

MICHELE RAMOS LOURENÇO

**DISTRIBUIÇÃO DOS INTERNEURÔNIOS GABAÉRGICOS  
MIGRATÓRIOS NO CÓRTEX CEREBRAL**

Dissertação Submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro  
visando a obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas

Rio de Janeiro  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Lourenço, Michele Ramos.

Distribuição dos interneurônios GABAérgicos migratórios no córtex cerebral / Michele Ramos Lourenço. Rio de Janeiro: UFRJ, ICB, 2008.

xv, 82p.

Orientadora: Daniela Uziel.

Orientador: Roberto Lent.

Dissertação de mestrado – Instituto Ciências Biomédicas/ UFRJ.

Referências bibliográficas: p. 75-82.

1. Migração tangencial. 2. Interneurônios GABAérgicos. 3. Desenvolvimento Cortical.  
4. Distribuição látero-medial.

Dissertação de mestrado (Ciências Morfológicas / ICB)

Michele Ramos Lourenço

MICHELE RAMOS LOURENÇO

DISTRIBUIÇÃO DOS INTERNEURÔNIOS GABAÉRGICOS MIGRATÓRIOS NO  
CÓRTEX CEREBRAL

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre.

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008.

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Daniela Uziel Rozental (Orientadora)  
ICB-UFRJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Roberto Lent (Orientador)  
ICB-UFRJ

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Tatiana Coelho Sampaio  
ICB-UFRJ

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Rosalia Mendez-Otero  
IBCFF-UFRJ

\_\_\_\_\_  
Prof. João Guedes da Franca  
IBCFF-UFRJ

O presente trabalho foi realizado sob orientação dos professores Roberto Lent e Daniela Uziel e desenvolvido no Laboratório de Neuroplasticidade do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), na vigência dos auxílios e bolsas concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Aos meus irmãos Igor e Rafael,  
Aos meus pais Evandro e Regina,  
pelo amor, respeito e cuidado eternos.

## **AGRADECIMENTOS**

Minha amada mãe, a quem devo grande parte do que sou, fui e serei.

Meu amado pai, que à sua maneira, nunca deixou de demonstrar seu amor.

Meus irmãos, que são meus irmãos, pais e sempre companheiros.

Minhas cunhadas Pilar e Ana, que me incentivaram a querer ser uma pessoa cada vez melhor.

Meus sobrinhos Ian, Mel e Gabriel, que me mostram o real significado do amor incondicional.

Arno e Marisa, que fazem felizes duas das pessoas que mais amo na vida.

Minha família, que entendeu e respeitou minha ausência cada vez mais marcante. Em especial meus primos Fellipe, Ticiane, Fábio e Tatiane, pelo amor e amizade que superaram a distância.

Querida Walkyria, que me ensinou a ser uma pessoa mais forte, mesmo que nem sempre eu tenha sido forte o suficiente.

Paula, que como boa amiga e antropóloga, me entende para tentar explicar.

Jaqueline, Marcos e Juliana, que algumas vezes chegaram a acreditar em mim mais do que eu mesma.

Aos amigos que resistem ao tempo e à distância: Ingrid, Alessandra, Jorge, Rafael Namorato.

Aline, sempre mais presente do que de fato parece, por compartilharmos sentimentos diversos, tendo a certeza de que somos entendidas.

Patrícia, Luciana, Suzana e Rossana, como já havia dito em determinada ocasião, sem as quais tudo seria muito mais difícil.

Gustavo, por ouvir as maiores atrocidades sem se mostrar incomodado.

Querido Eduardo, que mesmo depois de algum tempo ainda tem a capacidade de me surpreender.

Luna que, por sorte, se aproximou de mim nos últimos tempos e tornou meus dias mais alegres.

Fernando e Alessandra, por contribuírem tão de perto para minha felicidade.

Dudu, Anna, Tércia, Paula e Sandra, pelos momentos alegres e tristes compartilhados.

Ao pessoal do laboratório, que aturou minhas variações de humor por muitas vezes diárias: Marco, estagiário quase sempre exemplar, que conseguiu lidar com meu dia-a-dia enlouquecedor; Marissol, por compartilhar as piadas mais banais e rir de todas para não me deixar sem graça; Geraldine, pelas aulas práticas de inglês e companhia enriquecedora; Carol e Jean Pierre, pela paciência com minhas incríveis dúvidas sobre imunohistoquímica e afins; ao pessoal “das antigas”, Fabi, Mauren e Danilo, com nossas eternas e filosóficas discussões sobre o que fazer da vida e o maravilhoso mundo das neurociências; Noboro, Lena e Ludmila, que acabaram por desistir de resistir ao meu humor (ou às minhas tentativas); Adiel, pela dedicação com os animais; Severina, que sempre perdoou com um sorriso minhas marcas de tênis no chão recém-limpo; Danielle, Laura, Natália, Letícia e outra Letícia, Sabrina e Rafael pelos almoços descontraídos e angústias divididas.

