

DÉBORA NUNES MARTINS BUENO

**“Conexões aferentes e eferentes do núcleo interpeduncular com
enfoque especial para os circuitos entre a habênula, o núcleo
interpeduncular e os núcleos da rafe”**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Martin Andreas Metzger

Versão Original

São Paulo
2018

RESUMO

Bueno, DNM. **Conexões aferentes e eferentes do núcleo interpeduncular com enfoque especial para os circuitos entre a habênula, o núcleo interpeduncular e os núcleos da rafe.** 2018. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A habênula é uma estrutura epitalâmica diferenciada em dois complexos nucleares, a habênula medial (MHb) e a habênula lateral (LHb). Recentemente, a MHb junto com seu alvo principal, o núcleo interpeduncular (IP), foram identificados como estruturas chaves envolvidas na mediação dos efeitos aversivos da nicotina. Contudo, estruturas intimamente interligadas com o eixo MHb-IP, como o núcleo mediano (MnR), a parte caudal do núcleo dorsal da rafe (DRC), e o núcleo tegmental laterodorsal (LDTg) podem contribuir para os efeitos comportamentais da nicotina. As conexões aferentes e eferentes do IP, até agora, não foram sistematicamente investigadas com traçadores sensíveis. Assim, realizamos injeções de traçadores retrógrados ou anterógrados em diferentes subdivisões do IP, no MnR, ou LDTg e também examinamos a assinatura neuroquímica de algumas das mais proeminentes aferências dessas três estruturas através da combinação de rastreamento retrógrada com métodos de imunofluorescência e hibridização *in situ*. Além de receber entradas topograficamente organizadas da MHb e também da LHb, observamos que o IP está principalmente interligado de forma recíproca com estruturas da linha média, incluindo o MnR/DRC, o núcleo incerto, o núcleo supramamilar, o septo e o LDTg. As conexões bidirecionais entre o IP e o MnR assim como as entradas do LDTg para o IP provaram de ser principalmente GABAérgicas. Com respeito a uma possível topografia das saídas do IP, todos os subnúcleos do IP deram origem a projeções descendentes, enquanto as suas projeções ascendentes, incluindo projeções focais para o hipocampo ventral, o septo ventrolateral, e a LHb originaram da região dorsocaudal do IP. Nossos resultados indicam que o IP está intimamente associado a uma rede de estruturas da linha média, todos eles considerados moduladores chave da atividade teta do hipocampo. Assim, o IP forma um elo que liga MHb e LHb com esta rede e com o hipocampo. Além disso, as proeminentes interconexões predominantemente GABAérgicas entre IP e MnR, assim como IP e LDTg, suportam um papel chave dessas vias bidirecionais na resposta comportamental à nicotina.

Palavras chave: Habênula medial. Núcleos da rafe. Hipocampo. Nicotina. Aversão.

ABSTRACT

Bueno, DNM. **Afferent and efferent connections of the interpeduncular nucleus, with special reference to the circuits linking the habenula, interpeduncular nucleus, and raphe nuclei.** 2018. 92 p. Ph. D. Thesis (Human Physiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The habenula is an epithalamic structure differentiated into two nuclear complexes, medial (MHb) and lateral habenula (LHb). Recently, MHb together with its primary target, the interpeduncular nucleus (IP), have been identified as major players in mediating the aversive effects of nicotine. However, structures downstream of the MHb-IP axis, including the median (MnR), caudal dorsal raphe nucleus (DRC), and the laterodorsal tegmental nucleus (LDTg), may contribute to the behavioral effects of nicotine. The afferent and efferent connections of the IP have hitherto not been systematically investigated with sensitive tracers. Thus, we placed injections of retrograde or anterograde tracers into different IP subdivisions, the MnR, or LDTg and additionally examined the transmitter phenotype of some major IP and MnR afferents by combining retrograde tract tracing with immunofluorescence and *in situ* hybridization techniques. Besides receiving topographically organized inputs from MHb and also LHb, we found that the main theme of IP connectivity are strong reciprocal interconnections with midline structures, including the MnR/DRC, nucleus incertus, supramammillary nucleus, septum, and LDTg. The bidirectional connections between IP and MnR and the LDTg inputs to the IP proved to be mostly GABAergic. Regarding a possible topography of IP outputs, all IP subnuclei gave rise to descending projections, whereas ascending projections, including focal projections to the ventral hippocampus, ventrolateral septum, and LHb mostly originated from the dorsocaudal IP. Our findings indicate that IP is closely associated to a distributed network of midline structures, all of them considered key modulators of hippocampal theta activity. Thus, IP forms a node that links MHb and LHb with this network and the hippocampus. Moreover, the rich predominantly GABAergic interconnections between IP and MnR, as well as IP and LDTg, support a cardinal role of these bidirectional pathways in the behavioral response to nicotine.

Key words: Medial habenula. Raphe nuclei. Hippocampus. Nicotine. Aversion.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Núcleo interpeduncular

O núcleo interpeduncular (IP) está localizado na linha média ventral do istmo/rombencéfalo (LORENTE-CÁNOVAS et al., 2012). Os dois terços rostrais do IP são cercados por diferentes subregiões da área tegmental ventral (VTA), enquanto o polo dorsocaudal do IP é localizado adjacente ao núcleo mediano da rafe (MnR). O IP é uma estrutura altamente complexa composta por vários subnúcleos. A base de critérios citoarquitetônicos e neuroquímicos pelo menos sete subnúcleos são distinguidos dentro do IP, três núcleos localizados na linha média, sendo denominados apical, rostral e central (IPA, IPR, IPC), e quatro subnúcleos bilaterais, denominados subnúcleo dorsolateral, dorsomedial, lateral e intermédio (IPDL, IPDM, IPL, IPI; LENN; HAMILL, 1984; GROENEWEGEN et al., 1986).

A conectividade e assinatura neuroquímica do IP foram bastante exploradas durante os anos oitenta do século passado. O IP é o principal, e provavelmente único, alvo da habênula medial (MHb). As massivas entradas da MHb percorrem o fascículo retroflexo (fr) e terminam de uma maneira bastante peculiar no IP (HERKENHAM; NAUTA; 1979; SUTHERLAND, 1982; KIM; 2009). A intrigante topografia e assinatura neuroquímica dessas entradas tem sido descritas detalhadamente em ratos (CONTESTABILE et al., 1987) e camundongos (QIN; LUO, 2009; HSU et al., 2013; GARDON et al 2014; QUINA et al., 2017). Assim, os axônios que originam da parte dorsal da MHb (MHbD) usam glutamato e substância P como neurotransmissor e inervam seletivamente o IPL e o teto dorsal do IP, enquanto os axônios oriundos da parte ventral da MHb (MHbV) co-liberam glutamato e acetilcolina nos restantes subnúcleos do IP (REN et al., 2011; FRAHM et al., 2015). Ademais, a maioria dos axônios oriundos da MHb atravessa o IP várias vezes num plano horizontal antes de terminar ipsilateralmente (HERKENHAM; NAUTA, 1979; KIM, 2009). Com relação a sua própria neuroquímica, o IP contém essencialmente neurônios GABAérgicos, além de uma minoria de neurônios glutamatérgicos (QUINA et al., 2017). Outros estudos pioneiros usando técnicas de imunoistoquímica e rastreamento neural (CONTESTABILE; FLUMERFELT, 1981; GROENEWEGEN et al., 1986; SHIBATA; SUZUKI; MATSUSHITA, 1986) revelaram que o IP não somente recebe proeminentes entradas colinérgicas oriundas da MHb, mas também descreveram robustas conexões recíprocas com outras estruturas mesopontinas da linha média ou próximo dela, incluindo o MnR, o núcleo dorsal da rafe (DR), o núcleo incerto (NI; GOTO; SWANSON; CANTERAS, 2001; RYAN et al., 2011) e o núcleo tegmental laterodorsal (LDTg).

Em relação as suas funções, o IP foi contextualizado como um dos principais alvos do sistema de condução diencefálica dorsal (DDC; SUTHERLAND, 1982). O DDC é altamente conversado durante a evolução (STEPHENSON-JONES et al., 2012; ROBERTSON et al., 2014) e abrange a estria medular (sm), os dois complexos nucleares da Hb (MHb e LHb), e o fr. O DCC foi contextualizado de regular particularmente o fluxo de informações entre estruturas do telencéfalo “límbico”, como o septo, o segmento interno do globo pálido e o hipotálamo lateral, com grupamentos monoaminérgicos do mesencéfalo e tegmento mesopontino, e assim integrar processos cognitivos com processos emocionais e sensoriais (SUTHERLAND, 1982; ELLISON, 1994).

1.2 Complexo habenular

A habênula (Hb) é o componente central do DDC e está localizado no teto do terceiro ventrículo, na região póstero-medial do tálamo dorsal. A Hb é uma estrutura filogeneticamente antiga, cujas projeções e assinatura neuroquímica são altamente conservadas durante a evolução (AMO et al., 2010; STEPHENSON-JONES et al., 2012; DE CARVALHO et al., 2014). Enquanto em lampreias, peixes, anfíbios e répteis a Hb apresenta uma pronunciada assimetria esquerda-direita, em mamíferos a Hb é uma estrutura bilateral praticamente simétrica (BIANCO; WILSON, 2009; AIZAWA, 2013). A Hb é subdividida em dois complexos nucleares principais, habênula medial (MHb) e habênula lateral (LHb). Em virtude de conexões aferentes e eferentes distintas (HERKENHAM; NAUTA, 1977, 1979; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012), a LHb é ainda subdividida em duas partes principais, a LHb medial (LHbM) e lateral (LHbL). Baseados nos critérios citoarquitetônico, citoquímico e ultraestrutural, no total quinze subnúcleos foram distinguidos na Hb, sendo cinco na MHb, LHbM e LHbL, respectivamente (ANDRES; VON DURING; VEH, 1999; GEISLER; ANDRES; VEH, 2003; AIZAWA et al., 2012; WAGNER; STROH; VEH, 2014). A maioria das suas aferências chegam à MHb e LHb através da estria medular enquanto a via de saída das projeções eferentes desses complexos nucleares é feita pelo fascículo retroflexo (HERKENHAM; NAUTA, 1977, 1979).

Apesar das principais aferências e eferências da LHb e MHb serem conduzidas pelo DCC, LHb e MHb apresentam um perfil de conexões bastante segregadas e uma assinatura neuroquímica diferenciada (ANTOLIN-FONTES et al., 2015; ZAHM; ROOT, 2017). Assim, a MHb recebe a grande maioria das suas entradas de distintas regiões do septo caudal, como o septo triangular, o septo fimbrial e o núcleo da banda diagonal (HERKENHAM; NAUTA, 1977; QIN; LUO, 2009; YAMAGUCHI et al., 2013), enquanto ela tem o IP como provavelmente único alvo (VISWANATH et al., 2014). As entradas da LHb são mais

diversificadas, sendo que LHbM e LHbL recebem aferências razoavelmente segregadas (HERKENHAM; NAUTA, 1979; PROULX; HIKOSAKA; MALINOW, 2014). Deste modo, aferências telencefálicas para a LHbM emergem do córtex pré-frontal, do pálido ventral, do septo, da região da banda diagonal e sobretudo de um vasto território do hipotálamo, se estendo da área pré-óptica até o hipotálamo lateral (HERKENHAM; NAUTA, 1977; KOWSKI et al., 2008; KIM; LEE, 2012; LI et al., 2011; YETNIKOFF et al., 2015). Ademais, a maioria, mas não todas (por exemplo, DEL-FAVA et al., 2007) entradas dos principais grupamentos monoaminérgicos e colinérgicos do mesencéfalo inervam preferencialmente a LHbM (ZAHM; ROOT, 2017; METZGER; BUENO; LIMA, 2017). Enquanto isso, a LHbL, além de receber também aferências do hipotálamo, é principalmente inervada pelo núcleo entopeduncular (EP; HERKENHAM e NAUTA; 1977), o homólogo do segmento interno do globo pálido de primatas.

