

Leandro Bueno Lima

**Organização das projeções da área tegmental ventral para o estriado.
Um estudo no rato com a técnica de rastreamento anterógrado da
leucoaglutina do *Phaseolus vulgaris***

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2010

RESUMO

LIMA, L. B. **Organização das projeções da área tegmental ventral para o estriado. Um estudo no rato com a técnica de rastreamento anterógrado da leucoaglutina do *Phaseolus vulgaris*. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.**

A área tegmental ventral (VTA) contém neurônios dopaminérgicos do grupamento A10 e envia projeções muito densas para o estriado ventral. Esta circuitaria está crucialmente envolvida em mecanismos de recompensa. Recentemente, a organização destas projeções foi reexaminada por Ikemoto S. (Brain Res. Rev., 56:27-78, 2007), em um estudo de rastreamento retrógrado minucioso, sendo proposto a subdivisão destas projeções em um sistema dopaminérgico mesoestriatal ventromedial que inerva a concha medial do accumbens e o tubérculo olfatório medial, e um sistema dopaminérgico mesoestriatal ventrolateral que inerva o cerne e a concha lateral do accumbens e o tubérculo olfatório lateral. Afim de complementar o conhecimento destas projeções, no presente estudo elas foram examinadas com a técnica anterógrada da leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* (PHA-L). Nossos resultados indicam que há um extenso embricamento dos campos terminais estriatais inervados por diferentes setores/núcleos da VTA e reforçam a noção de que as eferências da VTA podem ser subdivididas em um sistema mesoestriatal ventromedial e um sistema mesoestriatal ventrolateral. Eles revelam ainda que as projeções da VTA para o estriado ventral têm uma organização topográfica médio-lateral mais complexa do que previamente reconhecido, a faixa médio-lateral do estriado ventral inervada depende de uma combinação da região médio-lateral e dorsoventral da VTA. Assim, as regiões mais ventrais e mediais da VTA (correspondendo ao núcleo interfascicular) inervam os distritos mais mediais do estriado ventral (a concha dorsomedial do accumbens e a extremidade medial do tubérculo olfatório), e as regiões mais dorsais e laterais da VTA (correspondendo à região dorsolateral do núcleo parabraquial pigmentoso) se projetam para os distritos mais laterais do estriado ventral (o cerne lateral e a concha lateral do accumbens, o caudado-putâmen ventral e o tubérculo olfatório lateral). Por outro lado, as projeções da VTA para o estriado ventral não possuem uma organização topográfica rostrocaudal. Outro fato a ser destacado é que a organização das projeções mesoestriatais da VTA lembra o padrão das projeções córtico-estriatais, sendo

observado no estriado, além de um campo terminal principal, pequenos focos isolados de marcação.

Palavras-chave: Área tegmental ventral. Estriado ventral. Tubérculo olfatório. Accumbens. Grupamento A10. Dopamina. PHA-L. Recompensa.

ABSTRACT

LIMA, L. B. **Organization of ventral tegmental area projections to the striatum. An anterograde tracing study in the rat with the *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin technique.** 92 p. Master thesis (Physiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The ventral tegmental area (VTA) contains dopaminergic neurons of the A10 group and sends dense projections to the ventral striatum. This circuitry is critically involved in reward mechanisms. Recently, the organization of these projections was reexamined by Ikemoto S. (Brain Res. Rev., 56:27-78, 2007) in a detailed retrograde tracing study, being proposed that these projections can be subdivided into two main systems, a ventromedial mesostriatal dopaminergic system that innervates the medial shell of the accumbens and medial olfactory tubercle, and a ventrolateral mesostriatal dopaminergic system that targets the core and lateral shell of the accumbens and lateral olfactory tubercle. In order to complement these data, in the present study the VTA mesostriatal projections were examined with a sensitive anterograde tracing technique using the *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L). Our results indicate that there is an extensive overlap of terminal fields innervated by different sectors / nuclei of the VTA and reinforce the notion that VTA efferents can be subdivided into a ventromedial and a ventrolateral mesostriatal system. They also show that the VTA projections to the ventral striatum have a mediolateral topographical organization more complex than previously acknowledged. In fact, projections along the mediolateral dimension of the ventral striatum depends on a combination of the mediolateral and dorsoventral axis of the VTA. In other words, the most ventral and medial parts of the VTA (corresponding to the interfascicular nucleus) innervates the most medial districts of the ventral striatum (corresponding to the dorsomedial shell of the accumbens and medial tip of the olfactory tubercle), and the most dorsal and lateral parts of the VTA (corresponding to the dorsolateral region of the parabrachial pigmented nucleus) project to the most lateral districts of the ventral striatum (lateral core and lateral shell of the accumbens, ventral caudate-putamen and lateral olfactory tubercle). Moreover, VTA projections to the ventral striatum do not seem to have a rostrocaudal topographical organization. It is also of note that the organization of the VTA mesostriatal projections shares features with

cortico-striatal projections, in the sense that both fiber systems have a main terminal field and also give rise to small, scattered isolated foci of terminal labeling.

Keywords: Ventral tegmental area. Ventral striatum. Olfactory tubercle. Accumbens. A10 group. Dopamine. PHA-L. Reward.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estriado

1.1.1 Definição

O estriado do rato é uma estrutura telencefálica que ocupa partes profundas do hemisfério cerebral. É o principal alvo dos grupamentos dopaminérgicos do mesencéfalo ventral (SWANSON, 1982; IKEMOTO, 2007). É dividido em estriado dorsal e estriado ventral por uma linha imaginária passando dorsalmente à comissura anterior (HEIMER *et al.*, 1995; VOORN *et al.*, 2004) (Fig. 1). Deve se ter em mente, entretanto, que a fronteira entre o estriado dorsal e o estriado ventral é estabelecida de forma um tanto quanto arbitrária, assim como é a fronteira entre a área tegmental ventral e substância negra compacta, que inervam respectivamente o estriado ventral e o estriado dorsal.

O estriado dorsal é constituído pelo caudado e putâmem que, em primatas e carnívoros, são separados entre si pela cápsula interna. Em roedores, devido ao desenvolvimento incipiente da cápsula interna, estas duas estruturas são comumente consideradas uma entidade, designada caudado-putâmen (HEIMER *et al.*, 1995) (Fig. 1).

O estriado ventral é composto pelo accumbens, pelos elementos estriatais do tubérculo olfatório localizados na lâmina II e pela parte ventro-medial do caudado-putâmen (HEIMER *et al.*, 1995) (Fig. 1). O accumbens está localizado rostroventralmente ao caudado-putâmen. Ele se diferencia deste último pela escassez de feixes de fibra mielínicas, porém ambos possuem uma composição celular semelhante. O accumbens foi originalmente subdividido em cerne e concha. Esta distinção foi estabelecida originalmente com base na reação histoquímica para acetilcolinesterase e na imunorreatividade para colecistocinina, sendo a concha mais intensamente reativa do que o cerne para estes compostos (ZABORSZKY *et al.*, 1985). Atualmente, vários outros atributos neuroquímicos (por exemplo, neurotensina, calbindina e substância P) permitem diferenciar a concha do cerne (DEUTCH *et al.*, 1993; HEIMER *et al.*, 1995). A concha e o cerne podem ser identificados apenas nos três quartos caudais do accumbens, ou seja, em níveis onde a comissura anterior se afasta medialmente da cápsula externa. A porção