Às queridas Antônia, Alê e Beth, pela paciência e cuidado nos meus primeiros passos!

Aos outros professores que compartilharam mais do que o espaço do laboratório: Jean Christophe Houzel, companhia nos horários mais inóspitos; Renato Rozental, pelo carinho e confiança.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos, por me acolherem por tantas vezes com carinho.

Jane, por me contagiar inúmeras vezes com sua alegria inigualável.

Tânia, sempre disposta a resolver meus problemas e a responder minhas dúvidas repetitivas de maneira agradável e eficiente.

Prof. Vivaldo, por me acolher desde a busca por um laboratório para fazer iniciação científica.

Meu orientador Roberto Lent, a quem tanto admiro como profissional e como pessoa e que com sua tranquilidade me ensinou a tentar ver a vida de maneira mais simples.

Minha querida orientadora Daniela Uziel, um grande exemplo de profissional a seguir, por respeitar minhas milhares de decisões e meus sonhos, e contribuir para que eles fossem realizados.

## RESUMO

O córtex cerebral é formado por dois principais tipos neuronais: os de projeção, glutamatérgicos, e os interneurônios, GABAérgicos. Os primeiros são originados nas zonas proliferativas do telencéfalo dorsal e migram radialmente até seus sítios finais no córtex em desenvolvimento, enquanto os últimos têm origem nas eminências ganglionares, localizadas no telencéfalo ventral, devendo então assumir rotas de migração paralelas à superfície pial. Pouco se sabe a respeito da relação topográfica entre os locais de origem destas células no telencéfalo ventral e suas posições finais em relação ao eixo látero-medial da placa cortical. Para elucidar esta questão, realizamos transplantes homotópicos e heterotópicos de regiões conhecidas de telencéfalos de camundongos transgênicos (expressando a proteína eGFP) para selvagens (suíços) *in vitro*. Nossos resultados mostram que independente do local de onde são retirados e colocados os explantes, as células migram e espalham-se por todo o córtex. Observamos também que os interneurônios GABAérgicos originados na idade E14 ocupam as regiões mais laterais do córtex, sendo ultrapassados pelos gerados mais tardiamente (E17), que ocupam regiões mais mediais. Isto fortalece a idéia de que pistas moleculares reguladas espacial e temporalmente, ou interações celulares com aquelas previamente estabelecidas, direcionam os neurônios para seu posicionamento correto nas camadas corticais.

## ABSTRACT

The cerebral cortex is formed by two major neuronal types: projecting glutamatergic neurons and GABAergic interneurons. The former are originated at the dorsal telencephalon proliferative zones and migrate radially until their final sites in the developing cortex, whereas the latter are born in the ganglionic eminences (basal telencephalon), and must take migration trajectories tangential to the pial surface. Little is known about the relationship between the specific site of origin of the GABAergic interneurons in the medial ganglionic eminence and their final position in the mediolateral axis of the cortical wall. To elucidate this question we performed homotopic and heterotopic transplantations from specific regions of transgenic mice telencephalon (expressing the eGFP gene) to wild type (Swiss) mice *in vitro*. Our results show that independent of their site of origin, migrating GABAergic cells spread out all over the cortex. We also show that GABAergic interneurons born around E14 occupy more lateral regions of the cortex and are overtaken by those lately born that occupy more medial positions. This strengthens the idea that local time-regulated cues expressed in the cortex or cell-cell interactions with already established cells guide interneurons to their specific site.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Ilustrações</b>	xiii
<b>Lista de Tabelas</b>	xiv
<b>Lista de Abreviaturas</b>	xv
<b>1. Introdução</b>	16
1.1 - Formação do Neocórtex	16
1.2 - Populações neuronais neocorticais	19
1.3 - Interneurônios GABAérgicos	22
1.4 - Migração tangencial	23
1.5 - Moléculas direcionadoras	25
1.6 - Rotas de migração tangencial	28
1.7 – Topografia da migração tangencial	30
<b>2. Objetivo</b>	32
<b>3. Materiais e Métodos</b>	33
3.1 – Animais utilizados	33
3.2 – Procedimentos cirúrgicos e preparação de fatias e explantes	34
3.3 – Transplantes homotópicos permanentes	36
3.4 – Transplantes homotópicos transitórios	37
3.5 – Transplantes duplos	38
3.6 – Transplantes heterotópicos permanentes	39
3.7 – Análises	39
3.8 – Análise quantitativa	40
<b>4. Resultados</b>	41
4.1 – Origem e migração dos precursores GABAérgicos – comparação com a literatura e validação do método	41