Como já contextualizado por Sutherland (1982), a grande maioria das aferências da LHb são direcionadas para importantes grupamentos monoaminérgicos, colinérgicos e GABAérgicos da ponte e do mesencéfalo, incluindo grupamentos rostrais da rafe (DR, MnR/PMnR), a VTA, o LDTg, o núcleo tegmental rostromedial (RMTg) e NI (HERKENHAM; NAUTA, 1979; ARAKI; MCGEER; KIMURA, 1988; CORNWALL; COOPER; PHILLIPSON, 1990; GOTO; SWANSON; CANTERAS, 2001; JHOU et al., 2009a; KIM, 2009; HONG et al., 2011; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; SEGO et al., 2014; QUINA et al., 2015). Além dessas saídas primordiais, a LHb ainda emite escassas projeções para áreas talâmicas, hipotalâmicas e regiões do septo ventrolateral (HERKENHAM; NAUTA, 1979; ARAKI; MCGEER; KIMURA, 1988). De novo, as aferências da LHbM e LHbL parecem bastante segregadas, com as projeções para os grupamentos serotoninérgicos, dopaminérgicos e colinérgicos originando sobretudo da LHbM (HERKENHAM; NAUTA, 1979; CORNWALL; COOPER; PHILLIPSON, 1990; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; SEGO et al., 2014). Em contraste, o RMTg (JHOU et al., 2009a, b), um núcleo relé puramente GABAérgico (PERROTTI et al., 2005) localizado no tegmento rostromedial, é o principal alvo da LHbL. O RMTg, por sua vez, ficou conhecido por também robustamente inervar a VTA, o DR e o LDTg (BALCITA-PEDICINO et al., 2011; LAVEZZI; PARSELY; ZAHM, 2012; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; SEGO et al., 2014). Visto que a LHb é uma estrutura quase puramente glutamatérgica (BRINSCHWITZ et al., 2010), isso significa que LHbM e LHbL podem modular a atividade de grupamentos serotoninérgicos, dopaminérgicos e colinérgicos numa maneira bidirecional por vias paralelas e segregadas (GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; SEGO et al.; 2014; METZGER; BUENO; LIMA, 2017).

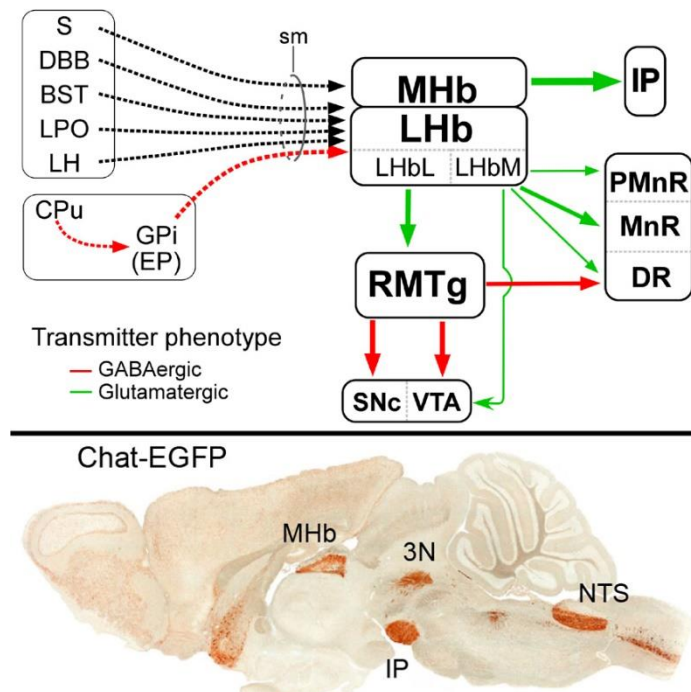


Figura 1. Diagrama esquemático modificado de Gonçalves, Seigo e Metzger (2012) mostrando alguns das mais proeminentes conexões aferentes e eferentes da Hb e fotomicrografia da expressão da enzima colina acetiltransferase (ChAT) em um camundongo geneticamente modificado destacando a posição do núcleo interpeduncular (IP) e da MHb (modificado de FRAHM et al. 2015).

1.3 Funções da Hb

Até pouco tempo atrás, as exatas funções da Hb permaneceram relativamente obscuras e a Hb foi implicada em funções tão diversas, como a regulação do sono, comportamento maternal e regulação dos ritmos circadianos (BIANCO; WILSON, 2009; HIKOSAKA, 2010). Porém, atualmente existem claras evidências que a Hb é, sobretudo, um componente-chave de um circuito anti-recompensa implicado no processamento de estímulos aversivos, variando de estímulos nocivos até a perda de recompensas esperadas (HIKOSAKA, 2010; SHELTON et al., 2012; PROULX; HIKOSAKA; MALINOW, 2014). Até o momento, a maioria das investigações focou as funções e conexões da LHb e, especificamente, seu papel na codificação de frustrações e no subsequente controle inibitório de grupamentos monoaminérgicos (LECOURTIER; DEFRANCESCO; MOGHADDAM, 2008; LAMMEL et al.; 2012). Possíveis funções da LHb foram investigadas sistematicamente numa série de estudos eletrofisiológicos inovadoras realizados em macacos (MATSUMOTO; HIKOSAKA, 2007, 2009). Esses estudos esclareceram que os neurônios da LHb são excitados por estímulos aversivos ou a omissão de recompensas, enquanto recompensas, como sinais que predizem recompensas, inibem os mesmos neurônios. Em humanos, a participação da LHb no processamento de estímulos aversivos foi relevada em elegantes estudos de imagem mostrando de maneira consistente que a LHb é seletivamente ativada por desfechos negativos

(ULLSPERGER; VON CRAMON, 2003; SHEPARD; HOLCOMB; GOLD, 2006). Em consonância com um possível papel chave na codificação de eventos aversivos, estudos em animais (CALDECOTT-HAZARD; MAZZIOTTA; PHELPS, 1988; AMAT et al., 2001) e humanos (MORRIS et al., 1999; SHEPARD; HOLCOMB; GOLD, 2006) apontaram que a hiperatividade da LHb é um fator importante em distúrbios do tipo depressivo (YANG et al., 2018; NUNO-PEREZ et al., 2018). Além disso, embora não haja projeções diretas entre a LHb e o hipocampo, foi recentemente demonstrado que uma LHb intacta é crítica para a codificação e resgate da memória espacial (GOUTAGNY et al., 2013; MATHIS et al., 2015), bem como para regular as oscilações teta do hipocampo (AIZAWA et al., 2013). Recentes estudos também apontam para um papel determinante da LHb na flexibilidade comportamental (BAKER; MIZUMORI, 2017) e adição a distintas drogas de abuso (JHOU et al., 2013; LECCA; MEYE; MAMELI, 2014; SHAH et al., 2017; FAKHOURY, 2018).

Em contraste, até recentemente muito pouco se soube sobre as funções e a circuitaria da MHb (para revisão ver, BIANCO; WILSON, 2009; VISWANATH et al., 2014). Mesmo apresentando um perfil de conexões bastante segregadas e uma assinatura neuroquímica diferenciada (ANTOLIN-FONTES et al., 2015; ZAHM; ROOT, 2017), aumentam as evidências que LHb e MHb exercem algumas funções importantes parecidas, Assim, como a LHb, a MHb tem sido implicada em distúrbios do tipo depressivo (SHUMAKE; EDWARDS; GONZALEZ-LIMA, 2003), em mecanismos de aversão (SORIA-GÓMEZ et al., 2015), e na regulação do medo e da ansiedade (OKAMOTO; AGETSUMA; AIZAWA, 2012; YAMAGUCHI et al., 2013; ZHANG et al., 2016). Também foram descritas variações diárias na atividade eletrofisiológica dos neurônios da MHb (SAKHI et al., 2014a), indicando que, de novo semelhante à LHb (SAKHI et al., 2014b; BAÑO-OTÁLORA; PIGGINS, 2017), a MHb está envolvida na regulação de ritmos circadianos. Mais importante, um papel fisiológico central tem sido atribuído recentemente para o eixo MHb-IP na resposta do cérebro à nicotina (JACKSON et al., 2015; FOWLER, 2017).

1.4. Papel do eixo MHb-IP na mediação dos efeitos aversivos da nicotina

Depois de décadas de relativa negligência, o interesse no eixo MHb-IP ressurgiu quando diversos estudos apontaram para o eixo MHb/IP como estruturas chaves de um circuito envolvido na mediação dos efeitos aversivos, bem como dos sintomas somáticos da retirada da nicotina (SALAS et al., 2009; para revisão ver, DE BIASI; DANI, 2011; FOWLER; KENNY, 2014; ANTOLIN-FONTES et al., 2015; MCLAUGHLIN; DANI; DE BIASI, 2017). Assim, a eliminação ou super-expressão de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) na MHb de

camundongos geneticamente modificados tem sido mostrado suficiente para modular o consumo de nicotina e a atividade neural no eixo MHb-IP (FOWLER et al., 2011; FRAHM et al., 2011). Particularmente as subunidades $\alpha 3$, $\beta 4$, e $\alpha 5$ são atualmente consideradas essenciais por desempenhar um papel-chave na mediação das propriedades aversivas da nicotina (GÖRLICH et al., 2013; para revisão ver, BALDWIN; ALANIS; SALAS, 2011; LESLIE; MOJICA; REYNAGA, 2013). De forma notável, essas três subunidades são expressas de maneira abundante e bastante seletiva na MHb e/ou IP (SHIH et al., 2014). Além disso, estudos genéticos de larga escala em humanos mostraram que o risco de desenvolver dependência de nicotina mais que dobra em indivíduos com duas cópias do alelo CHRNA5. Junto com CHRNA3 e CHRNB4, o CHRNA5 faz parte de um cluster de genes de risco do cromossomo 15 que codifica exatamente as subunidades $\alpha 3/\beta 4$ e $\alpha 5$ dos nAChRs e variações nesse cluster estão também associados ao risco elevado de desenvolver doença pulmonar obstrutiva crônica e câncer de pulmão (BIERUT et al., 2007, 2008; SACCONI et al., 2007). Entretanto, também foram identificados em camundongos geneticamente modificados alguns dos mecanismos pelo quais distintos nAChRs medeiam respostas chave para nicotina. Esses mecanismos incluem a facilitação da liberação de glutamato no IP pelos axônios originados na MHb (FRAHM et al., 2015), assim como a regulação da atividade marca-passo dos neurônios colinérgicos na MHb (GÖRLICH et al., 2013). No IP, Zhao-Shea et al. (2013) mostraram que principalmente neurônios GABAérgicos são ativados depois da retirada da nicotina e que a estimulação ótica de neurônios GABAérgicos do IP elícita os sintomas somáticos da abstinência de nicotina.

No entanto, há evidências crescentes de que alguns dos alvos principais do IP, como o MnR, a parte caudal do núcleo dorsal da rafe (DRC) e o LDTg contribuem para distintos efeitos comportamentais da nicotina. Assim, foi demonstrado que a importante subunidade $\alpha 5$ dos nAChRs é mais robustamente expressa no IP que na MHb, inclusive em neurônios do IP que se projetam para o MnR (HSU et al., 2013). Ademais, neurônios GABAérgicos no IP e MnR provavelmente participam na regulação da ansiedade durante a retirada da nicotina (ZHAO-SHEA et al., 2013; 2015). Ao mesmo tempo, o MnR e o DRC são considerados estruturas-chave envolvidas na regulação da ansiedade (DEAKIN; GRAEFF, 1991; ANDRADE et al., 2013; PAUL; LOWRY, 2013), tornando-os candidatos promissores para a mediação do aumento da ansiedade, um dos sintomas afetivos mais comuns da abstinência de nicotina.

No interim desde os estudos pioneiros sobre a conectividade do IP, novos núcleos foram delineados ou núcleos existentes têm sido descritos de ser composto de distintas sub-regiões funcionais, levando a novos conceitos sobre a estrutura e função de áreas específicas do cérebro (ver, GEISLER; ZAHM, 2005). O primeiro fato se aplica para o NI, que foi somente delineado

de forma convincente por Goto, Swanson e Canteras (2001) e Olucha-Bordonau et al. (2003). Além disso, nos últimos anos tem-se estabelecido que o complexo habênular (Hb) (ANDRES; VON DURING; VEH, 1999; GEISLER; ANDRES; VEH, 2003; AIZAWA et al., 2012; WAGNER; STROH; VEH, 2014) e os núcleos da rafe (COMMONS; CONNOLLEY; VALENTINO, 2003; HIOKI et al., 2010; CALIZO et al., 2011; SEGO et al., 2014) são estruturas altamente heterogêneas compostas por várias sub-regiões contendo populações neuronais distintas. Assim, foi mostrado que, distintos distritos do DR e MnR contêm além de neurônios serotonérgicos, uma grande quantidade de neurônios que expressam ou co-expressam GABA, dopamina e glutamato (HIOKI et al., 2010; SEGO et al., 2014). No IP, Zhao-Shea et al. (2013) mostraram que principalmente neurônios GABAérgicos são ativados depois da retirada da nicotina e que a estimulação ótica de neurônios GABAérgicos do IP elícita os sintomas somáticos da abstinência de nicotina.