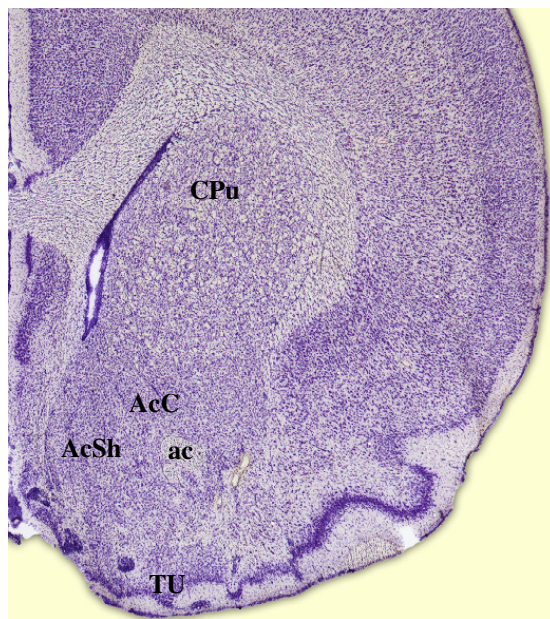


Figura 1. Fotomicrografia de um corte transverso do telencéfalo rostral corado com uma técnica de Nissl ilustrando o estriado. ac: comissura anterior; AcC: cerne do accumbens; AcbSh: concha do accumbens; CPu: caudado-putâmen; TU: tubérculo olfatório. Figura adaptada de Paxinos e Watson, 2004.

mais rostral do accumbens pode ser considerada um terceiro subterritório, denominado pólo rostral (ZAHM e HEIMER, 1993). Do ponto de vista hodológico, o pólo rostral compartilha características tanto com a concha como com o cerne do accumbens. Assim, as projeções da região medial do pólo rostral se assemelham às projeções da concha, enquanto que as projeções da região lateral do pólo rostral se assemelham às projeções do cerne (ZAHM e HEIMER, 1993). A região lateral do pólo rostral do accumbens, assim como o cerne, é muito marcada com calbindina, já a região medial do pólo rostral do accumbens, assim como a concha, é pouco marcada com calbindina (ZAHM e BROG, 1992). Foi ainda reconhecido um outro distrito do accumbens, denominado pólo septal, que corresponde ao setor caudomedial da concha. Este distrito recebe uma inervação dopaminérgica muito densa (VOORN *et al.*, 1986). Possui também conexões recíprocas com estruturas somáticas e viscerais do tronco encefálico mais profusas do que as demais partes da concha do accumbens (BROG *et al.*, 1993). Em função desta característica, o pólo septal é frequentemente considerado uma região de transição entre o estriado ventral e o contínuo formado pelos núcleos amigdalóides central e medial e o núcleo intersticial da estria terminal, designado amígdala expandida. Com base na intensidade da imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH), o pólo septal foi ainda sub-dividido em três regiões, o cone, o arco e o vértice, sendo o cone e o vértice intensamente imunoreativo para TH e o arco pobre em TH (VOORN *et al.*, 1986; TODTENKOPF e STELLAR, 2000). Citoarquitectonicamente, a região do arco possui alta densidade neuronal, correspondendo a um agregado celular estriatal. Ainda com base na imunorreatividade para TH, a concha do accumbens foi sub-dividida em uma região medial (que inclui o pólo septal, cuja heterogeneidade, como já foi mencionado, é amplamente reconhecida), uma região intermédia, também denominada concha ventromedial, e em uma região ventrolateral. A região intermédia da concha é menos intensamente imunoreativa para TH do que a região medial e ventrolateral da concha (VOORN *et al.*, 1986; ZAHM e BROG, 1992; GROENEWEGEN *et al.*, 1999). Estas diferentes sub-regiões da concha do accumbens, bem como a parte medial e lateral do cerne do accumbens recebem diferentes combinações de aferências corticais e sub-corticais, e se projetam para diferentes alvos palidais, hipotalâmicos e mesencefálicos (GROENEWEGEN *et al.*, 1999).

Em estudos comportamentais, a concha e o cerne do accumbens apresentam diferentes respostas relacionadas com drogas de abuso, onde a uma maior auto-administração na região da concha medial, e o animal apresenta também uma

maior locomoção, ao contrário, a região do cerne e da concha lateral do accumbens, parecem sofrer pouco ou nenhum efeito (McBRIDE *et al.*, 1999; DI CHIARA, 2002; IKEMOTO, 2002; RODD-HENRICKS *et al.*, 2002a,b; IKEMOTO e WITKIN, 2003; IKEMOTO *et al.*, 2005; IKEMOTO, 2007; MARCHANT *et al.*, 2009). O accumbens foi ainda subdividido em uma região anterior e uma região posterior. A região anterior se estende desde o pólo rostral até o aparecimento da ínsula magna de Calleja e está relacionada com comportamentos apetitivos. A região posterior coexiste com a insula magna de Calleja e se estende até o pólo caudal do accumbens e está relacionada com comportamentos defensivos (REYNOLDS e BERRIDGE, 2001, 2003; DONGEN *et al.*, 2005).

O tubérculo olfatório está localizado na região ventral do cérebro do rato que é constituído de três camadas, a camada I, também chamada camada molecular ou plexiforme, a camada II com células espinhosas de tamanho médio compactamente dispostas e a camada III ou camada multiforme que contém células de diferentes tipos, e que inclui os elementos palidais do tubérculo olfatório. São ainda identificados no tubérculo olfatório, pequenos aglomerados compactos de células granulares, geralmente localizados na camada III e comumente referidos como ínsulas de Calleja (MILLHOUSE e HEIMER, 1984). O tubérculo olfatório recebe projeções diretas do bulbo olfatório e de outras estruturas do sistema olfatório, entretanto, diferentemente do resto do sistema olfatório, ele não se projeta de forma significativa para estruturas do sistema olfatório, mas inerva densamente distritos do pálido ventral. Devido a estas características bem como a outros atributos morfológicos, e neuroquímicos, é geralmente considerado parte do estriado ventral (HEIMER *et al.*, 1995; MA, 1997).

1.1.2 Citoarquitetura e neuroquímica

A grande maioria dos neurônios estriatais (95%) é representada por neurônios GABAérgicos de projeção, denominados neurônios espinhosos de tamanho médio, que também expressão encefalina ou substância P (MILLHOUSE e HEIMER, 1984; HEIMER *et al.*, 1995; GERFEN, 2004). Os outros 5% são interneurônios que incluem: 1) neurônios colinérgicos; 2) neurônios contendo GABA e parvalbumina; 3) neurônios contendo GABA e calretinina; 4) neurônios contendo GABA, co-localizado com somatostatina, neuropeptídeo-Y e óxido nítrico sintase, para uma revisão ver Deng *et al.*

(2007) (ZAHM e BROG, 1992; KUBOTA e KAWAGUCHI, 1993; ZABORSZKY *et al.*, 1985; ZHOU *et al.*, 2001).