4.2 – Morfologia dos precursores GABAérgicos	43
4.3 - Migração dos precursores GABAérgicos em regiões não permissivas	45
4.4 – Distribuição dos interneurônios GABAérgicos no eixo látero-medial do córtex cerebral	46
4.4.1 – Interneurônios GABAérgicos originados na EGM migram ao longo de todo o eixo látero-medial do córtex cerebral	46
4.4.2 – O momento de origem do precursor GABAérgico influencia a posição por ele adotada na placa cortical	50
4.5 – Interneurônios migram por rotas alternativas inclusive em regiões “não-alvos”	53
<b>5. Discussão</b>	56
5.1 - Rotas migratórias <i>in situ</i> e <i>in vitro</i>	56
5.2 - Fatores determinantes para o posicionamento ântero-posterior, látero-medial e radial no córtex cerebral	59
5.3 - Determinação das propriedades neuroquímicas dos interneurônios corticais	64
5.4 - Especificação da circuitaria cortical	67
<b>6. Conclusões</b>	73
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	75

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

1 Formação do tubo neural	16
2 Hemisfério cerebral de camundongo em desenvolvimento	17
3 Formação das camadas corticais	19
4 Morfologia de células migratórias	21
5 Eminências ganglionares e rotas de migração tangencial	24
6 Esquema das etapas que compõem a migração tangencial	25
7 Esquema das regiões evitadas durante a migração tangencial	27
8 Variação das rotas migratórias de acordo com a idade	29
9 Domínios de expressão gênica na zona ventricular das eminências	31
10 Diferença entre embriões selvagens e GFP <sup>+</sup>	35
11 Tipos de fatias utilizadas	36
12 Transplantes homotópicos	36
13 Transplantes duplos	39
14 Células migrantes na zona marginal e deixando o explante	42
15 Tempo de dispersão das células no córtex	43
16 Células com morfologia migratória típica	44
17 Células migrantes na placa cortical	44
18 Regiões evitadas pelas células migrantes	46
19 Distribuição das células E14 após 4DiV	48
20 Padrão de distribuição celular (retirada do explante após 2DiV)	49
21 Experimentos de duplo transplante	51
22 Gráficos da distribuição percentual das células E15 ao longo dos dias	52
23 Gráficos da distribuição percentual das células E17 ao longo dos dias	53
24 Experimentos de transplantes heterotópicos	55

**LISTA DE TABELAS**

1 Número de experimentos realizados	17
2 Influência do tamanho do explante no número de células migrantes	33

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AEP - área entopeduncular

BO - bulbo olfatório

DiV - dias *in vitro*

EGC - eminência ganglionar caudal

eGFP - *enhanced green fluorescent protein*

EGM - eminência ganglionar medial

EGL - eminência ganglionar lateral

GABA - ácido gama-amino-butírico

GAD - glutamato-descarboxilase

NCTX - neocórtex

PBS - tampão fosfato-salina

PC - placa cortical

PFA - paraformaldeído

PP - pré-placa

Robo - *Roundabout*

SNC - sistema nervoso central

SP - subplaca

U.V. - Ultra violeta

ZI - zona intermediária

ZM - zona marginal

ZSV - zona subventricular

ZV - zona ventricular

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Formação do Neocórtex

Durante o período de embriogênese, existem três principais folhetos que darão origem a todo o corpo do embrião. São eles o endoderma (o mais interno), o mesoderma e o ectoderma (o mais externo) (LENT, 2001). A porção dorso-medial do folheto mais externo se tornará comprometida com o fenótipo neural, passando a ser denominado neuroectoderma. Nesta região, ocorre um aumento na taxa de proliferação celular e uma modificação na morfologia das células, formando a placa neural. Esta sofre uma invaginação progressiva, resultando na formação do sulco neural que, posteriormente, tem suas bordas fundidas, gerando o tubo neural, origem das estruturas do sistema nervoso central (SNC) (Figura 1).