Todos os estudos existentes de mapeamento neural das conexões do IP utilizaram traçadores pouco sensíveis e só detalharam pontualmente a neuroquímica das vias investigadas. Assim, considerando a só recentemente reconhecida importância biológica do eixo habênula-IP na resposta do cérebro à nicotina, o principal objetivo do presente trabalho foi reexaminar em detalhe as conexões aferentes e eferentes do IP assim como a assinatura neuroquímica de alguns das suas conexões principais. Ênfase especial foi dada para os circuitos entre a habênula, o núcleo interpeduncular, os núcleos da rafe e o tegmento pontino.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente estudo, investigamos através de traçadores anterógrado e retrógrado combinado com técnicas de imunistoquímica e hibridização *in situ* as conexões aferentes e eferentes do IP, bem como a assinatura neuroquímica de algumas de suas principais entradas e saídas. Os principais resultados do nosso estudo são mostrados em resumo na Figura 18. Em geral, verificamos que todos os subnúcleos do IP contribuem para as projeções descendentes do IP, tendo como alvos principais o MnR, o DRC, o NI, e o LDTg, enquanto as projeções ascendentes do IP para o SuM, a LHb, o LSV, e o hipocampo ventral são principalmente oriundas da parte dorsocaudal do IP. Resumindo, os nossos resultados sublinham que além de receber uma entrada dominante da MHb, a principal característica das conexões do IP são robustas interligações recíprocas com uma rede de núcleos da linha média. Essas estruturas incluem o MnR, o NI, o SuM e o septo, todas consideradas estruturas-chave na regulação da atividade teta do hipocampo. Além disso, observamos que as fortes conexões bidirecionais entre o IP e o MnR são na sua maioria oriundas de neurônios GABAérgicos e que as projeções do MnR são sobretudo direcionadas a subnúcleos do IP, diferentes daqueles que emitem as mais proeminentes saídas para o MnR. Finalmente, revelamos que as projeções do LDTg para o IP são predominantemente GABAérgicas e colinérgicas. Nossos resultados serão discutidos dando referência a um papel funcional do IP 1.) como núcleo relé entre as duas divisões principais da habênula e o hipocampo, 2.) como uma região associada a uma rede de estruturas da linha média envolvida no controle do ritmo teta do hipocampo e 3.) com respeito a importância das interconexões do IP com o MnR e LDTg para a resposta comportamental à nicotina.

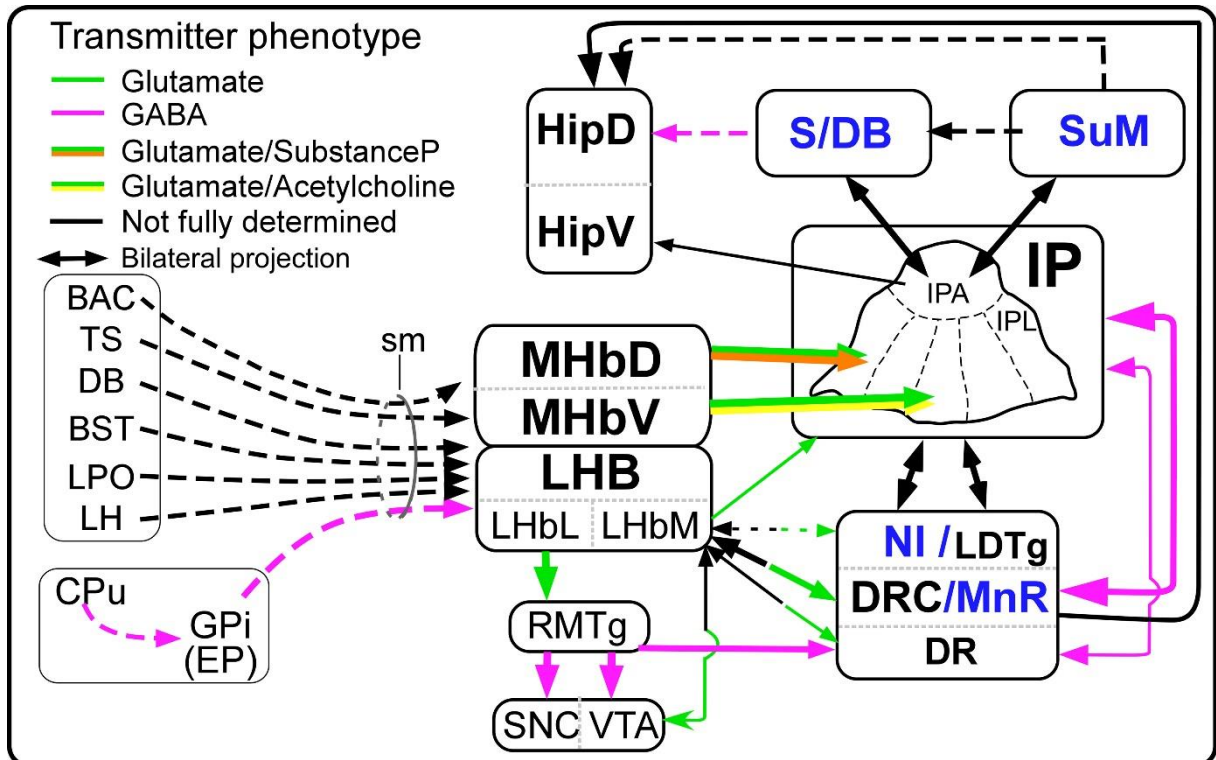


Figura 18. Diagrama esquemático das principais conexões aferentes e eferentes da Hb e IP, destacando as fortes conexões recíprocas do IP com estruturas consideradas moduladoras-chave da atividade teta hipocampal (indicada por letras azuis). Este diagrama é baseado em conexões exploradas neste estudo ou estudos anteriores do nosso grupo (linhas sólidas) e dados da literatura (linhas tracejadas). Observe que o diagrama é altamente simplificado. Assim, algumas das conexões aqui descritas como unilaterais são bidirecionais e existem ricas interconexões entre a maioria das estruturas mesopontinas e mesencefálicas incluídas nesse diagrama. Por razões de simplicidade, essas conexões não são mostradas. Observe também que enquanto as projeções da LHbM para o tegmento pontino e os núcleos da rafe são todas glutamatérgicas, as projeções de volta dessas estruturas para a LHb muitas vezes exibem uma assinatura neuroquímica mista e ainda não completamente determinada. Esquema parcialmente adaptado de Hikosaka (2010), Gonçalves, Seigo e Metzger (2012), Lima et al. (2017). Para abreviações, veja a lista.

5.1 Considerações metodológicas

Uma limitação inerente para a interpretação dos resultados de um estudo de rastreamento neural é o potencial de captação e transporte dos traçadores neuronais retrógrados e anterógrados por fibras de passagem lesadas que passam pelos locais de injeções (CLIFFER; GIESLER, 1988; LUPPI et al., 1995). A necrose acentuada no local de injeção tem sido considerada como a principal causa de captação do traçador por fibras de passagem (DADO et al., 1990; LUPPI et al., 1995). No entanto, o IP é um núcleo bem delimitado contido numa cápsula, e não é atravessado por outros proeminentes tratos de fibras. Além disso, no presente estudo, PHA-L e CTb na maioria dos casos, foram injetados por iontoforese usando corrente pulsada, a fim de minimizar o desenvolvimento de calor e consequente dano tecidual próximo as pontas das pipetas (LUPPI et al., 1990). Todavia, não podemos excluir totalmente que alguma captação de PHA-L ou CTb tenha ocorrido por fibras de passagem lesadas.

Um problema metodológico severo foi observado em nossos experimentos combinados de rastreamento retrógrado com CTb com hibridização *in situ* usando sondas radioativas. Assim em algumas regiões, como o DRC e o NI encontramos uma robusta marcação retrógrada de CTb sendo fortemente misturados com uma também densa marcação anterógrada de CTb. Isso muitas vezes tornou inviável de reconhecer sem dúvida limites celulares e assim atribuir as aglomerações de prata resultantes das hibridizações a distintos neurônios CTb+. Por exemplo, no NI foram detectados vários neurônios CTb+ exibindo aglomerados de grãos de prata indicativos de mRNA de GAD67 ou VGLUT2. Porém, devido ao fato descrito acima, não foi possível de realizar uma análise sistemática das células duplamente marcadas nessas regiões.

5.2 Comparações gerais dos nossos resultados com aquelas de estudos anteriores

Os resultados obtidos até o presente momento estão de acordo com os resultados de estudos pioneiros de rastreamento neural que examinaram as conexões aferentes (CONTESTABILE; FLUMERFELT, 1981; SHIBATA; SUZUKI; MATSUSHITA, 1986) e eferentes do IP (GROENEWEGEN et al., 1986). No entanto, desde então, novos núcleos têm sido descritos ou núcleos existentes foram subdivididos em compartimentos funcionalmente distintos, levando a novos conceitos sobre a estrutura e função de diversas regiões do cérebro (ver, GEISLER; ZAHM, 2005). A afirmação inicial se aplica ao NI, que foi somente delineada de forma convincente por Goto, Swanson e Canteras (2001) e Olucha-Bordonau et al. (2003). Além disso, atualmente existe amplo consenso que a Hb (ANDRES; VON DURING; VEH, 1999; GEISLER; ANDRES; VEH, 2003; AIZAWA et al., 2012; WAGNER; STROH; VEH, 2014) e os núcleos da rafe (COMMONS; CONNOLLEY; VALENTINO, 2003; HIOKI et al., 2010; CALIZO et al., 2011; SEGO et al., 2014) são estruturas altamente heterogêneas, compostos por várias sub-regiões contendo populações neuronais distintas. Assim, uma vez que os núcleos da rafe, a Hb e o NI são pilares da conectividade do IP e são os focos deste estudo, os nossos resultados contribuem com novos aspectos importantes aos estudos pioneiros citados acima.

Em contraste com a descrição clássica de Groenewegen et al. (1986), que utilizaram aminoácidos radioativos ou conjugado aglutinina do germe de trigo-peroxidase do rábano silvestre (WGA-HRP) como traçadores anterógrados, o uso de PHA-L nos permitiu de distinguir claramente entre campos terminais e fibras de passagem. Ademais, algumas de nossas injeções de PHA-L ou CTb foram pequenas o suficiente de propiciar conclusões bem fundamentadas sobre a topografia de algumas entradas e saídas do IP. Por exemplo, as projeções da MHb para o IP têm sido descritas em bastante detalhe através de estudos de rastreamento

neural (CONTESTABILE; FLUMERFELT, 1981; KIM, 2009), imunistoquímica (CONTESTABILE et al., 1987) ou distintos ensaios em camundongos geneticamente modificados (QUINA et al., 2009; REN et al., 2011; HSU et al., 2013, 2014; BROMS et al., 2014; SHIH et al., 2014; FRAHM et al., 2015). Em conjunto, esses estudos destacaram que, enquanto que o IPL e o teto dorsal do IP são na primeira linha inervados por neurônios da MHbD usando glutamato e substância P, todo o restante do IP é inervado por neurônios da MHbV que co-liberam glutamato e acetilcolina (para uma revisão ver, ANTOLIN-FONTES et al., 2015). No entanto, apesar da riqueza de informações sobre as projeções diferenciadas da MHbD e MHbV para o IP, pouco se sabe sobre as projeções específicas dos distintos subnúcleos, recentemente delineados dentro da MHbD e MHbV (AIZAWA et al., 2012; WAGNER; STROH; VEH, 2014). A este respeito, nossos resultados de rastreamento retrógrado demonstram que os subnúcleos IPC e IPI na parte ventral do IP são seletivamente inervados pela MHbVm, enquanto a MHbVc e MHbVI inervam principalmente o grupo dorsal dos subnúcleos do IP.