Embora o estriado aparenta ser uma estrutura homogênea em coloração de Nissl, ele é formado de compartimentos neuroquímicos distintos, denominados estriossomos e matriz. A matriz, região que envolve os estriossomos se caracteriza por neurônios ser rica em acetilcolinesterase, calbindina, somastostatina, e por ser predominantemente inervada por fibras dopaminérgicas mesencefálicas do tipo A (fibras finas com pequenas varicosidades), oriundas da porção dorsal do complexo nigral (i.e. VTA, núcleo retrorubral e substância negra compacta). Em contraste, o estriossomo se caracteriza por ser pobre em acetilcolinesterase, calbindina e substância P, e rico em opióides do tipo μ . O estriossoma recebe predominantemente fibras dopaminérgicas mesencefálicas do tipo B (mais grosso e mais varicosos do que as fibras do tipo A), proveniente da porção ventral do complexo nigral (i.e. substância negra compacta ventral e células dopaminérgicas presentes na substância negra reticulada) (GERFEN *et al.*, 1985; WHITE, 1989; GERFEN *et al.*, 1987).

1.1.3 Funções

O estriado está envolvido na regulação da motricidade somática e atividade locomotora (IKEMOTO, 2002; IKEMOTO e WITKIN, 2003), em várias formas de aprendizado e memória, como aprendizado de uma associação estímulo resposta ou aprendizado de hábitos e aprendizado emocional (PACKARD e KNOWLTON, 2002), assim como em mecanismos de recompensa (BAKER *et al.*, 1998; DI CHIARA, 2002) e de adição a drogas de abuso (DI CHIARA, 2002; IKEMOTO *et al.*, 2005). Estudos de auto-administração de drogas demonstram a existência de uma diferenciação entre a concha medial e o cerne, e também entre a região medial e lateral do tubérculo olfatório (DI CHIARA, 2002; RODD-HENRICKS *et al.*, 2002a,b; IKEMOTO *et al.*, 2005). Assim, os setores mediais do estriado ventral (i.e., a concha medial do accumbens e a região medial do tubérculo olfatório) são locais mais efetivos para a auto-administração de droga do que os setores laterais do estriado ventral (i.e., a concha lateral e o cerne do accumbens e a região lateral do tubérculo olfatório).

1.2 A área tegmental ventral

1.2.1 Definição

A área tegmental ventral (VTA) tem despertado grande interesse por ser um elo crucial na circuitaria envolvida em mecanismos de recompensa (IKEMOTO *et al.*, 2006; ZANGEN *et al.*, 2006), atividade locomotora (IKEMOTO *et al.*, 2003; ZANGEN *et al.*, 2006) e ação de drogas de abuso (IKEMOTO e WISE, 2004; IKEMOTO *et al.*, 2006). Tem como um dos principais alvos o estriado ventral (BECKSTEAD *et al.*, 1979; FALLON e MOORE, 1978; SWANSON, 1982; IKEMOTO, 2007) que participa destes mesmos processos (IKEMOTO *et al.*, 2002; IKEMOTO e WISE, 2004).

A VTA está localizada na região ventro-medial do mesencéfalo entre o núcleo interpeduncular, a substância negra e o núcleo rubro (OADES e HALLIDAY, 1987) (Fig. 2). Não existe um consenso na literatura a respeito de sua delimitação precisa e de suas possíveis subdivisões. A VTA é considerada por alguns (SWANSON, 1982) uma entidade anatômica, mas frequentemente é vista como um território heterogêneo, composto de diferentes núcleos. Apesar de Swanson (1982) reconhecer que os núcleos da linha média, rostral linear, caudal linear e interfascicular contém neurônios do grupamento A10 e possuem projeções semelhantes à VTA, ele não os considera parte da VTA, mas sim núcleos adjacentes à VTA. De acordo com Virginia Pickel (1990), a VTA ocupa o setor ventromedial do mesencéfalo correspondendo aos núcleos paranigral e parabraquial pigmentoso (ver e.g., BAYER e PICKEL, 1990), delimitação também adotada por Paxinos e Watson (1986). Deve ser notado que, de acordo com os autores acima referidos, a VTA não inclui núcleos situados ao longo da linha média. Em contraposição a esta noção, de acordo com Philipson (1979a,b), a VTA é constituída de 4 núcleos, os núcleos paranigral e parabraquial pigmentoso, localizados na

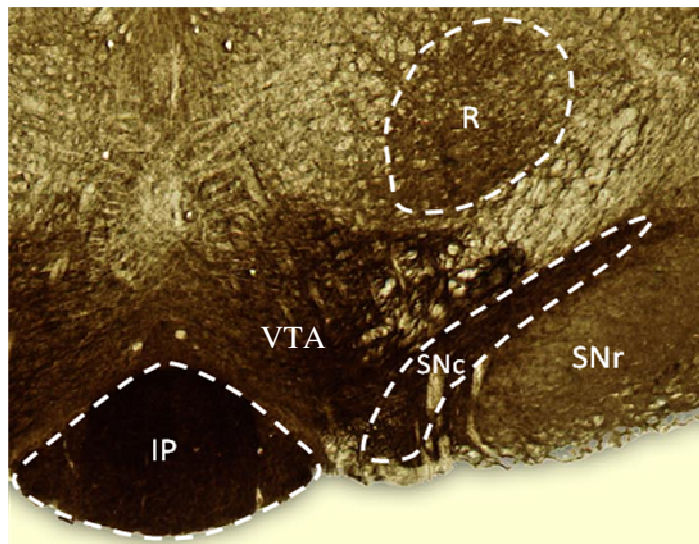


Figura 2. Localização da VTA. Corte coronal do mesencéfalo ventral imunorreativa para acetilcolinesterase. Para mostrar as relações topográficas com estruturas adjacentes IP: núcleo interpeduncular; R: núcleo rubro; SNc: substância negra compacta; SNr: substância negra reticulada. Figura adaptada de Paxinos e Watson, 2004.

reigão lateral da VTA e os núcleos caudal linear da rafe e interfascicular, situados na linha média, formando a região medial da VTA. Oades e Halliday (1987) incluem ainda na VTA, além dos quatro núcleos acima mencionados, o núcleo rostral linear da rafe.

Dahlstrom e Fuxe (1964), com a técnica de histofluorescência, identificaram pela primeira vez no tronco encefálico e diencéfalo do rato, diferentes grupamentos catecolaminérgicos, denominados A1-A12 e grupamentos serotoninérgicos, denominados B1-B9. No mesencéfalo ventral, foram reconhecidos 3 grupamentos dopaminérgicos A8, A9 e A10, não existindo um limite preciso entre eles. O grupamento A8 está contido a grosso modo no núcleo retrorrubral, o grupamento A9 na substância negra compacta, e o grupamento A10 na VTA (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964; FALLON e MOORE, 1978). De acordo com Dahlström e Fuxe (1964), a VTA se diferencia da substância negra compacta e do núcleo retrorrubral por suas profusas conexões com o sistema límbico. Phillipson (1979a) observou no rato a presença de neurônios dopaminérgicos nos núcleos interfascicular e caudal linear. Swanson (1982) mapeou a distribuição de neurônios imunopositivos para TH no mesencéfalo ventral do rato. Tendo em vista que os neurônios do mesencéfalo ventral não expressam dopamina beta hidroxilase, a enzima que converte dopamina em noradrenalina, neste território, a presença de tirosina hidroxilase sinaliza neurônios dopaminérgicos. Assim, Swanson (1982) identificou a presença de neurônios dopaminérgicos nos núcleos rostral linear, interfascicular e caudal linear. Deve ser ressaltado que o distrito mesencefálico que contém o grupamento A10 não pode ser usado como critério para definir com rigor a VTA, pois este grupamento invade rostroventralmente a região supramamilar e dorsocaudalmente, o núcleo dorsal da rafe e a substância cinzenta periaquedutal (HÖKFELT *et al.*, 1984).

