

**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 Pós-graduação 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

## 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 serotoninérgicos 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, MnR e B9 são interconectados reciprocamente. Contudo, acumulam evidências de que esses núcleos, tradicionalmente considerados serotoninérgicos, na verdade, são altamente heterogêneos, contendo populações de neurônios com fenótipos neuroquímicos, projeções, e propriedades eletrofisiológicas distintas. Porém, até o momento, o exato padrão das conexões intrínsecas entre o DR, MnR e B9, assim como o fenótipo neuroquímico dos neurônios dando origem a elas, 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 DR, 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 serotoninérgicos. As combinações de rastreamento retrógrado com imunofluorescência para 5-HT e/ou VGLUT3 revelaram que 95% das aferências do DR para o MnR foi originada de neurônios não-serotoninérgicos, não-glutamatérgicos nas asas laterais (DRL). Além disso, poucos neurônios glutamatérgicos, serotoninérgicos, ou com um fenótipo misto, em outras sub-regiões do DR contribuíram para as projeções do DR para o MnR. Esses resultados indicam que DR, MnR e B9 são interconectadas de forma recíproca, e 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.

## INTRODUÇÃO

Serotonina (5-HT) é o neuromodulador mais amplamente distribuído no cérebro (DAHLSTROM & FUXE; 1964; STEINBUSCH, 1981), com axônios serotoninérgicos innervando 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 distintos tipos de receptores de 5-HT, o receptor 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> 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; LILLESAAAR, 2012). Além disso, a 5-HT também apresenta um importante papel trófico durante o desenvolvimento da circuitaria do cerebral (GASPAR; CASES; MAROTEAUX, 2003). A distribuição dos neurônios serotoninérgicos é conhecida desde estudos pioneiros de Dahlstroem e Fuxe (1964) que descreveram nove distintos grupamentos de neurônios serotoninérgicos, denominados alfanumericamente como B1–B9. Os grupamentos caudais B1-B3, innervam essencialmente a medula espinal, os grupamentos rostrais B4-B9 fazem projeções principalmente ascendentes (TORK, 1990). A maioria dos neurônios serotoninérgicos 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 serotoninérgico 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 a ansiedade, o controle fisiológico do humor, a impulsividade e a agressividade (REN *et al.*, 2019). O DR e 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). Desta forma, foi descrito que a ativação optogenética dos neurônios serotonérgicos do MnR, mas não dos neurônios serotonérgicos do DR é ansiogênico (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). Tanto o DR quanto 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 amígdala (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 significativa 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 menos difusas em comparação ao DR e MnR, mas incluem projeções rafe-intrínsecas para o DR e MnR (STRATFORD; WIRTSHAFTER, 1988; MUZERELLE, *et al.*, 2016). Ainda é bastante comum de se pensar que o sistema serotonérgico é um sistema homogêneo, que atua no mesmo conjunto de receptores, e que inerva quase todo o cérebro de forma difusa (GASPAR; LILLESAAAR, 2012). Porém, atualmente aumentam as evidências de que o DR é um núcleo altamente heterogêneo, composto de diferentes subnúcleos contendo grupamentos de neurônios com conexões e propriedades morfológicas, eletrofisiológicas e neuroquímicas distintas (ABRAMS *et al.*, 2005; CALIZO *et al.*, 2011; KIYASOVA *et al.*, 2011; GASPAR; LILLESAAAR, 2012; FERNANDEZ *et al.*, 2016; REN *et al.*, 2018; OKATY; COMMONS; DYMECKI, 2019).

Além de neurônios serotonérgicos, 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 salientar 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 possuem 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. No MnR, possíveis subdivisões não são reconhecidas tão facilmente quanto no DR. O complexo MnR/núcleo paramediano da rafe (MnR/PMnR) também expressa 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 é amplamente co-localizado com VGLUT3, mas quase nunca com GABA (SOS *et al.*, 2017). Interessantemente, 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 mesen- e rombencéfalo (ALONSO *et al.*, 2013). Existem apenas dados isolados na literatura indicando que o DR, 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. Além disso, 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.

## CONCLUSÃO

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 de traçadores retrógrados e anterógrados no MnR e DR revelaram que esses três grupamentos são conectados de forma recíproca. Combinando rastreamento retrógrado com imunofluorescência para 5-HT ou/e VGLUT3, um marcador para neurônios glutamatérgicos, verificamos que a maioria das aferências do DR para o MnR se originou de neurônios não-serotonérgicos, não-glutamatérgicos do DRL. Além disso, o DRL também é ricamente inervado por axônios vindos do MnR. Nossos resultados caracterizam DR, MnR e B9 ainda mais como grupamentos altamente heterogêneos em relação a sua neuroquímica e destacam o DRL como principal fonte e alvo das projeções intrínsecas entre esses três grupamentos.

Esses resultados indicam que DR, MnR e B9 são interconectadas de forma recíproca, e 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.

## 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20147547>
- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566137>
- 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022360>
- 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 cholera-toxin 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2243599>
- BERGER, M.; GRAY, J. A.; ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. **Annu Rev Med**, v. 60, p. 355-66, 2009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630576>
- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530552>
- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26740230>

COMMONS, K. G.; CONNOLLEY, K. R.; VALENTINO, R. J. A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 2, p. 206-15, 2003. <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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23336059>

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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400722>

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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7107985>

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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26608830>

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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19903999>

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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14618156>



- GASPAR, P.; LILLESAAAR, C. Probing the diversity of serotonin neurons. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2382-2394, 2012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22826339>
- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8728550>
- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10216194>
- GRAS, C. et al. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21088958>
- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22484834>
- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034056>
- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/90544>
- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15982987>
- 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1705851>
- 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>
- MICHELSSEN, 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17316819>
- 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25403254>

- NICHOLS, D. E.; NICHOLS, C. D. Serotonin receptors. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 5, p. 1614-1641, 2008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476671>
- 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 Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 12, p. 1090-106, 2013. <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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30146164>
- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415677>
- 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055511>

- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23041762>
- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3191415>
- TEISSIER, A. et al. Activity of raphe serotonergic neurons controls emotional behaviors. **Cell Rep**, v. 13, n. 9, p. 1965-1976, 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26655908>
- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12885433>
- TORK, I. Anatomy of the serotonergic system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 600, p. 9-33, 1990. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2252340>
- 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 suprallemniscal nucleus (B9) and pontomesencephalic reticular formation in the rat. **J Comp Neurol**, v. 378, n. 3, p. 411-24, 1997. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9034900>
- 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>