5.3 O IP como elo entre as duas divisões da habênula e o hipocampo

É importante ressaltar que nossos resultados de rastreamento anterógrado especificam que as projeções ascendentes do IP são quase exclusivamente oriundas da parte dorsocaudal do IP, formando proeminentes campos terminais focais no SuM, na LHbM, no LSV e no hipocampo ventral. A primeira observação está conforme com os resultados de estudos anteriores de rastreamento retrógrado, indicando que a maior parte dos neurônios retrogradamente marcados resultantes de injeções no hipocampo ou no septo foram restritas ao IPA, com muito poucos neurônios adicionais encontrados no IPL (GROENEWEGEN; STEINBUSCH, 1984; MONTONE; FASS; HAMILL, 1988). No que diz respeito à estudos anteriores de rastreamento anterógrado, o SuM e o LSV já foram descritos como alvos importantes do IP por Groenewegen et al. (1986), enquanto somente projeções mínimas do IP para a LHb e o hipocampo ventral têm sido descritas. Porém, as projeções do IP para a LHb e o hipocampo ventral podem ser altamente relevantes, uma vez que proporcionam uma via de ligação indireta entre a MHb e a LHb, e também entre a Hb e o hipocampo. Embora, que uma parte dos axônios da MHb atravessam a LHb (KIM; CHANG, 2005), conexões intrínsecas entre MHb e LHb nunca foram demonstradas de forma convincente. Nossos resultados indicam que o IP pode ser um elo pelo qual informação vinda da MHb é transmitida para a LHb. Por sua vez, conforme com nossos dados atuais de rastreamento retrógrado, vários estudos de rastreamento anterógrado (KIM, 2009; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; QUINA et

al., 2015) têm demonstrado uma entrada bastante focal da LHbM para o IP. Assim, nossos dados providenciam mais evidências para uma alça de retroalimentação entre a LHbM e o IP e também sugerem que informações vindas da MHb e da LHbM podem ser acopladas e integradas no IP.

Os resultados de vários estudos evidenciaram que a LHb é funcionalmente acoplada ao hipocampo dorsal e também sugerem um envolvimento da LHb no processamento da memória espacial (LECOURTIER; NEIJT; KELLY, 2004; GOUTAGNY et al., 2013; MATHIS et al., 2015). Além disso, estudos recentes revelaram um elevado grau de sincronia entre a LHb e o hipocampo dorsal e revelaram que lesões da LHb reduzem as oscilações teta do hipocampo (AIZAWA et al., 2013; GOUTAGNY et al., 2013). No entanto, até o momento nenhuma ligação direta entre Hb e hipocampo tem sido mostrado, ficando obscuro como a LHb pode modular a atividade hipocampal. A saída direta do IP para o hipocampo demonstrado aqui, indica que o IP pode ser um dos relés pelo qual informações vindas da MHb e LHb podem chegar ao hipocampo. No entanto, é bem conhecido que o processamento da memória espacial ocorre preferencialmente no hipocampo dorsal (MOSER; MOSER; ANDERSEN, 1993; ROYER et al., 2010), enquanto o hipocampo ventral está mais relacionado ao estresse, a emoção e ao afeto (FANSELOW; DONG, 2010; O'LEARY; CRYAN, 2014). Assim, é sugestivo especular que a função da projeção focal do IP para o hipocampo ventral seria de transmitir informações sobre eventos aversivos processadas na LHb, e também na MHb, para o hipocampo. Conforme com isso, os resultados de um estudo recente de rastreamento retrógrado transsináptico mostraram que a MHb é ligada através de uma via bi-sináptica com o hipocampo ventral, provavelmente através de um relé na parte dorsal do IP (OHARA et al., 2013).

Por outro lado, é bastante aceitável que a LHb pode influenciar o processamento da memória espacial e a atividade teta do hipocampo, indiretamente através do MnR. De acordo com isto, foram mostradas projeções focais diretas da LHbM para o MnR (BEHZADI et al., 1990; SEGO et al., 2014), que por sua vez, inerva principalmente o hipocampo dorsal (VERTES; FORTIN; CRANE, 1999). Além disso, foi demonstrado por Aizawa et al. (2013) que o efeito inibitório de lesões na LHb sobre as oscilações teta do hipocampo depende de um MnR intacto. Ademais, nesse estudo, a maior parte dos neurônios da LHb com atividade síncrona foi encontrado na LHbM. Ao todo, nossos dados ilustram como informações vindas da LHb e MHb podem ser transmitidas para o hipocampo. Eles ainda reforçam que a LHbM possui um conjunto de conexões diferenciadas comparada à LHbL (HERKENHAM; NAUTA, 1977; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; SEGO et al., 2014).

5.4 O IP como uma parte associada de uma rede de estruturas da linha média envolvido no controle do ritmo teta do hipocampo

A atividade teta do hipocampo (4-12 Hz) é um dos ritmos mais regulares do cérebro que pode ser facilmente registrada no eletroencefalograma durante a atividade locomotora voluntária, estados cerebrais associadas ao alerta, e durante o sono REM. A atividade teta é controlada por uma rede neuronal que se estende do tronco cerebral para o prosencéfalo, com a parte oral do núcleo reticular pontino (PNO), o SuM e o complexo septo medial/núcleo da banda diagonal (MS/DB) consideradas peças-chaves para a indução, e o MnR para a interrupção do ritmo teta (para revisão ver, VINOGRADOVA, 1995; VERTES; KOCSIS, 1997; PAN; MCNAUGHTON, 2004; ORZEŁ-GRYGLEWSKA; MATULEWICZ; JURKOWLANIEC, 2015). Embora os mecanismos exatos ainda não estejam bem esclarecidos, há indícios de que as oscilações teta desempenham um papel importante em processos de neuroplasticidade hipocampal, subjacentes a funções de memória e orientação espacial (HUERTA; LISMAN, 1993; BUZSÁKI, 2002; HASSELMO, 2005; HASSELMO; STERN, 2014). Porém, até o momento, existem somente relatos isolados na literatura que ligam o eixo MHb/IP com a modulação da atividade teta. Assim, tem sido demonstrado que lesões do FR (VALJAKKA et al., 1998) e perda de um fator de transcrição no IP (FUNATO et al., 2010) reduzem as fases REM do sono e modulam a banda da atividade teta.

De forma importante, nossos resultados obtidos sublinham que o IP é robustamente interligado de forma recíproca com estruturas tradicionalmente consideradas como reguladores-chave da atividade teta do hipocampo, tais como o SuM, MS/DB e MnR. Além disso, eles demonstram ligações bilaterais entre o IP e estruturas que só recentemente foram reconhecidas como moduladores do ritmo teta, como o NI (NUÑEZ et al., 2006; MA et al., 2009; MARTÍNEZ-BELLVER et al., 2015) e a LHb (AIZAWA et al., 2013; GOUTAGNY et al., 2013). Ao todo, isso sugere um papel mais amplo do IP na modulação do ritmo teta do que anteriormente relatado que deve em estudos futuros também sendo investigado através de técnicas farmacológicas e eletrofisiológicas.

Conexões recíprocas do IP com o SuM já foram descritas anteriormente (SHIBATA; SUZUKI; MATSUSHITA, 1986; GROENEWEGEN et al., 1986). Nós mostramos aqui que a maioria dos neurônios que se projetam do SuM para o IP exibem um fenótipo glutamatérgico. Entretanto, são necessários estudos mais profundos para detalhar o exato fenótipo das projeções do SuM para o IP, uma vez que foi demonstrado que os axônios do SuM que inervam o hipocampo apresentam um fenótipo GABAérgico, glutamatérgico ou misto (SOUSSI et al., 2010). Nossos dados de rastreamento anterógrados indicam que o IPA contribui mais para as

projeções do IP para o SuM. Esse achado está bem alinhado com os dados de Kiss et al. (2002), que descreveram que os neurônios retrogradamente marcados resultantes de injeções no SuM, foram em sua maioria confinados ao IPA.

Nossos resultados obtidos com traçadores anterógrados em relação às projeções do IP para o septo são mais difíceis de conciliar com um papel do IP na modulação do ritmo teta, uma vez que encontramos a marcação anterógrada concentrada no LSV e não no MS/DB, que é tradicionalmente visto como a principal região marca-passo da atividade teta hipocampal (PETSCHKE; STUMPF; GOGOLAK, 1962). No entanto, foi proposto que não apenas o MS/DB, mas toda a rede neural que liga o hipocampo com o septo medial e lateral seja envolvido na gênese do ritmo teta (NERAD; MCNAUGHTON, 2006). Assim, estudos anteriores mostraram que as saídas septais para a MHb são primariamente oriundas do septo posterior (SPERLÁGH et al., 1998; YAMAGUCHI et al., 2013). Os dados do presente estudo mostrando projeções focais do IP para o LSV, indicam a existência de um tipo de circuito de retroalimentação, ligando a MHb através do IP com o septo. De forma notável, o septo lateral é tradicionalmente visto como uma parte importante dos circuitos envolvidos na sinalização de eventos aversivos no cérebro (SHEEHAN; CHAMBERS; RUSSELL, 2004) e tem sido mostrado funcionalmente ligado a Hb (MIRRIONE et al. 2014) e hipocampo ventral (CALFA; BUSSOLINO; MOLINA, 2007). Confirmamos os achados de estudos de rastreamento retrógrado anteriores (CONTESTABILE e FLUMERFELT, 1981; SHIBATA; SUZUKI; MATSUSHITA, 1986), descrevendo uma entrada robusta direta do MS/DB para o IP. No entanto, em contraste com estudos anteriores (por exemplo, ALBANESE; CASTAGNA; ALTAVISTA, 1985), descobrimos que a grande maioria dos neurônios que se projetam do IP para o MS/DB são não-colinérgicos. Essa discrepância pode ser devido ao fato de que a acetilcolinesterase, que é muito menos específica que a ChAT, foi usada como marcador para um fenótipo colinérgico nesses estudos anteriores. Mais uma vez, o fenótipo exato do neurotransmissor usado pelas projeções do MS/DB ainda precisa ser esclarecido.

Nossos achados também fortemente enfatizam que conexões recíprocas com o NI é outra característica marcante da conectividade do IP. Conexões bidirecionais entre IP e NI já foram documentadas em estudos anteriores de rastreamento neural (HAMILL; JACOBOWITZ, 1984; GROENEWEGEN et al. 1986; SHIBATA; SUZUKI; MATSUSHITA, 1986). No entanto, naquela época, o NI ainda não era muito caracterizado e diferenciado de outras estruturas circundantes do tegmento dorsal. Assim, nos relatos de Hamill e Jacobowitz, (1984) e Shibata, Suzuki e Matsushita (1986), o NI foi, provavelmente, confundido com o núcleo esferoide. Funcional e anatomicamente, o NI está altamente integrado em circuitos que regulam

a ativação cerebral e a motivação (GOTO; SWANSON; CANTERAS, 2001; OLUCHA-BORDONAU et al., 2003; SANCHEZ-PEREZ et al., 2015). É importante ressaltar que nossos achados sublinham que o IP, o NI (GROENEWEGEN et al. 1986; SHIBATA; SUZUKI; MATSUSHITA, 1986), e o MnR, (BEHZADI et al., 1990; VERTES; FORTIN; CRANE, 1999) apresentam um conjunto semelhante de conexões robustas bilaterais com núcleos-chave envolvidos na indução do ritmo teta, como o SuM e MS/DB. Embora, no caso do septo, as projeções do IP para essa estrutura sejam diferentes daquelas oriundas do NI e MnR, uma vez que os axônios do IP inervam principalmente o LSV, enquanto o MnR (VERTES; FORTIN; CRANE, 1999) e o NI (GOTO; SWANSON; CANTERAS, 2001) projetam com maior destaque para o MS. Estudos combinando lesões, registros eletrofisiológicas (NUÑEZ et al., 2006), e rastreamento neural (TERUEL-MARTÍ et al., 2008) caracterizaram o NI como um elo entre o PnO e o MS/DB. Devido a este conjunto único de conexões, NI é considerado uma estrutura relé que integra a ativação comportamental com o ritmo teta hipocampal (RYAN et al., 2011; MA; GUNDLACH, 2015; MARTÍNEZ-BELLVER et al., 2015). No entanto, tem sido proposto que o NI não está envolvido apenas na ativação comportamental, mas também na esQUIVA ativa, com entradas do IP e do MnR exercendo influência inibitória sobre o NI (GOTO; SWANSON; CANTERAS, 2001). A LHb é considerada uma estrutura chave envolvida na esQUIVA ativa (HIKOSAKA, 2010; STAMATAKIS; STUBER, 2012). Visto que o NI recebe entradas robustas diretas da LHbM (GOTO; SWANSON; CANTERAS, 2001), a entrada maciça do IP para o NI pode fornecer informações adicionais de valência negativa para o NI, indiretamente através do eixo do septo caudal/MHb/IP. Esta informação pode então ser integrada no NI para evitar, de forma adaptativa, riscos potenciais (ver também, AMO et al., 2014).