A VTA pode ser dividida em uma porção rostral e uma porção caudal baseado em estudos funcionais usando auto-administração de droga de abuso. Essas drogas parecem exercer efeitos reforçadores intensos na VTA caudal e pouco ou nenhum efeito na VTA rostral, para uma revisão ver Ikemoto (2007). O aparecimento do núcleo interpeduncular é utilizado como critério topográfico para demarcar a VTA rostral da VTA caudal.

Trabalhos recentes sugerem que a VTA tem uma extensão caudal maior do que classicamente admitido. Este território é denominado pólo caudal da VTA (“VTA tail”) (PERROTTI *et al.*, 2005), está localizado dorsolateralmente ao núcleo interpeduncular, ao nível transversal da região posterior do núcleo paranigral, e caudal a este nível,

estende-se dorsalmente até a decussação do pedúnculo cerebelar superior (KAUFLING *et al.*, 2009a). Este território é virtualmente desprovido de neurônios dopaminérgicos, sendo principalmente constituído de neurônios parvicelulares GABAérgicos (PERROTTI *et al.*, 2005; OLSON e NESTLER, 2007; KAUFLING *et al.*, 2009a). Kaufling *et al.* (2009a), em um estudo de rastreamento retrógrado, verificaram que o pólo caudal da VTA possui aferências muito semelhantes ao resto da VTA, fato que reforça a noção deste território ser parte da VTA. Além disto, há de se notar que o pólo caudal da VTA se projeta densamente para o complexo VTA-negra (FERREIRA *et al.*, 2008). Perrotti *et al.* (2005) relataram o aumento da expressão de um fator de transcrição Δ FosB em neurônios do pólo caudal da VTA, após tratamento crônico com psicoestimulantes (cocaína e anfetamina) (WINSTANLEY *et al.*, 2007; PERROTTI *et al.*, 2008), de forma que o pólo caudal da VTA parece estar envolvido em circuitos cerebrais de recompensa (McBRIDE *et al.*, 1999).

Ikemoto (2007), ao analisar as projeções mesoestriatais, usando o Fluoro Gold como traçador retrógrado, subdividiu a VTA em VTA rostral e VTA caudal, as quais foram subdivididas em um setor medial e lateral, usando como critério topográfico a borda lateral do fascículo retroflexo. Ele também identificou em seu estudo o pólo caudal da VTA, que curiosamente não parece se projetar substancialmente para o estriado ventral (IKEMOTO, 2007). No nosso estudo, usaremos como base as subdivisões da VTA delineadas por Ikemoto (2007). Procuraremos, no entanto, fazer um paralelo entre a terminologia de Ikemoto (2007), e a terminologia de Oades e Halliday (1987), que considera a VTA constituída por 5 núcleos (os núcleos rostral linear, caudal linear, interfascicular, parabraquial pigmentoso e paranigral).

1.2.2 Citoarquitetura da VTA

Embora os neurônios do grupamento dopaminérgico A10 aparentam ser um grupo homogêneo, estudos citoarquitetônicos revelam diferenças quanto à forma e tamanho de seus neurônios, assim como diferenças quanto a seu grau de compactação (PHILLIPSON, 1979a,b; OADES e HALLIDAY, 1987). Com base nestes estudos a VTA foi subdivida em 5 núcleos distintos. O núcleo interfascicular contém os menores neurônios da VTA, de forma estrelada ou fusiforme e cujos dendritos varicosos se irradiam em várias direções. O núcleo caudal linear exhibe neurônios de tamanho pequeno a médio, de forma estrelada ou fusiforme e cujos dendritos são notavelmente

varicosos. O núcleo paranigral tem neurônios de tamanho pequeno a médio, de forma estrelada ou fusiforme e que, em plano transverso, são orientados horizontalmente. O núcleo parabraquial pigmentoso contém neurônios de tamanho médio com alguns de tamanho pequeno e sem orientação preferencial (PHILLIPSON 1979a,b). A região rostral da VTA, que inclui os núcleos rostral linear e parabraquial pigmentoso possui neurônios maiores do que os encontrados nos núcleos interfascicular e caudal linear, esses neurônios também exibem campos dendríticos maiores (OADES e HALLIDAY, 1987).

Os neurônios do grupamento A10 são de tamanho pequeno a médio, sendo a maioria deles pequenos (DAHLSTROM e FUXE, 1964).

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

1.2.3 Neuroquímica da VTA

O grande interesse que a VTA desperta se deve em grande parte à população de neurônios dopaminérgicos do grupamento A10. Além de neurônios dopaminérgicos, a VTA contém um número apreciável de neurônios GABAérgicos, havendo pouca co-localização de neurônios dopaminérgicos com GABA (OLSON *et al.*, 2005; OLSON e NESTLER, 2007; NAIR-ROBERTS *et al.*, 2008). Foi observado que neurônios dopaminérgicos da VTA podem também expressar neurotensina (principalmente no núcleo rostral linear) (JAYARAMAN *et al.*, 1990), colecistocinica (principalmente no núcleo caudal linear) (JAYARAMAN *et al.*, 1990), proteínas ligantes de cálcio (McRITCHIE *et al.*, 1996), óxido nítrico (principalmente no núcleo rostral linear) (KLEJBOR *et al.*, 2004). Recentemente foi descrito uma pequena população de neurônios glutamatérgicos na VTA, que representa 3% dos neurônios, sendo raramente observado co-localização de glutamato em neurônios dopaminérgicos (KAWANO *et al.*, 2006; YAMAGUCHI *et al.*, 2007; NAIR-ROBERTS *et al.*, 2008).

A população de neurônios GABAérgicos representa cerca de 35% dos neurônios VTA (OLSON e NESTLER, 2007; NAIR-ROBERTS *et al.*, 2008). A proporção

relativa de neurônios GABAérgicos e dopaminérgicos varia na VTA tanto ao longo de sua extensão rostro-caudal como entre seus diferentes núcleos (NAIR-ROBERTS *et al.*, 2008). A maior densidade de células dopaminérgicas está localizada na VTA caudal e diminui progressivamente em direção rostral (SWANSON, 1982). Por outro lado, a proporção de células GABAérgicas na VTA caudal é pequena, ocorrendo um aumento progressivo destas células na VTA rostral. Deve ser ressaltado que no pólo caudal da VTA foi observado um agregado de células GABAérgicas e raras células dopaminérgicas (OLSON *et al.*, 2005; PERROTTI *et al.*, 2005; OLSON e NESTLER, 2007; KAUFILING *et al.*, 2009a).

Os núcleos localizados na linha média da VTA têm baixa concentração do transportador de dopamina (DAT), responsável pela recaptação do neurotransmissor pelo terminal pré-sináptico. O gradiente de DAT no mesencéfalo ventral diminui da região caudo-ventrolateral para a região rostro-dorsomedial (GONZALEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2004). Isto talvez explique porque os neurônios dopaminérgicos localizados na linha média da VTA possuem maior resistência a ação tóxica da 6-hidroxi-dopamina do que os neurônios dopaminérgicos da VTA localizados mais lateralmente (OKAMURA *et al.*, 1995).

