WEISSBOURD, B. et al. Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and gabaergic neurons. **Neuron,** v. 83, n. 3, p. 645-662, 2014. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25102560



RESEARCH ARTICLE 🛛 👌 Full Access

Afferent and efferent connections of the interpeduncular nucleus with special reference to circuits involving the habenula and raphe nuclei

Leandro B. Lima, Debora Bueno, Fernanda Leite, Stefani Souza, Luciano Gonçalves, Isadora C. Furigo , Jose Donato Jr, Martin Metzger 🗙

First published: 24 March 2017 | https://doi.org/10.1002/cne.24217 | Cited by: 13

**Funding information:** FAPESP, Grant/Award Number: 2012/02388-3, 2010/18086-0, 2013/21722-4; CNPg, Grant/Award Number: 141991/2012-7; CAPES, Grant/Award Number: 1441373

SECTIONS

🚬 PDF 🔧 TOOLS 🛛 < SHARE



RESEARCH ARTICLE 🛛 👌 Full Access

## Connections of the laterodorsal tegmental nucleus with the habenular-interpeduncular-raphe system

Debora Bueno, Leandro B. Lima, Rudieri Souza, Luciano Gonçalves, Fernanda Leite, Stefani Souza, Isadora C. Furigo, Jose Donato Jr., Martin Metzger 🗙

First published: 14 June 2019 | https://doi.org/10.1002/cne.24729

#### Associate Editor: Paul E. Sawchenko

**Funding information:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 141991/2012-7; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: Finance Code 001; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Numbers: 2016/09679-4, 2017/02983-2, 2017/16473-6

SECTIONS

<del>ار</del>	PDF	~	TOOLS	<	SHARE
---------------	-----	---	-------	---	-------