No geral, o caráter bidirecional distinto das conexões do IP com estruturas como o NI, MnR, SuM e septo, bem como as ricas interconexões recíprocas entre os últimos (por exemplo, VERTES, 1988, 1992; VERTES; FORTIN; CRANE, 1999; GOTO; SWANSON; CANTERAS, 2001), fortemente suportam uma hipótese recentemente postulado por Sanchez-Perez et al. (2015, p. 565). Esclarecendo as conexões bilaterais entre NI e septo, esses autores concluíram que: “Processos neurais e os comportamentos associados, iniciados ou modulados por mudanças no ritmo teta do hipocampo, dependem provavelmente de conexões recíprocas entre vias ascendentes e descendentes, em vez da regulação unidirecional através do septo medial”.

5.5 Topografia das projeções entre o IP e o DR

O DR e MnR já foram descritos em estudos anteriores como sendo importantes fontes de entradas (CONTESTABILE e FLUMERFELT, 1981; SHIBATA; SUZUKI; MATSUSHITA,

1986), bem como os principais alvos (GROENEWEGEN et al., 1986) do IP. No entanto, a exata topografia e assinatura neuroquímica das conexões recíprocas entre o IP e DR permaneceram largamente inexploradas. Destacamos aqui a existência de um gradiente nítido rostro-caudal em relação à densidade de marcação das conexões bidirecionais entre o IP e DR, destacando o DRC como principal fonte e alvo do IP. De acordo com isso, Groenewegen et al. (1986) já descreveram o DRC como a sub-região do DR, sendo mais fortemente marcado após injeções de traçador anterógrado no IP.

É importante ressaltar que as conexões diferenciais do DRC descritas aqui fornecem evidências substanciais adicionais de que o DRC é consideravelmente distinto dos dois terços rostrais do DR (ver também, GONÇALVES et al., 2009; GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; SEGO et al., 2014). A este respeito, com base em uma análise de dados publicados na internet (Allen Institute for BrainScience. Allen Mouse Brain Connectivity Atlas [Inter-net]. Disponível em: http://connectivity.brain-map.org/;RRID:nlx_146253) (Oh et al., 2014) mostrando que o DRC compartilha mais conexões com o MnR do que com o DR, Commons (2015, 2016) propôs recentemente que faz mais sentido afiliar o DRC (grupamento B6) com o MnR (grupamento B8) do que com o DR rostral (grupamento B7). Em sintonia com isso, agora há claras evidências de que o DR e MnR inervam (VERTES; FORTIN; CRANE, 1999; MUZERELLE et al., 2016), e também recebem projeções (OGAWA et al., 2014; POLLAK DOROCIC et al., 2014), de um conjunto diferencial de estruturas cerebrais. Além disso, também em termos de origem embrionária, o DRC está mais relacionado com o MnR do que com o DR rostral (ALONSO et al., 2013). Argumentando que o DRC e a MnR estão intimamente ligados à LHbM (BEHZADI et al., 1990; SEGO et al., 2014), Commons (2015) propôs que ambas fazem parte de circuitos que influenciam o grau de excitação e processos de aprendizagem, particularmente sob condições aversivas.

Em geral, nossos resultados corroboram bem com essas suposições, detalhando que ambos, o DRC e o MnR, comparado a parte rostral do DR, exibem conexões bilaterais muito mais robustas com o IP. Além disso, nossos resultados indicam que informações aversivas podem ser transmitidas para o MnR/DRC também através do eixo MHb/IP. No entanto, resta esclarecer se, em termos hodológicos, há uma transição brusca entre o DR rostral e o DRC ou, como indicado pelos nossos resultados, uma transição gradual ao longo do eixo rostrocaudal do DR.

Nós também especificamos que nos dois terços rostrais do DR, os neurônios que aferentam o IP, consistem exclusivamente de neurônios GABAérgicos localizados no DRL. De forma recíproca, nessa porção rostral do DR, a maioria dos axônios oriundos do IP tem também

o DRL como principal alvo. De forma notável, foi demonstrado que neurônios serotoninérgicos e GABAérgicos do DRL são ativados pela nicotina aguda (ver Figura 8 em SPERLING; COMMONS, 2011) e que circuitos GABAérgicos no DRL são seletivamente alterados seguido estresse social (CRAWFORD; RAHMAN; BECK, 2013). Ao todo, nossos achados fornecem novas evidências de que o DR é uma estrutura altamente heterogênea composta de várias sub-regiões que contém subpopulações neuronais distintas que diferem em relação a sua assinatura neuroquímica, suas projeções, e propriedades eletrofisiológicas (para exemplo, COMMONS; CONNOLLEY; VALENTINO, 2003; HIOKI et al., 2010; CALIZO et al., 2011; HALE; LOWRY, 2011, para mais citações ver, SEGO et al., 2014).

5.6 Organização dos circuitos entre Hb, IP e MnR/DRC e LDTg considerações funcionais

Existe atualmente amplo consenso de que o eixo MHb-IP desempenha um papel chave na mediação das propriedades aversivas da nicotina e comportamentos de abstinência (para revisões, ver ANTOLIN-FONTES et al., 2015; FOWLER; KENNY, 2014; JACKSON et al., 2015). Assim, nAChRs distintos provaram mediar as principais respostas à nicotina por meio de mecanismos que incluem a facilitação pré-sináptica da liberação de glutamato pelos axônios MHb no IP (FRAHM et al., 2015), e a regulação da atividade do marcapasso dos neurônios colinérgico na MHbV (GÖRLICH et al., 2013), que são notavelmente capazes de co-liberar acetilcolina e glutamato no IP através de diferentes modos de transmissão (REN et al., 2011).

Porém, enquanto é bem documentado que as manifestações somáticas de abstinência de nicotina são primariamente mediadas pelo eixo MHb-IP (SALAS et al., 2009; ZHAO-SHEA et al., 2013), muito menos se sabe sobre as estruturas que contribuem para as consequências afetivas da retirada da nicotina, incluindo o aumento da ansiedade (DAMAJ; KAO; MARTIN, 2003; JACKSON et al., 2015). Candidatos promissores apontados em nosso trabalho como alvos principais do IP, são o MnR/DRC e o LDTg. O MnR e DRC foram apontados em experimentos farmacológicos/comportamentais, usando o marcador de atividade neural c-Fos como aqueles distritos da rafe seletivamente envolvidos na regulação da ansiedade (SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI, 2012; ANDRADE et al., 2013). Conforme com isso, vários estudos genéticos em peixes zebras (AGETSUMA et al., 2010; AMO et al., 2014) e camundongos (YAMAGUCHI et al., 2013; SORIA-GÓMEZ et al., 2015; ZHANG et al., 2016) implicaram recentemente o eixo MHb-IP, e também o eixo LHb-MnR, na regulação da ansiedade e do medo. Assim, embora MHb e LHb exibam um conjunto de conexões bastante diferenciada, esses estudos fornecem evidências adicionais que ambos os complexos nucleares da Hb

desempenham um papel importante na regulação do comportamento (BENARROCH, 2015) e estão particularmente envolvidos no enfrentamento de condições aversivas (AMO et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

Com relação ao IP, Zhao-Shea et al. (2013) revelaram que principalmente seus neurônios GABAérgicos são ativados durante a retirada da nicotina. Evidências adicionais para um papel importante de mecanismos GABAérgicos na retirada da nicotina foram fornecidos por Hsu et al. (2013), mostrando que a subunidade $\alpha 5$ de nAChR é fortemente expressa em um subgrupo de neurônios GABAérgicos no IP, alguns deles projetando para o MnR e também em populações neuronais GABAérgicas nas principais regiões alvos do IP incluindo o MnR/DRC. Assim, em absoluta concordância com essas descobertas recentes e um papel potencial para a alça IP-MnR na mediação dos efeitos ansiolíticos da nicotina, nós determinamos em nosso trabalho que, tanto no IP quanto no MnR, principalmente neurônios GABAérgicos dão origem às robustas conexões bidirecionais entre eles. Ademais, nossos resultados em relação à diversidade de neurotransmissores no DR e MnR/PMnR, incluindo a abundância de neurônios GABAérgicos observada no MnR/PMnR, estão bem de acordo com descrições recentes na literatura (HIOKI et al., 2010; SOS et al., 2017, para uma discussão detalhada sobre essa diversidade, ver SEGO et al., 2014).

Em relação às interconexões do IP com o LDTg, nossos dados são perfeitamente em acordo com um recente estudo de rastreamento viral de Quina et al. (2017). Assim como esse estudo, nós mostramos que as projeções entre IP e LDTg exibem uma lateralização intrigante e envolvem principalmente o IPDL contralateral e a parte dorsal do IPR. Notavelmente, Wolfman et al. (2018) recentemente revelaram em um elegante estudo optogénético que o LDTg também participa nos efeitos aversivos da nicotina. Assim, esses autores demonstraram que as projeções do IP para o LDTg são GABAérgicas e que a estimulação optogénética dessa via elícita comportamento de esquiva. Ademais, somente altas doses de nicotina ativam a via IP – LDTg e provocam respostas aversivas, fortemente indicando que essa via especificamente contribua na mediação dos efeitos aversivos da nicotina. Em nosso estudo, mostramos que a via do LDTg para o IP é predominantemente GABAérgica (cerca 66%), mas também contém uma considerável componente colinérgica (cerca 28%). Junto com os resultados de Wolfman et al. (2018) isso indica que com no caso das vias bilaterais entre IP e MnR, a conexão recíproca entre IP e LDTg também é principalmente GABAérgica. O componente colinérgico da via LDTg – IP, indica que o LDTg ao lado da MHb contribui para a inervação colinérgica do IP, e talvez assim como a via LDTg – VTA (LAMMEL et al., 2012; STEIDL et al., 2017) para processos de plasticidade associada a mecanismos de recompensa.

No momento, podemos apenas especular sobre um potencial significado funcional das alças GABAérgicas de retroalimentação entre o IP e MnR assim como IP e LDTg. Existem mais exemplos de projeções GABAérgicas bidirecionais de longo alcance (revisado em CAPUTI et al., 2013), sendo a mais proeminente a alça GABAérgica que liga o septo com o hipocampo. Foi proposto que a atividade em tal tipo de circuito levaria à desinibição das células excitatórias nas áreas-alvos (FREUND; ANTAL, 1988; TOTH; BORHEGYI; FREUND, 1993), e também, temporalmente, para uma atividade oscilatória coordenada (CAPUTI et al., 2013). Para esclarecer parâmetros importantes como a assinatura neuroquímica dos neurônios alvos na alça IP-MnR e o grau de sincronia exibido por IP e MnR sob diferentes condições, são necessários futuros estudos eletrofisiológicos e também de microscopia imunoeletrônica. Além disso, o fato de que o MnR também recebe entradas excitatórias diretas da LHbM (BEHZADI et al., 1990), que por sua vez recebe entradas do septo lateral, da área pré-óptica lateral e do pálido ventral (HERKENHAM e NAUTA, 1977; YETNIKOFF et al., 2015), implica que o MnR tem acesso a informações adicionais relacionadas a mecanismos de recompensa ou aversão através da LHbM.

Ao todo, nossos achados providenciam importantes novos detalhes em relação a um sistema complexo de vias paralelas e topograficamente organizadas que ligam MHb e LHb com MnR/DRC, LDTg e NI, tanto bi-sinápticamente através do IP; ou LHb também por projeções diretas principalmente oriundas da LHbM. (GONÇALVES; SEGO; METZGER, 2012; GOTO; SWANSON; CANTERAS, 2001; HERKENHAM e NAUTA, 1979; KIM, 2009; SEGO et al., 2014, LIMA et al., 2017). Além disso, eles comprovam que distintas subdivisões da MHb (MHbD, MHbV), LHb (LHbM, LHbL) e do IP fazem parte de vias segregadas que foram recentemente implicadas em funções comportamentais distintas (HSU et al., 2014; PROULX; HIKOSAKA; MALINOW, 2014; YAMAGUCHI et al., 2013), com um papel fundamental na dependência da nicotina atribuída ao eixo IP-MHbV central (FRAHM et al., 2015). Em conjunto, nossos achados destacam circuitos entre Hb, IP e MnR/DRC que são altamente preservadas durante a evolução e podem ser acima de tudo relevante na supressão/ativação comportamental e, especificamente, nos mecanismos de reatividade emocional à nicotina.