1.3 Conexões da VTA

A VTA recebe aferências de um grande número de estruturas, que inervam difusamente toda a VTA, com exceção das aferências do accumbens que possuem uma organização topográfica médio-lateral em rato (PHILLIPSON, 1979c; GEISLER e ZAHM, 2005). Caracteristicamente, várias aferências da VTA provêm do cerne isodendrítico (GEISLER e ZAHM, 2005). Diversas técnicas neuroanatômicas foram utilizadas ao longo dos anos para estudar as conexões eferentes da VTA, como a utilização de histofluorescência associada a lesões (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964), radioautografia (FALLON e MOORE, 1978; BECKSTEAD *et al.*, 1979; SIMON *et al.*, 1979) e traçadores retrógrados (SWANSON, 1982; BJÖRKLUND e LINDVALL, 1984). Estes estudos clássicos sugerem que a VTA origina dois sistemas principais de projeção: o sistema mesocortical e o sistema mesolímbico. O sistema mesocortical inclui projeções para áreas pré-frontais, cíngular anterior, agranular insular, piriforme e entorrinal; o sistema mesolímbico engloba projeções para o núcleo septal, a amígdala, o accumbens e o tubérculo olfatório (BJÖRKLUND e LINDVALL, 1984; OADES e

HALLIDAY, 1987; FALLON e LOUGHLIN, 1995). Há evidências sugerindo que os setores rostro-dorsais da VTA estão mais estreitamente relacionados com o sistema mesocortical e os setores ventro-caudais da VTA com as áreas do subcorticais mesolímbicas (SCHEIBNER e TÖRK, 1987).

Foi mostrado que a VTA inerva ainda o pálido ventral (KLITENICK *et al.*, 1992), o núcleo da banda diagonal e o núcleo intersticial da estria terminal, núcleos talâmicos (a divisão lateral da habênula lateral, o núcleo reuniens, o núcleo central medial e o núcleo médio-dorsal), o núcleo hipotalâmico posterior, e possivelmente também a área pré-óptica lateral e o hipotálamo lateral (BECKSTEAD *et al.*, 1979). A VTA possui projeções descendentes bem mais modestas do que as projeções ascendentes e que tem por alvo a substância cinzenta periaquedutal, a área parabraquial e o lócus cerúleos (BECKSTEAD *et al.*, 1979).

1.3.1 Projeções mesoestriatais da VTA

A VTA tem como um dos seus principais alvos o estriado ventral. Essas projeções são topograficamente organizadas. Assim, os territórios mais laterais da VTA se projetam preferencialmente para estruturas estriatais laterais e os territórios mediais da VTA para estruturas estriatais mais mediais, incluindo o accumbens (BECKSTEAD *et al.*, 1979; SWANSON, 1982; BROG *et al.*, 1993; HASUE e SHAMMAH-LAGNADO, 2002). Projeções da VTA para o accumbens obedecem a um padrão dorso-ventral invertido, de forma que os setores mais dorsais da VTA se projetam para as porções mais ventrais do accumbens, e os setores mais ventrais da VTA estão conectados aos setores mais dorsais do accumbens (FALLON e MOORE, 1978; BROG *et al.*, 1993; HASUE e SHAMMAH-LAGNADO, 2002). Esta organização segue os princípios de organização topográfica das projeções dopaminérgicas mesotelencefálicas (FALLON e MOORE, 1978; BJÖRKLUND e LINDVALL, 1984). O sistema mesoestriatal como um todo exibe ainda uma topografia rostrocaudal, a VTA inervando distritos estriatais mais rostrais e a substância negra, distritos estriatais mais caudais. Não está claro, entretanto, se as projeções da VTA para o estriado ventral possuem uma organização rostrocaudal. Curiosamente, de acordo com o estudo de rastreamento retrógrado de Lynd-balta e Haber (1994), em primatas, as projeções da VTA para o estriado ventral não parecem ser topograficamente organizadas.

Os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo formam 2 sistemas que inervam compartimentos estriatais distintos. O sistema dopaminérgico dorsal, que inclui a VTA, o núcleo retrorrubral e substância negra compacta dorsal, inerva a matriz do estriado, enquanto que o sistema dopaminérgico ventral, que inclui a substância negra compacta ventral e neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra reticulada, se distribui predominantemente para os estriossomos do estriado (GERFEN, 2004). Além disso, a matriz e os estriossomos possuem aferências corticais que se originam de regiões diferentes da camada V, e também inervam territórios mesencefálicos diferentes. Assim, a matriz do estriado se projeta para a substância negra reticulata, o que lhe permite atuar sobre os alvos dos gânglios da base. Por outro lado, os estriossomos se projetam para a substância negra compacta, e, portanto influenciam vias dopaminérgicas que modulam processos estriatais.

De acordo com o estudo radioautográfico clássico de Beckstead et al. (1979), a VTA rostral projeta-se amplamente para o estriado, a maior densidade de marcação sendo observada no núcleo accumbens, no tubérculo olfatório e no fundo do estriado. A partir destes setores ventrais, a marcação diminui de densidade em direção dorsal, evitando somente a região dorsolateral do estriado. Assim, as fibras da VTA parecem inervar quase toda metade ventromedial do estriado, incluindo rostralmente o accumbens. A marcação no accumbens continua-se ventralmente sobre o tubérculo olfatório, em todas as camadas desta estrutura, mas evitando as insulas de Calleja. Beckstead et al. (1979) fizeram uma descrição minuciosa das projeções da VTA como um todo, porém, com a técnica radioautográfica, as injeções são relativamente grandes e pouco definidas se comparada às injeções com traçadores anterógrados contemporâneos, e em particular, com a leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris*. Desta forma, a técnica radioautográfica não se presta tanto para uma análise de uma possível organização topográfica das projeções da VTA para o estriado ventral.

Experimentos de rastreamento retrógrado permitem definir com clareza a origem de uma projeção, e, no caso do sistema mesoestriatal ventral, o distrito particular da VTA que está conectado com o distrito estriatal injetado. De acordo com experimentos de rastreamento retrógrado, os núcleos interfascicular, rostral linear, caudal linear, paranigral e a parte medial do parabraquial pigmentoso se projetam para a região medial da concha do accumbens. Já a região lateral da VTA, se projeta para a concha lateral do accumbens (BROG *et al.*, 1993; HASUE e SHAMMAH-LAGNADO, 2002). Hasue e Shammah-Lagnado (2002), usando o Fluoro-Gold como traçador, observaram que

injeções na concha medial do accumbens produzem marcação retrógrada nos núcleos parabraquial pigmentoso (parte ventral), paranigral, interfascicular e caudal linear. Por outro lado, injeções na região ventral da concha do accumbens marcam mais a região dorso-lateral da VTA, incluindo a parte lateral do núcleo parabraquial pigmentoso e a parte dorsal do núcleo paranigral, havendo uma marcação apreciável no núcleo caudal linear e uma marcação modesta no núcleo interfascicular. Injeções na concha lateral do accumbens originam uma marcação retrógrada confinada à região dorso-lateral do núcleo parabraquial pigmentoso, não sendo detectada marcação no núcleo paranigral.

Em um estudo de rastreamento anterógrado, usando PHA-L como traçador, Del-Fava et al. (2007) relataram que as projeções do núcleo rostral linear terminam principalmente nos elementos palidais do tubérculo olfatório, e, em bem menor grau, nos elementos estriatais do tubérculo olfatório lateral, bem como no pólo rostral e na concha lateral do accumbens. Assim, o núcleo rostral linear, diferentemente do resto da VTA, projeta-se robustamente para regiões palidais do tubérculo olfatório (DEL-FAVA et al., 2007).

Em uma revisão, Groenewegen et al. (1999), descrevem que a VTA se projeta predominantemente para a parte ventral e medial da concha do accumbens, mas ela inerva também, ainda que menos densamente, a região medial do cerne do accumbens e regiões caudado-putâmen adjacentes ao accumbens.

Em estudo usando como traçador anterógrado a leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris*, Gerfen et al. (1987) demonstraram que a VTA origina um denso plexo de fibras no accumbens e no caudado-putâmen ventro-medial, que inerva a matriz, evitando os estriossomos. As fibras que compõe esta projeção são em sua grande maioria fibras do tipo A, ou seja fibras finas com pequenas varicosidades. Foram também observadas ocasionalmente fibras do tipo C, ou seja fibras de grosso calibre com grandes varicosidades na matriz.

Voorn et al. (1986) demonstram que a inervação dopaminérgica no estriado ventral é altamente compartimentalizada, de modo que regiões com baixa densidade celular apresentam alta imunorreatividade para dopamina e regiões de agregados celulares são fracamente imunorreativas para dopamina. O pólo septal e a região ventro-medial do accumbens, que são regiões de baixa densidade celular são altamente imunorreativos para dopamina. Há, contudo uma exceção a esta regra, a região apical do pólo septal possui com alta densidade celular é rica em dopamina (VOORN et al., 1986).

Um plexo dopaminérgico denso também foi observado no tubérculo olfatório em toda extensão rostro-caudal e abrange todas as três camadas, a camada plexiforme (camada I) sendo a camada mais intensamente imunorreativa para dopamina. Nas ínsulas de Calleja, foi observada uma marcação dopaminérgica moderada no compartimento de células granulares. Na insula magna de Calleja também foram notadas pequenas regiões altamente imunorreativas para dopamina tanto em sua região dorsal como ventral. As pontes celulares estriatais que se estendem do accumbens para o tubérculo olfatório também apresentam rica imunorreatividade para dopamina (VOORN *et al.*, 1986).

A organização do sistema dopaminérgico mesolímbico foi recentemente revista por Ikemoto em um estudo minucioso de rastreamento retrógrado, usando como traçador o Fluro-Gold (IKEMOTO, 2007). Com base nos resultados obtidos, Ikemoto propôs a existência de dois sistemas de projeção da VTA para o estriado ventral: o sistema dopaminérgico mesoestriatal ventromedial que se origina da VTA pósteromedial que inclui os núcleos, interfascicular, paranigral e caudal linear e inerva seletivamente o estriado ventro-medial (i.e., o tubérculo olfatório medial e a concha medial do accumbens); e o sistema dopaminérgico mesoestriatal ventro-lateral que provém da VTA ântero-lateral que corresponde à porção lateral do núcleo parabraquial pigmentoso e inerva amplamente o estriado ventro-lateral (i.e., o tubérculo olfatório lateral, o cerne e a concha lateral do accumbens). Há evidências de que cada um destes sistemas desempenha funções distintas em comportamentos motivados, o sistema de projeção medial sendo mais importante para a ação reforçadora de drogas.

Drogas de abuso parecem exercer efeitos reforçadores intensos na VTA posterior (parte do sistema dopaminérgico mesoestriatal ventromedial) e pouco ou nenhum efeito na VTA anterior (parte do sistema dopaminérgico mesoestriatal ventrolateral) (RODD-HENRICKS *et al.*, 2000, 2002a,b; ZANGEN *et al.*, 2002; IKEMOTO e WISE, 2004; ZANGEN *et al.*, 2006). Drogas de abuso parecem exercer efeitos reforçadores também no estriado ventromedial (parte do sistema dopaminérgico mesoestriatal ventromedial). Ao contrario, as regiões do estriado ventrolateral (parte do sistema dopaminérgico mesoestriatal ventrolateral) se assemelham à VTA anterior, por também sofrerem pouco ou nenhum efeito de drogas de abuso (RODD-HENRICKS *et al.*, 2002a,b; IKEMOTO *et al.*, 2005). Assim, o padrão de projeção da VTA para o estriado ventral se coaduna com estudos funcionais, de forma que áreas com padrões semelhantes de auto-administração de droga são conectadas entre si (IKEMOTO, 2007).

Nos estudos de rastreamento anterógrado que descreveram as projeções da VTA para o estriado, foram feitas injeções grandes da VTA (BECKSTEAD *et al.*, 1979; GERFEN *et al.*, 1987). Assim, algumas questões sobre a organização das projeções da VTA para o estriado ventral permanecem em aberto, em particular, se existe 1) uma topografia rostrocaudal das projeções da VTA para o estriado ventral; 2) um embricamento das projeções de subnúcleos ou distritos adjacentes da VTA no estriado ventral; 3) verificar se de fato, como relatado por Ikemoto (2007), o pólo caudal da VTA não inerva o estriado ventral. A ausência destas projeções é bastante curiosa visto que as aferências da VTA caudal se assemelham às aferências do resto da VTA. Tendo-se em mente a grande extensão do estriado ventral é até concebível que o pólo caudal da VTA inerve um distrito estriatal que não foi explorado no estudo de Ikemoto (2007).

Complementando o estudo de Ikemoto (2007), este trabalho tem como finalidade estudar as projeções da VTA para o estriado através de pequenas injeções de PHA-L (traçador anterógrado) em regiões/subnúcleos da VTA, podendo assim, mapear de forma minuciosa a distribuição das fibras marcadas em toda a extensão do estriado.

6. CONCLUSÕES

Os presentes resultados confirmam e estendem os estudos anteriores sobre a organização das projeções da VTA para o estriado ventral.

1) Nossas observações anterógradas reforçam a noção de que as eferências da VTA podem ser subdivididas em um sistema mesoestriatal ventromedial, que tem por alvo o tubérculo olfatório medial e a concha medial do accumbens, e um sistema mesoestriatal ventrolateral, que termina primariamente no cerne e na concha lateral do accumbens e no tubérculo olfatório lateral, como sugerido por Ikemoto (2007).

2) As projeções da VTA para o estriado ventral têm uma organização topográfica médio-lateral mais complexa do que previamente reconhecido, determinada tanto pela posição médio-lateral como pela posição dorsoventral da VTA. Assim as regiões ventrais e mediais da VTA inervam os distritos mais mediais do estriado ventral e as regiões dorsais e laterais da VTA os distritos mais laterais do estriado ventral.

3) Injeções pequenas na VTA originam projeções densas para territórios relativamente extensos do estriado ventral e também focos bastante restritos de projeções para territórios estriatais distantes do campo terminal principal.

REFERÊNCIAS¹

- BAKER, D. A.; SPECIO, S. E.; TRAN-NGUYEN, L. T. L.; NEISEWANDER, J. L. Amphetamine infused into the ventrolateral striatum produces oral stereotypies and conditioned place preference. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 61, p. 107–111, 1998.
- BAYER, V. E.; PICKEL V. M. Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in the rat ventral tegmental area: relationship between immunolabeling density and neuronal associations. **J. Neurosci.**, v. 10, p. 2996–3013, 1990.
- BECKSTEAD, R. M.; DOMESICK, V. B.; NAUTA, W. J. H. Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. **Brain Res.**, v. 175, p. 191–217, 1979.
- BJÖRKLUND, A.; LINDVALL, O. Chapter III: Dopamine-containing systems in the CNS. In: BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T. (Ed.). **Handbook of Chemical Neuroanatomy**. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1984. p. 55-122.
- BRISCHOUX, F.; CHAKRABORTY, S.; BRIERLEY, D. I.; UNGLESS, M. A. Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 24, p. 4894-9, 2009.
- BROG, J. S.; SALYAPONGSE, A.; DEUTCH, A. Y.; ZAHM, D. S. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the “accumbens” part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported Fluoro-Gold. **J. Comp. Neurol.**, v. 338, p. 225-278, 1993.
- DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoaminecontaining neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiol. Scand.**, v. 62, p. 1–55, 1964. Supplement 232.