REFERÊNCIAS¹

- AGETSUMA, M.; AIZAWA, H.; AOKI, T.; NAKAYAMA, R.; TAKAHOKO, M.; GOTO, M.; SASSA, T.; AMO, R.; SHIRAKI, T.; KAWAKAMI, K.; HOSOYA, T.; HIGASHIJIMA, S.; OKAMOTO, H. The habenula is crucial for experiencedependent modification of fear responses in zebrafish. **Nature Neuroscience**, v. 13, p. 1354-1356, 2010.
- AIZAWA, H.; KOBAYASHI, M.; TANAKA S.; FUKAI T.; OKAMOTO, H. Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. **J Comp Neurol**, v. 520, p. 4051-4066, 2012.
- AIZAWA, H.; YANAGIHARA, S.; KOBAYASHI, M.; NIISATO, K.; TAKEKAWA, T.; HARUKUNI, R.; MCHUGH, T.J.; FUKAI, T.; ISOMURA, Y.; OKAMOTO, H. The synchronous activity of lateral habenular neurons is essential for regulating hippocampal theta oscillation. **J Neurosci**, v. 33, p. 8909-8921, 2013.
- ALBANESE, A.; CASTAGNA, M.; ALTAVISTA, M. C. Cholinergic and non-cholinergic forebrain projections to the interpeduncular nucleus. **Brain Research**, v. 329, p. 334–339, 1985.
- ALONSO, A.; MERCHÁN, P.; SANDOVAL, J.E.; SÁNCHEZ-ARRONES, L.; GARCIA-CAZORLA, A.; ARTUCH, R.; FERRÁN, J.L.; MARTÍNEZ-DE-LA-TORRE, M.; PUELLES, L. Development of the serotonergic cells in murine raphe nuclei and their relations with rhombomeric domains. **Brain Struct Funct**, v. 218, p. 1229-1277, 2013.
- AMAT, J.; SPARKS, P.D.; MATUS-AMAT, P.; GRIGGS, J.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. The role of the habenular complex in the elevation of dorsal raphe nucleus serotonin and the changes in the behavioral responses produced by uncontrollable stress. **Brain Res**, v. 917, p. 118-126, 2001.
- AMO, R.; AIZAWA, H.; TAKAHOKO, M.; KOBAYASHI, M.; TAKAHASHI, R.; AOKI, T.; OKAMOTO, H. Identification of the zebrafish ventral habenula as a homolog of the mammalian lateral habenula. **J Neurosci**, v. 30, p. 1566–1574, 2010.
- AMO, R.; FREDES, F.; KINOSHITA, M.; AOKI, R.; AIZAWA, H.; AGETSUMA, M.; AOKI, T.; SHIRAKI, T.; KAKINUMA, H.; MATSUDA, M.; YAMAZAKI, M.; TAKAHOKO, M.; TSUBOI, T.; HIGASHIJIMA, S.; MIYASAKA, N.; KOIDE, T.; YABUKI, Y.; YOSHIHARA, Y.; FUKAI, T.; OKAMOTO, H. The habenulo-raphé serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. **Neuron**, v. 84, p. 1034-1048, 2014.
- ANDRADE T.G.; ZANGROSSI, H.JR.; GRAEFF, F.G. The median raphe nucleus in anxiety revisited. **J Psychopharmacol**, v. 27, p. 1107-1115, 2013.
- ANDRES, K. H.; VON DURING, M.; VEH, R. W. Subnuclear organization of the rat habenular complexes. **J Comp Neurol**, v. 407, p. 130-150, 1999.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

ANTOLIN-FONTES, B.; ABLES, J.L.; GÖRLICH, A.; IBAÑEZ-TALLON, I. The habenulo-interpeduncular pathway in nicotine aversion and withdrawal. **Neuropharmacology**, v. 96, p. 213-223, 2015.

ARAKI, M.; MCGEER, P.L.; KIMURA, H. The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method. **Brain Res**, v. 441, p. 319-330, 1988.

AZNAR, S.; QIAN, Z.X.; KNUDSEN, G.M. Non-serotonergic dorsal and median raphe projection onto parvalbumin- and calbindin-containing neurons in hippocampus and septum. **Neuroscience**, v. 124, p.573-581, 2004.

BALCITA-PEDICINO, J.J.; OMELCHENKO, N.; BELL, R.; SESACK, S.R. The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. **J Comp Neurol**, v. 519, p. 1143-1164, 2011.

BAKER, P.M.; MIZUMORI, S.J.Y. Control of behavioral flexibility by the lateral habenula. **Pharmacol Biochem Behav**, v.162, p. 62-68, 2017.

BALDWIN, P.R.; ALANIS, R.; SALAS, R. The role of the habenula in nicotine addiction. **J Addict Res Ther**, v. 20 p. S1(2), 2011.

BAÑO-OTÁLORA, B.; PIGGINS, H.D. Contributions of the lateral habenula to circadian timekeeping. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 162, p. 46-54, 2017.

BEHZADI, G.; KALÉN, P.; PARVOPASSU, F.; WIKLUND, L. Afferents to the median raphe nucleus of the rat: retrograde cholera toxin and wheat germ conjugated horseradish peroxidase tracing, and selective D-[3H]aspartate labelling of possible excitatory amino acid inputs. **Neuroscience**, v. 37, p. 77-100, 1990.

BENARROCH, E. E. Habenula: Recently recognized functions and potential clinical relevance. **Neurology**, v. 85, p. 992-1000. 2015.

BIANCO, I.H.; WILSON, S.W. The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, p. 1005-1020, 2009.

BIERUT, L.J.; MADDEN, P.A.; BRESLAU, N.; JOHNSON, E.O.; HATSUKAMI, D.; POMERLEAU, O.F. et al. Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence. **Hum Mol Genet**, v. 16, p. 24-35, 2007.

BIERUT, L.J.; STITZEL, J.A.; WANG, J.C.; HINRICHS, A.L.; GRUCZA, R.A.; XUEI, X. et al. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. **Am J Psychiatry**, v. 165, p. 1163-1171, 2008.

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

BROMS, J.; ANTOLIN-FONTES, B.; TINGSTRÖM, A.; IBAÑEZ-TALLON, I. Conserved expression of the GPR151 receptor in habenular axonal projections of vertebrates. **J Comp Neurol**, v. 523, p. 359-380, 2014.

- BUZSÁKI, G. Theta oscillations in the hippocampus. **Neuron**, v. 33, p. 325-340, 2002.
- CALIZO, L.H.; AKANWA, A.; MA, X.; PAN, Y-Z.; LEMOS, J.C.; CRAIGE, C.; HEEMSTRA, L.A.; BECK, S.G. Raphe serotonin neurons are not homogenous: Electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. **Neuropharmacology**, v. 61, p. 524-543, 2011.
- CALDECOTT-HAZARD, S.; MAZZIOTTA, J.; PHELPS, M. Cerebral correlates of depressed behavior in rats, visualized using ¹⁴C-2-deoxyglucose autoradiography. **J Neurosci**, v. 8, p. 1951-1961, 1988.
- CALFA, G.; BUSSOLINO, D.; MOLINA, V. A. Involvement of the lateral septum and the ventral hippocampus in the emotional sequelae induced by social defeat: Role of glucocorticoid receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 181, p. 23–34, 2007.
- CAPUTI, A.; MELZER, S.; MICHAEL, M.; MONYER, H. The long and short of GABAergic neurons. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, p. 179-186, 2013.
- CLIFFER, K.D.; GIESLER, G.J.; JR. PHA-L can be transported anterogradely through fibers of passage. **Brain Res**, v. 458, p. 185-191, 1988.
- CRAWFORD, L. K.; RAHMAN, S. F.; BECK, S. G. Social stress alters inhibitory synaptic input to distinct subpopulations of raphe serotonin neurons. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, p. 200-209, 2013.
- COMMONS, K.G.; CONNOLLEY, K.R.; VALENTINO, R.J. A neurochemically distinct dorsal raphelimbic circuit with a potential role in affective disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 206-215, 2003.
- COMMONS, K. G. Two major network domains in the dorsal raphe nucleus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 523, p. 1488-1504, 2015.
- COMMONS, K. G. Ascending serotonin neuron diversity under two umbrellas. **Brain Structure and Function**, v. 221(7), p. 3347-3360, 2016.
- CONTESTABILE, A.; FLUMERFELT, B.A. Afferent connections of the interpeduncular nucleus and the topographic organization of the habenulo-interpeduncular pathway: an HRP study in the rat. **J Comp Neurol**, v. 196, p. 253-270, 1981.
- CONTESTABILE, A.; VILLANI, L.; FASOLO, A.; FRANZONI, M.F.; GRIBAUDO, L.; OKTEDALEN, O.; FONNUM, F. Topography of cholinergic and substance P pathways in the habenulo-interpeduncular system of the rat. An immunocytochemical and microchemical approach. **Neuroscience**, v. 21, p. 253–270, 1987.
- CORNWALL, J.; COOPER, J.D.; PHILLIPSON, O.T. Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. **Brain Res Bull**, v. 25, p. 271-284, 1990.
- DADO, R. J.; BURSTEIN, R.; CLIFFER, K. D.; GIESLER, G. J., JR. Evidence that Fluoro-Gold can be transported avidly through fibers of passage. **Brain. Res.**, v.533, p.329-333, 1990.
- DAMAJ, M. I.; KAO, W.; MARTIN, B. R. Characterization of spontaneous and precipitated nicotine withdrawal in the mouse. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, p. 526-534, 2003.

- DE BIASI, M.; DANI, J.A. Reward, addiction, withdrawal to nicotine. **Ann Rev Neurosci**, v. 34, p. 105-130, 2011.
- DE CARVALHO, T.N.; SUBEDI, A.; ROCK, J.; HARFE, B.D.; THISSE, C.; THISSE, B.; HALPERN, M.E., HONG E. Neurotransmitter map of the asymmetric dorsal habenular nuclei of zebrafish. **Genesis**, v. 52, p. 636-55, 2014.
- DEAKIN, J.F.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **J Psychopharmacol**, v. 5, p. 305-315, 1991.
- DEL-FAVA, F.; HASUE, R.H.; FERREIRA, J.G.; SHAMMAH-LAGNADO S,J. Efferent connections of the rostral linear nucleus of the ventral tegmental area in the rat. **Neuroscience**, v. 145, p. 1059-1076, 2007.
- DONATO, JR. J.; FRAZAO, R.; FUKUDA, M.; VIANNA, C.R.; ELIAS, C.F. Leptin induces phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase in defined hypothalamic neurons. **Endocrinology**, v. 151, p. 5415-5427, 2010.
- ELIAS, C.F.; LEE, C.E.; KELLY, J.F.; AHIMA, R.S.; KUHAR, M.; SAPER, C.B.; EMQUIST, J.K. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. **J Comp Neurol**, v. 432, p. 1-19, 2001.
- ELLISON, G. Stimulant-induced psychosis, the dopamine theory of schizophrenia, and the habenula. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 19, p. 223-239, 1994.
- FANSELOW, M.S.; DONG, H.W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, p. 7-19, 2010.
- FOWLER, C.D.; LU, Q., JOHNSON, P.M., MARKS, M.J., KENNY, P.J. Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. **Nature**, v. 471, p.597-601, 2011.
- FOWLER, C.D.; KENNY, P.J. Nicotine aversion: Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 533-544, 2014.
- FOWLER, C.D. The habenulo-interpeduncular pathway and nicotine withdrawal. In: F. SCOTT HALL, F., YOUNG, J.W., DER-AVAKIAN, A., Editors. *negative affective states and cognitive impairments in nicotine dependence*, Amsterdam: **Elsevier**, p. 191-204, 2017.
- FRAHM, S.; SLIMAK, M.A.; FERRARESE, L.; SANTOS-TORRES, J.; ANTOLIN-FONTES, B.; AUER, S.; FILKIN, S.; PONS, S.; FONTAINE, J-F.; TSETLIN, V.; MASKOS, U.; IBAÑEZ-TALLON, I. Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of $\beta 4$ and $\alpha 5$ nicotinic receptor subunits in the medial habenula. **Neuron**, v. 70, p. 522-535, 2011.
- FRAHM, S.; ANTOLIN-FONTES, B.; GÖRLICH, A.; ZANDER, J.F.; AHNERT-HILGER, G.; IBAÑEZ-TALLON, I. An essential role of acetylcholine-glutamate synergy at habenular synapses in nicotine dependence. **eLife**, v. 4, p. e11396, doi: 10.7554/eLife.11396, 2015.
- FREUND, T. F.; ANTAL, M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. **Nature**, v. 336, p. 170-173, 1988.
- FUNATO, H.; SATO, M.; SINTON, C.M.; GAUTRON, L.; WILLIAMS, S.C.; SKACH, A.; ELMQUIST, J.K.; SKOULTCHI, A.I.; YANAGISAWA, M. Loss of Goosecoid-like and

DiGeorge syndrome critical region 14 in interpeduncular nucleus results in altered regulation of rapid eye movement sleep. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, p. 18155-18160, 2010.

GARDON, O.; FAGET, L.; CHU SIN CHUNG, P.; MATIFAS, A.; MASSOTTE, D.; KIEFFER, B.L. Expression of mu opioid receptor in dorsal diencephalic conduction system: new insights for the medial habenula. **Neuroscience**, v. 277, p. 595-609, 2014.

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

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

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

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

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

GÖRLICH, A.; ANTOLIN-FONTES, B.; ABLES, J.L.; FRAHM, S.; SLIMAK, M.A.; DOUGHERTY, J.D.; IBÁÑEZ-TALLON, I. Reexposure to nicotine during withdrawal increases the pacemaking activity of cholinergic habenular neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, p. 17077-17082, 2013.

GOTO, M.; SWANSON, L.W.; CANTERAS, N.S. Connections of the nucleus incertus. **J Comp Neurol**, v. 438, p. 86-122, 2001.

GOUTAGNY, R.; LOUREIRO, M.; JACKSON, J.; CHAUMONT, J.; WILLIAMS, S.; ISOPE, P.; KELCHE, C.; CASSEL, J.C.; LECOURTIER, L. Interactions between the lateral habenula and the hippocampus: implication for spatial memory processes. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, p. 2418-2426, 2013.

GROENEWEGEN, H.J.; AHLENIUS, S.; HABER S.N.; KOWALL, N.W.; NAUTA, W.J. Cytoarchitecture, fiber connections, and some histochemical aspects of the interpeduncular nucleus in the rat. **J Comp Neurol**, v. 249, p. 65-102, 1986.

GROENEWEGEN, H.J.; STEINBUSCH, H.W. Serotonergic and non-serotonergic projections from the interpeduncular nucleus to the ventral hippocampus in the rat. **Neurosci Lett**, v. 51, p. 19-24, 1984.

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

HAMILL, G. S.; JACOBOWITZ, D. M. A study of afferent projections to the rat interpeduncular nucleus. **Brain Research Bulletin**, v. 13, p. 527-539, 1984.

HASSELMO, M.E. What is the function of hippocampal theta rhythm? Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data. **Hippocampus**, v. 15, p. 936-949, 2005.

HASSELMO, M.E.; STERN, C.E. Theta rhythm and the encoding and retrieval of space and time. **Neuroimage**, v. 85, p. 656-666, 2014.

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

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

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

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

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

HSU, Y.W.; TEMPEST, L.; QUINA, L.A.; WEI, A.D.; ZENG, H.; TURNER, E.E. Medial habenula output circuit mediated by alpha5 nicotinic receptor-expressing GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus. **J Neurosci**, v. 33, p. 18022-18035, 2013.

HSU, Y.W.; WANG, S.D.; WANG, S.; MORTON, G.; ZARIWALA, H.A.; DE LA IGLESIA, H.O.; TURNER, E.E. Role of the dorsal medial habenula in the regulation of voluntary activity, motor function, hedonic state, and primary reinforcement. **J Neurosci**, v. 34, p. 11366-11384, 2014.

HUERTA, P.T.; LISMAN, J.E. Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. **Nature**, v. 364, p. 723-725, 1993.

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

JACKSON, K.J.; MULDOON, P.P.; DE BIASI, M.; DAMAJ, M.I. New mechanisms and perspectives in nicotine withdrawal. **Neuropharmacology**, v. 96, p. 223-234, 2015.

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

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

JHOU, T.C.; GOOD, C.H.; ROWLEY, C.S.; XU, S.P.; WANG, H.; BURNHAM, N.W.; HOFFMAN, A.F.; LUPICA, C.R.; IKEMOTO, S. Cocaine drives aversive conditioning via delayed activation of dopamine-responsive habenular and midbrain pathways. **J Neurosci**, v. 33, p. 7501-7512, 2013.

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

KIM, U.; CHANG, S.Y. Dendritic morphology, local circuitry, and intrinsic electrophysiology of neurons in the rat medial and lateral habenular nuclei of the epithalamus. **J Comp Neurol**, v. 483, p. 236-250, 2005.

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

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

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

LAMMEL, S.; LIM, B.K.; RAN, C.; HUANG, K.W.; BETLEY, M.J.; TYE, K.M.; DEISSEROTH, K.; MALENKA, R.C. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. **Nature**, v. 491(7423), p. 212-217, 2012.

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

LECCA, S.; MEYE, F.J.; MAMELI, M. The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. **Eur J Neurosci**, v. 39, p. 1170-1178, 2014.

LECOURTIER, L.; NEIJT, H. C.; KELLY, P. H. Habenula lesions cause impaired cognitive performance in rats: implications for schizophrenia. **Eur J Neurosci**, v. 19 p. 2551-2560, 2004.

LECOURTIER, L.; DEFRANCESCO, A.; MOGHADDAM, B. Differential tonic influence of lateral habenula on prefrontal cortex and nucleus accumbens dopamine release. **Eur J Neurosci**, v. 27, p. 1755-1726, 2008.

LENN, N.J.; HAMILL, G.S. Subdivisions of the interpeduncular nucleus: a proposed nomenclature. **Brain Res Bull**, v. 13, p. 203-204, 1984.

LESLIE, F.M.; MOJICA, C.Y.; REYNAGA, D.D. Nicotinic receptors in addiction pathways. **Mol Pharmacol**, v. 83, p. 753–758, 2013.

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

LIMA, L.B.; BUENO, D.; LEITE, F.; SOUZA, S.; GONÇALVES, L.; FURIGO, I.C.; DONATO, J.JR.; METZGER, M. Afferent and efferent connections of the interpeduncular nucleus with special reference to circuits involving the habenula and raphe nuclei. **J Comp Neurol**, v. 525, p. 2411-2442, 2017.

LORENTE-CÁNOVAS, B.; MARÍN, F.; CORRAL-SAN-MIGUEL, R.; HIDALGO-SÁNCHEZ, M.; FERRAN, J.L.; PUELLES, L.; AROCA, P. Multiple origins, migratory paths and molecular profiles of cells populating the avian interpeduncular nucleus. **Dev Biol**, v. 361, p. 12-26, 2012.

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

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 Res**, v. 534, p. 209-224, 1990.

MA, S.; OLUCHA-BORDONAU, F.E.; HOSSAIN, M.A.; LIN, F.; KUEI, C.; LIU, C.; WADE, J.D.; SUTTON, S.W.; NUÑEZ, A.; GUNDLACH, A.L. Modulation of hippocampal theta oscillations and spatial memory by relaxin-3 neurons of the nucleus incertus. **Learn Mem**, v. 16, p. 730-742, 2009.

MA, S.; GUNDLACH, A. L. Ascending control of arousal and motivation: Role of nucleus incertus and its peptide neuromodulators in behavioural responses to stress. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 27, p. 457-467, 2015.

MARTÍNEZ-BELLVER, S.; CERVERA-FERRI, A.; MARTÍNEZ-RICÓS, J.; RUIZ-TORNER, A.; LUQUE-GARCIA, A.; BLASCO-SERRA, A.; GUERRERO-MARTÍNEZ, J.; BATALLER-MOMPEÁN, M.; TERUEL-MARTÍ, V. Regular theta-firing neurons in the nucleus incertus during sustained hippocampal activation. **Eur J Neurosci**, v. 41, p. 1049-1067, 2015.

MATHIS, V.; COSQUER, B.; AVALLONE, M.; CASSEL, J.C.; LECOURTIER, L. Excitatory transmission to the lateral habenula is critical for encoding and retrieval of spatial memory. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, p. 2843-2851, 2015.

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

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

MCLAUGHLIN I.; DANI J.A.; DE BIASI M. The medial habenula and interpeduncular nucleus circuitry is critical in addiction, anxiety, and mood regulation. **J Neurochem**, v. 142, p.130-143, 2017.

METZGER, M.; BUENO, D.; LIMA, L.B. The lateral habenula and the serotonergic system. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 162, p. 22-28, 2017.

MIRRIONE, M.M.; SCHULZ, D.; LAPIDUS, K.A.; ZHANG, S.; GOODMAN, W.; HENN, FA. Increased metabolic activity in the septum and habenula during stress is linked to subsequent expression of learned helplessness behavior. **Front Hum Neurosci**, v. 8, p. 29, 2014.

MONTONE, K.T.; FASS, B.; HAMILL, G.S. Serotonergic and nonserotonergic projections from the rat interpeduncular nucleus to the septum, hippocampal formation and raphe: a combined immunocytochemical and fluorescent retrograde labelling study of neurons in the apical subnucleus. **Brain Res Bull**, v. 20, p. 233-240, 1988.

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

MOSER, E.; MOSER, M.B.; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **J Neurosci**, v. 13, p. 3916-3925, 1993.

MUZERELLE, A.; SCOTTO-LOMASSESE, S.; BERNARD, J. F.; SOIZA-REILLY, M.; GASPAR, P. Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5-B9) to the forebrain and brainstem. **Brain Structure and Function**, v. 221, p. 535-561, 2016.

NERAD, L.; MCNAUGHTON, N. The septal EEG suggests a distributed organization of the pacemaker of hippocampal theta in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 155-166, 2006.

NUÑEZ, A.; CERVERA-FERRI, A.; OLUCHA-BORDONAU, F.; RUIZ-TORNER, A.; TERUEL, V. Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation. **Eur J Neurosci**, v. 23, p. 2731-2738, 2006.

NUNO-PEREZ, A.; TCHENIO, A.; MAMELI, M.; LECCA, S. Lateral Habenula Gone Awry in Depression: Bridging Cellular Adaptations With Therapeutics. **Front Neurosci**, v. 12, p. 485, 2018.

OGAWA, S. K.; COHEN, J. Y.; HWANG, D.; UCHIDA, N.; WATABE-UCHIDA, M. Organization of monosynaptic inputs to the serotonin and dopamine neuromodulatory systems. **Cell Reports**, v. 8, p. 1105-1118, 2014.

OH, S.W.; HARRIS, J.A.; NG, L.; WINSLOW, B.; CAIN, N.; MIHALAS, S.; WANG, Q.; LAU, C.; KUAN, L.; HENRY, A.M.; MORTRUD, M.T.; OUELLETTE, B.; NGUYEN, T.N.; SORENSEN, S.A.; SLAUGHTERBECK, C.R.; WAKEMAN, W.; LI, Y.; FENG, D.; HO, A.; NICHOLAS, E.; HIROKAWA, K.E.; BOHN, P.; JOINES, K.M.; PENG, H.; HAWRYLYCZ, M.J.; PHILLIPS, J.W.; HOHMANN, J.G.; WOHNOUTKA, P.; GERFEN, C.R.; KOCH, C.; BERNARD, A.; DANG, C.; JONES, A.R.; ZENG, H. A mesoscale connectome of the mouse brain. **Nature**, v. 508, p. 207-214, 2014.

OHARA, S.; SATO, S.; TSUTSUI, K.; WITTER, M.P.; IJIMA, T. Organization of multisynaptic inputs to the dorsal and ventral dentate gyrus: retrograde trans-synaptic tracing with rabies virus vector in the rat. **PLoS One**, v. 8 (11), p. e78928, 2013.

OKAMOTO, H.; AGETSUMA, M.; AIZAWA, H. Genetic dissection of the zebrafish habenula, a possible switching board for selection of behavioral strategy to cope with fear and anxiety. **Dev Neurobiol**, v. 72, p. 386-394, 2012.

O'LEARY, O.F.; CRYAN, J.F. A ventral view on antidepressant action: roles for adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis. **Trends Pharmacol Sci**, v. 35, p. 675-687, 2014.

OLUCHA-BORDONAU, F.E.; TERUEL, V.; BARCIA-GONZÁLEZ, J.; RUIZ-TORNER, A.; VALVERDE-NAVARRO, A.A.; MARTÍNEZ-SORIANO, F. Cytoarchitecture and efferent projections of the nucleus incertus of the rat. **J Comp Neurol**, v. 464, p. 62-97, 2003.

ORZEŁ-GRYGLEWSKA, J.; MATULEWICZ, P.; JURKOWLANIEC, E. Brainstem system of hippocampal theta induction: The role of the ventral tegmental area. **Synapse**, v. 69, p. 553-575, 2015.

PAN, W.X.; MCNAUGHTON, N. The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus. **Prog Neurobiol**, v. 74, p. 127-166, 2004.

PAUL, E.D.; LOWRY, C.A. Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. **J Psychopharmacol**, v. 27, p. 1090-1106, 2013.

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

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

PETSCHKE, H.; STUMPF, C.; GOGOLAK, G. The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 14, p. 202-211, 1962.

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

PROULX, C.D.; HIKOSAKA, O.; MALINOW, R. Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. **Nat Neurosci**, v. 17, p. 1146-1152, 2014.