¹ De acordo com:

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

DENG, Y. P.; XIE, J. P.; WANG, H. B.; LEI, W. L.; CHEN, Q. E; REINER, A. Differential localization of the GluR1 and GluR2 subunits of the AMPA-type glutamate receptor among striatal neuron types in rats. **J. Chem. Neuro.**, v. 33, p. 167–192, 2007.

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. **Neurosc.**, v. 145, n. 3, p. 1059-76, 2007.

DEUTCH, A. The nucleus accumbens core and shell: accumbal compartments and their functional attributes. In: P.W. Kalivas and C.D. Barnes, Editors, *Limbic Motor Circuits and Neuropsychiatry*, CRC Press, Boca Raton (1993), pp. 45–88.

DEUTCH, A.Y.; BOURDELAIS, A. J.; ZAHM, D.S. The nucleus accumbens core and shell: Accumbal compartments and their functional attributes. In: Kalivas, P. W.; Barnes C. D. (Ed.). **Limbic Motor Circuits and Neuropsychiatry**. Boca Raton: CRC Press. 1993. p. 45-88.

DICHIARA, G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. **Behav. Brain Res.**, v. 137, p. 75–114, 2002.

DONGEN, Y. C.; DENIAU, J. M.; PENNARTZ, C. M. A.; GALIS-DE, G. Y.; VOORN, P.; THIERRY, A. M.; GROENEWEGEN, H. J. Anatomical evidence for direct connections between the shell and core subregions of the rat nucleus accumbens. **Neurosc.**, v. 136, p. 1049-1071, 2005.

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

FALLON, J. H.; LOUGHLIN, S. E. Substantia nigra. In: Paxinos G, (Ed.). **The Rat Nervous System**, 2. Ed. San Diego: Academic Press. p. 215-237, 1995.

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

GEISLER, S.; ZAHM, D. S. Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. **J. Comp. Neurol.**, v. 490, p. 270-94, 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 transport plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. (PHA-L). **Brain Res.**, v. 290, p. 219-238, 1984.

GERFEN, C. R.; BAIMBRIDGE, K. G.; MILLER, J. J. The neostriatal mosaic: Compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 82, p. 8780-8784, 1985.

GERFEN, C. R.; HERKENHAM, M.; THIBAUT, J. The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. **J. Neurosc.** v. 2, p. 3915-3934, 1987.

GERFEN, C.R. Basal ganglia. In: PAXINOS, G. (Ed.). **The Rat Nervous System**. 3 ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2004. p. 455–508.

GONZALEZ-HERNANDEZ, T.; BARROSO-CHINEA, P.; DE LA CRUZ MUROS I.; DEL MAR PEREZ-DELGADO M.; RODRIGUEZ, M. Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 479, p. 198-215, 2004.

GROENEWEGEN, H. J.; RUSSCHEN F. T. Organization of the efferent projections of the nucleus of the efferent projections of the nucleus accumbens to pallidal, hypothalamic, and mesencephalic structures: Atracing and immunohistochemical study in the cat. **J. Comp. Neurol.**, v. 223, p. 347-367, 1984.

GROENEWEGEN, H. J.; WRIGHT, C. I.; BEIJER, A. V.; VOORN, P. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. **Ann N. Y. Acad. Sci.**, v. 29, p. 877:49-63, 1999. Review

HABER, S. N.; FUDGE, J. L.; MCFARLAND, N. R. Striatonigostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 6, p. 2369-82, 2000.

HABER, S. N.; KIM, K. S.; MAILLY, P.; CALZAVARA, R. Reward-related cortical inputs define a large striatal region in primates that interface with associative cortical connections, providing a substrate for incentive-based learning. **J. Neurosci.**, v. 9, n. 32, p. 8368-76, 2006.

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

HEIMER, L.; WILSON, R. D. The subcortical projections of the allocortex: similarities in the neural associations of the hippocampus, the piriform cortex and the neocortex. In: SANTINNI, M. (Ed.). **Golgi Centennial Symposium**. New York: Raven Press, 1975. p. 199-193.

HEIMER, L.; ZAHAM, D. S.; ALHEID, G. F. Basal ganglia. In: Paxino G. (Ed.). **The Rat Nervous System**. 2 ed. Sydney: Academic Press, 1995. p. 579-627.

HÖKFELT, T.; MÅRTENSSON, R.; BJÖRKLUND, A.; KLEINAU, S.; GOLDSTEIN, M. Distributional maps of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat brain. In: Björklund A.; Hökfelt T. (Ed.). **Classical transmitters in the CNS**. Amsterdam: Elsevier, 1984. p. 277-379.

IKEMOTO, S. Ventral striatal anatomy of locomotor activity induced by cocaine, D-amphetamine, dopamine and D1/D2 agonists. **Neurosci.**, v. 113, p. 939-955, 2002.

IKEMOTO, S.; WITKIN, B. M. Locomotor inhibition induced by procaine injections into the nucleus accumbens core, but not the medial ventral striatum: implication for cocaine-induced locomotion. **Synapse**, v. 47, p. 117-122, 2003.

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

IKEMOTO, S.; QUIN, M.; LIU, Z. The functional divide for primary reinforcement of D-amphetamine lies between the medial and lateral ventral striatum: Is the division of the accumbens core, shell, and olfactory tubercle valid? **J. Neurosc.**, v. 18, n. 20, p. 5061-5, 2005.

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

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

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

JAYARAMAN, A.; NISHIMORI, T.; DOBNER, P.; UHL, G. R. Colecystokinin and neurotensin mRNAs are diferentially expressed in subnuclei of the ventral tegmental área. **J. Comp. Neurol.**, v. 296, n. 2, p. 291-302, 1990.

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

KAUFLING, J.; VEINANTE, P., PAWLOWSKI, S. A.; FREUND-MERCIER, M.; MICHEL, B. M. γ -Aminobutyric acid cells with cocaine-induced Δ fosb in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. **Biol. Psychiatry**, v. 119, n. 12, p. 3597-3612, 2009b.

KAWANO, M.; KAWASAKI, A.; SAKATA-HAGA, H.; FUKUI, Y.; KAWANO, H.; NOGAMI, H.; HISANO, S. Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. **J. Comp. Neurol.** v. 498, p. 581–592, 2006.

KLEJBOR, I.; DOMARADZKA-PYTEL, B.; LUDKIEWICZ, B.; WÓJCIK, S.; MORYS, J. The relationships between neurons containing dopamine and nitric oxide synthase in the ventral tegmental area. **Folia Histochem. Cytobiol.**, v. 42, n. 2, p. 83-87, 2004.

KLITENICK, M. A.; DEUTCH, A. Y.; CHURCHILL, L.; KALIVAS, P. W. Topography and functional role of dopaminergic projections from the ventral mesencephalic tegmentum to the ventral pallidum. **Neurosc.**, v. 50, p. 371-386, 1992.

KUBOTA, Y.; KAWAGUCHI, Y. Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to patch and matrix compartments of rat neostriatum. **J. Comp. Neuro.**, v. 332, p. 499-513, 1993.

LYND-BALTA, E.; HABER S. N. The organization of midbrain projections to the ventral striatum in the primate. **Neurosc.**, v.59, n. 3, p. 609-23, 1994.

MA, T. P. The Basal Ganglia. (Ed.). Haines, D. E. In: **Fundamental of Neuroscience**. New York: Churchill Livengstone, 1997. p. 363-378.

MARCHANT, N. J.; HAMLIN, A. S.; MCNALLY, G. P. Lateral hypothalamus is required for context-induced reinstatement of extinguished reward seeking. 1: **J Neurosci.**, v. 29, n. 5, p. 1331-42, 2009.

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

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

MILLHOUSE, O. E.; HEIMMER, L. Cell configurations in the olfactory tubercle of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 228, p. 571-597, 1984.

NAIR-ROBERTS, R. G.; CHATELAIN-BADIE, S. D.; BENSON, E.; WHITE-COOPER, H.; BOLAM, J. P.; UNGLESS, M. A. Stereological estimates of

dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. **Neurosci.**, v. 152, p. 1024–1031, 2008.

NAUTA, W. J.; SMITH, G. P.; FAULL, R. L. Domesick VB. Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. **Neurosci.**, v. 3, p. 385-401, 1978.

NEWMAN, R.; WINANS, S. S. An experimental study of the ventral striatum of the golden hamster. I. Neuronal connections of the nucleus accumbens. **J. Comp. Neurol.**, v. 15, n. 2, p. 167-92, 1980.

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

OKAMURA, H.; YOKOYAMA, C.; IBATA, Y. Lateromedial gradient of the susceptibility of midbrain dopaminergic neurons to neonatal 6-hydroxydopamine toxicity. **Exp. Neurol.**, v. 136, p. 136-142, 1995.

OLSON, V. G.; ZABETIAN, C. P.; BOLANOS, C. A.; EDWARDS, S.; BARROT, M.; EISCH, A. J.; HUGHES, T.; SELF, D. W.; NEVE, R. L.; NESTLER, E. J. Regulation of Drug Reward by cAMP Response Element- Binding Protein: Evidence for Two Functionally Distinct Subregions of the Ventral Tegmental Area. **J. Neurosci.**, v. 25, p. 5553–5562, 2005.

OLSON, V. G.; NESTLER, E. J. Topographical Organization of GABAergic Neurons Within the Ventral Tegmental Area of the Rat. **Synapse**, v. 61, p. 87–95, 2007.

PACKARD, M. G.; KNOWLTON, B. J. Learning and memory functions of the basal ganglia. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 25, p. 563-593, 2002.

PAXINOS G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Orlando: Academic. Elsevier, 1986.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2004.

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

PERROTTI, L. I.; WEAVER, R. R.; ROBISON, B.; RENTHAL, W.; MAZE, I.; YAZDANI, S.; ELMORE, R. G.; KNAPP, D. J.; SELLEY, D. E.; MARTIN, B. R.; SIM-SELLEY, L.; BACHTTELL, R. K.; SELF, D. W.; NESTLER, E. J. Distinct Patterns of Δ FosB Induction in Brain by Drugs of Abuse. **Synapse**, v. 62, p. 358–369, 2008.

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

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

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

PHILLIPSON, O. T.; GRIFFITHS, A. C. The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat. **Neurosc.**, v. 16, n. 2, p. 275-96, 1985.

RAMÓN-MOLINER, E.; NAUTA, W. J. The isodendritic core of the brain stem. **J. Comp. Neurol.**, v. 126, n. 3, p. 311-35, 1966.

REYNODS, S. M.; BERRIDGE, K. C. Fear and feeding in the nucleus accumbens shell? Rostrocaudal segregation of GABA-elicited defensive behavior versus eating behavior. **J. Neurosc.**, v. 21, p. 3261-3270, 2001.

REYNODS, S. M.; BERRIDGE, K. C. Glutamate motivational ensembles in nucleus accumbens: Rostrocaudal shell gradients of fear and feeding. **E. Jour. Neurosc.**, v. 17, p. 2187-2200, 2003.

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

RODD-HENRICKS, Z. A.; MCKINZIE, D. L.; LI, T. K.; MURPHY, J. M.; MCBRIDE, W. J. Cocaine is self-administered into the shell but not the core of the nucleus accumbens of Wistar rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 303, p. 1216–1226, 2002a.

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

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

SIMON, H.; LE, M. M.; CALAS, A. Efferents and afferents of the ventral tegmental-A10 region studied after local injection of [³H]leucine and horseradish peroxidase. **Brain Res.**, v. 178, p. 17–40, 1979.

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

TODTENKOPF, M. S.; STELLAR, J. R. Assessment of tyrosine hydroxylase immunoreactive innervation in five subregions of the nucleus accumbens shell in rats treated with repeated cocaine. **Synapse**, v. 38, n. 3, p. 261–70, 2000.

VOORN, P.; JORRITSMA-BYHAM, B.; VAN DIJK, C.; BUIJS, R. M. The dopaminergic innervation of the ventral striatum in the rat: a Light- and electron-microscopical study with antibodies against dopamine. **J. Comp. Neurol.**, v. 251, p. 84–99, 1986.

VOORN, P.; VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; GROENEWERGEN, H. J.; ROBBINS, T. W.; PENNARTZ, C. M. A. Purring a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. **Trends Neurosc.**, v. 27, p. 468-474, 2004.

WHITE, N. M. A functional hypothesis concerning the striatal matrix and patches: mediation of S-R memory and reward. **Life Sci.**, v. 45, p. 1943–57, 1989.

WINSTANLEY, C. A.; LAPLANT, Q.; THEOBALD, D. E. H.; GREEN, T. A.; BACHTELL, R. K.; PERROTTI, L. I.; DILEONE, R. J.; RUSSO, S. J.; GARTH, W. J.; SELF, D. W.; NESTLER, E. J. DeltaFosB induction in orbitofrontal cortex mediates tolerance to cocaine-induced cognitive dysfunction. **J. Neurosc.**, v. 27, n. 39, p. 10497–10507, 2007.

YAMAGUCHI, T.; SHEEN, W.; MORALES, M. Glutamatergic neurons are present in the ventral tegmental área. **Eur. J. Neurosci.**, v. 25, n. 1, p. 106-18, 2007.

ZABORSZKY, L.; ALHEID, G. F.; BEINFELD, M. C.; EIDEN, L. E.; HEIMER, L.; PALKOVITS, M. Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. **Neurosc.**, v. 14, p. 427– 453, 1985.

ZAHM, D. S.; BROG, J. S. On the significance of subterritories in the ‘accumbens’ part of the rat ventral striatum. **Neurosc.**, v. 50, p. 751–67, 1992.

ZAHM, D. S.; HEIMER, L. J. Specificity in the efferent projections of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell. **Comp. Neurol.**, v. 327, n. 2, p. 220-32, 1993.

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

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

ZHOU, F. M.; LIANG, Y.; DANI, J. A. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. **Nat. Neurosci.**, v. 4, p. 1224-9, 2001.