QI, J.; ZHANG, S.; WANG, H.L.; WANG, H.; DE JESUS ACEVES BUENDIA, J.; HOFFMAN, A.F.; LUPICA, C.R.; SEAL, R.P.; MORALES, M. A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons. **Nature Communications**, v. 5, p. 5390. 2014.

QIN, C.; LUO, M. Neurochemical phenotypes of the afferent and efferent projections of the mouse medial habenula. **Neuroscience**, v. 161, p. 827-837, 2009.

QUINA, L.A.; WANG, S.; NG, L.; TURNER, E.E. Brn3a and Nurr1 mediate a gene regulatory pathway for habenula development. **J Neurosci**, v. 29, p. 14309-14322, 2009.

QUINA, L.A.; TEMPEST, L.; NG, L.; HARRIS, J.A.; FERGUSON, S.; JHOU, T.C.; TURNER, E.E. Efferent pathways of the mouse lateral habenula. **J Comp Neurol**, v. 523, p. 32-60, 2015.

QUINA, L.A.; HARRIS, J.A.; ZENG, H.; TURNER, E.E. Specific connections of the interpeduncular subnuclei reveal distinct components of the habenulopeduncular pathway. **J Comp Neurol**, v. 525, p. 2632-2656, 2017.

REN, J.; QIN, C.; HU, F.; TAN, J.; QIU, L.; ZHAO, S.; FENG, G.; LUO, M. Habenula “cholinergic” neurons corelease glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes. **Neuron**, v. 69, p. 445-452, 2011.

ROBERTSON, B.; KARDAMAKIS, A.; CAPANTINI, L.; PÉREZ-FERNÁNDEZ, J.; SURYANARAYANA, S.M.; WALLÉN, P.; STEPHENSON-JONES, M.; GRILLNER, S. The lamprey blueprint of the mammalian nervous system. **Prog Brain Res**, v. 212, p. 337-349, 2014.

ROYER, S.; SIROTA, A.; PATEL, J.; BUZSÁKI, G. Distinct representations and theta dynamics in dorsal and ventral hippocampus. **J Neurosci**, v. 30, p. 1777-1787, 2010.

RYAN, P.J.; MA, S.; OLUCHA-BORDONAU, F.E.; GUNDLACH, A.L. Nucleus incertus-an emerging modulatory role in arousal, stress and memory. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, p. 1326-1341, 2011.

SACCONE, S.F.; HINRICHS, A.L.; SACCONE, N.L.; CHASE, G.A.; KONVICKA, K.; MADDEN, P.A.; et al. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. **Hum Mol Genet**, v. 16, p. 36-49, 2007.

SAKHI, K.; BELLE, M.D.; GOSSAN, N.; DELAGRANGE, P.; PIGGINS, H.D. Daily variation in the electrophysiological activity of mouse medial habenula neurones. **J Physiol**, v. 592, p. 587-603, 2014a.

SAKHI, K.; WEGNER, S.; BELLE, M.D.; HOWARTH, M.; DELAGRANGE, P.; BROWN, T.M.; PIGGINS, H.D. Intrinsic and extrinsic cues regulate the daily profile of mouse lateral habenula neuronal activity. **J Physiol**, v. 592, p. 5025-5045, 2014b.

SALAS, R.; STURM, R.; BOULTER, J.; DE BIASI, M. Nicotinic receptors in the habenulointerpeduncular system are necessary for nicotine withdrawal in mice. **J Neurosci**, v. 29, p. 3014-3018, 2009.

SANCHEZ-PEREZ, A. M.; ARNAL-VICENTE, I.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, C. W.; ELMLILI, N.; SANJUAN, J.; MA, S.; GUNDLACH, A.L.; OLUCHA-BORDONAU, F. E. Septal projections to nucleus incertus in the rat: Bidirectional pathways for modulation of hippocampal function. **Journal of Comparative Neurology**, v. 523, p. 565-588, 2015.

SEGO, C.; GONÇALVES, L.; LIMA, L.; FURIGO, I.C.; DONATO JR. J.; METZGER, M. Lateral habenula and the rostromedial tegmental nucleus innervate neurochemically distinct subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat. **J Comp Neurol**, v. 522, p. 1454-1484, 2014.

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

SHAH, A.; ZUO, W.; KANG, S.; LI, J.; FU, R.; ZHANG, H.; BEKKER, A.; YE, J.H. The lateral habenula and alcohol: Role of glutamate and M-type potassium channels. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 162, p. 94-102, 2017.

SHEEHAN, T. P.; CHAMBERS, R. A.; RUSSELL, D. S. Regulation of affect by the lateral septum: Implications for neuropsychiatry. *Brain Research*. **Brain Research Reviews**, v. 46, p. 71-117, 2004.

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

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

SHIH, P.Y.; ENGLE, S.E.; OH, G.; DESHPANDE P.; PUSKAR, N.L.; LESTER, H.A.; et al. Differential expression and function of nicotinic acetylcholine receptors in subdivisions of medial habenula. **J Neurosci**, v. 34, p. 9789-9802, 2014.

SHIBATA, H.; SUZUKI, T.; MATSUSHITA, M. Afferent projections to the interpeduncular nucleus in the rat, as studied by retrograde and anterograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. **J Comp Neurol**, v. 248, p. 272-284, 1986.

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

SORIA-GÓMEZ, E.; BUSQUETS-GARCIA, A.; HU, F.; MEHIDI, A.; CANNICH, A.; ROUX, L.; LOUIT, I.; ALONSO, L.; WIESNER, T.; GEORGES, F.; VERRIER, D.; VINCENT, P.; FERREIRA, G.; LUO, M.; MARSICANO, G. Habenular CB1 receptors control the expression of aversive memories. **Neuron**, v. 88, p. 306-313, 2015.

SOS, K.; MAYER, M. I.; CSEREP, C.; TAKACS, F. S.; SZÖNYI, A.; FREUND, T. F.; NYIRI, G. Cellular architecture and transmitter phenotypes of neurons of the mouse median raphe region. **Brain Structure and Function**, v. 222, p. 287-299, 2017.

SOUSSI, R.; ZHANG, N.; TAHTAKRAN, S.; HOUSER, C.R.; ESCLAPEZ, M. Heterogeneity of the supramammillary-hippocampal pathways: evidence for a unique GABAergic neurotransmitter phenotype and regional differences. **Eur J Neurosci**, v. 32, p. 771-785, 2010.

SPELÁGH, B.; MAGLOCZKY, Z.; VIZI, E. S.; FREUND, T. F. The triangular septal nucleus as the major source of ATP release in the rat habenula: A combined neurochemical and morphological study. **Neuroscience**, v. 86, p. 1195-1207, 1998.

SPELING, R.; COMMONS, K.G. Shifting topographic activation and 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of dorsal raphe serotonin neurons produced by nicotine exposure and withdrawal. **Eur J Neurosci**, v. 33, p. 1866-1875, 2011.

SPIACCI, A. JR.; COIMBRA, N.C.; ZANGROSSI, H. JR. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. **Neuroscience**, v. 227, p. 350-360, 2012.

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

STEPHENSON-JONES, M.; FLOROS, O.; ROBERTSON, B.; GRILLNER, S. Evolutionary conservation of the habenular nuclei and their circuitry controlling the dopamine and 5-hydroxytryptophan (5-HT) systems. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, p. 164-173, 2012.

STEIDL, S.; WANG, H.; ORDONEZ, M.; ZHANG, S.; MORALES, M. Optogenetic excitation in the ventral tegmental area of glutamatergic or cholinergic inputs from the laterodorsal tegmental area drives reward. **Eur J Neurosci**, v. 45, p. 559-571, 2017.

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

SZÖNYI, A.; MAYER, M.I.; CSERÉP, C.; TAKÁCS, V.T.; WATANABE, M.; FREUND, T.F.; NYIRI, G. The ascending median raphe projections are mainly glutamatergic in the mouse forebrain. **Brain Struct Funct**, v. 221: 735-751, 2016.

TERUEL-MARTÍ, V.; CERVERA-FERRI, A.; NUNEZ, A.; VALVERDE-NAVARRO, A. A.; OLUCHA-BORDONAU, F. E.; RUIZ-TORNER, A. Anatomical evidence for a ponto-septal pathway via the nucleus incertus in the rat. **Brain Research**, v. 1218, p. 87-96, 2008.

TOTH, K.; BORHEGYI, Z.; FREUND, T. F. Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. **Journal of Neuroscience**, v. 13, p. 3712-3724, 1993.

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

VALJAKKA, A.; VARTIAINEN, J.; TUOMISTO, L.; TUOMISTO, J.T.; OLKKONEN, H.; AIRAKSINEN, M.M. The fasciculus retroflexus controls the integrity of REM sleep by supporting the generation of hippocampal theta rhythm and rapid eye movements in rats. **Brain Res Bull**, v. 47, p. 171-184, 1998.

- VERTES, R. P. Brainstem afferents to the basal forebrain in the rat. **Neuroscience**, v. 24, p. 907-935, 1988.
- VERTES, R. P. PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 326, p. 595-622, 1992.
- VERTES, R.P.; KOCSIS, B. Brainstem–diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. **Neuroscience**, v. 81, p. 893-926, 1997.
- VERTES, R.P.; FORTIN, W.J.; CRANE, A.M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. **J Comp Neurol**, v. 407, p. 555-582, 1999.
- VINOGRADOVA, O.S. Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. **Prog Neurobiol**, v. 45, p. 523-583, 1995.
- VISWANATH, H.; CARTER, A.Q.; BALDWIN, P.R.; MOLFESE, D.L.; SALAS, R. The medial habenula: still neglected. **Front Hum Neurosci**, v. 7, p. 931, 2014.
- WAGNER, F.; STROH, T.; VEH, R.W. Correlating habenular subnuclei in rat and mouse by using topographic, morphological, and cytochemical criteria. **J Comp Neurol**, v. 522, p. 2650-2662, 2014.
- WANG, H.L.; MORALES, M. Pedunclopontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 29, p. 340-358, 2009.
- WOLFMAN, S.L.; GILL, D.F.; BOGDANIC, F.; LONG, K.; AL-HASANI, R.; MCCALL, J.G.; BRUCHAS, M.R.; MCGEHEE, D.S. Nicotine aversion is mediated by GABAergic interpeduncular nucleus inputs to laterodorsal tegmentum. **Nat Commun**, v. 13, p. 2710, 2018.
- YAMAGUCHI, T.; DANJO, T.; PASTAN, I.; HIKIDA, T.; NAKANISHI, S. Distinct roles of segregated transmission of the septo-habenular pathway in anxiety and fear. **Neuron**, v. 78, p. 537-544, 2013.
- YANG, Y.; WANG, H.; HU, J.; HU, H. Lateral habenula in the pathophysiology of depression. **Curr Opin Neurobiol**, v. 48, p. 90-96, 2018.
- YETNIKOFF, L.; CHENG, A.Y.; LAVEZZI, H.N.; PARSLEY, K.P.; ZAHM, D.S. Sources of input to the rostromedial tegmental nucleus, ventral tegmental area, and lateral habenula compared: A study in rat. **J Comp Neurol**, v. 523, p. 2426-2456, 2015.
- ZAHM, D.S.; ROOT, D.H. Review of the cytology and connections of the lateral habenula, an avatar of adaptive behaving. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 162, p. 3-21, 2017.
- ZHANG, J.; TAN, L.; REN, Y.; LIANG, J.; LIN, R.; FENG, Q.; ZHOU, J.; HU, F.; REN, J.; WEI, C.; YU, T.; ZHUANG, Y.; BETTLER, B.; WANG, F.; LUO, M. Presynaptic excitation via GABAB receptors in habenula cholinergic neurons regulates fear memory expression. **Cell**, v. 166, p. 716-728, 2016.
- ZHAO-SHEA, R.; LIU, L.; PANG, X.; GARDNER, P.D.; TAPPER, A.R. Activation of GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus triggers physical nicotine withdrawal symptoms. **Curr Biol**, v. 23, p. 2327-2335, 2013.

ZHAO-SHEA, R.; DEGROOT, S.R.; LIU, L.; VALLASTER, M.; PANG, X.; SU, Q.; GAO, G.; RANDO, O.J.; MARTIN, G.E.; GEORGE, O.; GARDNER, P.D.; TAPPER, A.R. Increased CRF signalling in a ventral tegmental area-interpeduncular nucleus-medial habenula circuit induces anxiety during nicotine withdrawal. **Nat Commun**, v. 6, p. 6770, 2015.