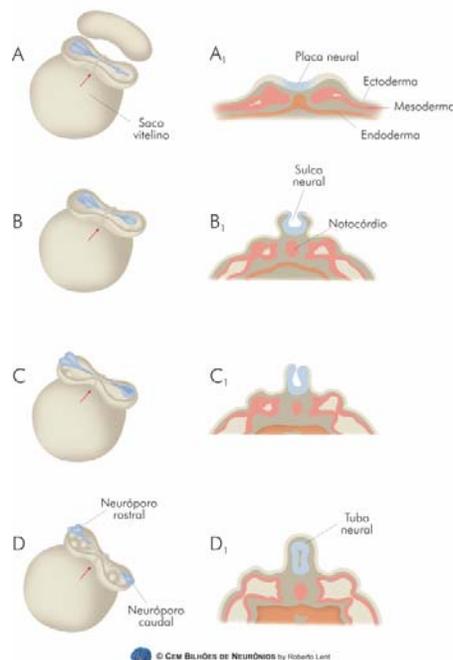


Figura 1: Durante o desenvolvimento do SNC, a porção do ectoderma situada à linha média (em azul claro) sofre influências moleculares do notocórdio e altera sua taxa de proliferação celular, formando a placa neural, posteriormente o sulco neural e, por fim, o tubo neural, que dará origem às estruturas do sistema nervoso central. Adaptada de Lent (2001).

O tubo neural forma três vesículas embrionárias que originarão o sistema nervoso central. A mais rostral delas, o prosencéfalo, dará origem ao diencéfalo e ao telencéfalo. Enquanto o diencéfalo compreende o tálamo, epitálamo, hipotálamo e subtálamo, o telencéfalo compreende os hemisférios cerebrais (córtex e núcleos da base, além da substância branca subjacente).

Nos hemisférios, a estrutura denominada sulco ou ângulo córtico-estriatal separa a porção mais dorsal do telencéfalo (onde se localiza a placa cortical, que dará lugar às camadas corticais no adulto) da porção mais ventral deste (onde se encontram as eminências ganglionares, que darão origem aos núcleos da base no adulto) (Figura 2).

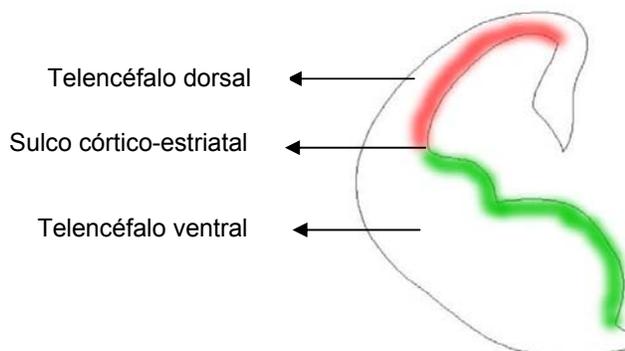


Figura 2: Desenho esquemático de um corte coronal de hemisfério cerebral de camundongo em desenvolvimento mostrando a porção dorsal e a porção ventral do telencéfalo separadas pelo sulco (ou ângulo) córtico-estriatal. Em vermelho e verde estão representadas as zonas proliferativas dos neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos, respectivamente.

No telencéfalo de mamíferos destaca-se o neocórtex, a porção evolutivamente mais recente do córtex cerebral, que está relacionado com altas funções cognitivas em humanos (Bystron, 2008). O mesmo apresenta seis camadas formadas de neurônios de projeção e neurônios de circuito local (Jacobson, 1991), além de células gliais.

As células neuronais que ocuparão as camadas neocorticais têm origem nas zonas proliferativas situadas no epitélio das paredes dos ventrículos laterais (zona ventricular e zona subventricular, Figura 2). Nestas regiões, elas proliferam até o momento de interromper o ciclo celular e iniciar um processo de migração para as posições adequadas nas camadas corticais (CAVINESS *et al.*, 1989; RAKIC, 1995).

Os neurônios migrantes mais precoces se estabelecem formando a pré-placa (PP) (ANGEVINE & SIDMAN, 1961; CAVINESS *et al.*, 1989). Um estudo recente realizado em humanos sugeriu que células ainda mais precoces são originadas no placódio olfativo e originam os primeiros neurônios a se estabelecer nesta região (BYSTRON *et al.*, 2006).

Uma vez formada a PP, a próxima onda de migração neuronal leva neurônios a se estabelecer no interior daquela para formar as camadas corticais II a VI. Isto leva a uma divisão da PP em uma camada mais superficial, a zona marginal (ZM) e uma outra mais profunda, a subplaca (SP). A ZM origina a camada I do neocórtex adulto e é ocupada primariamente pelas células Cajal-Retzius, que expressam uma importante molécula sinalizadora, a Relina, relacionada à gênese ordenada da laminação cortical (revisto em SORIANO & DEL RIO, 2005), além de expressar também as proteínas ligadoras de cálcio calretinina, parvalbumina e calmodulina (SARNAT & FLORES-SARNAT, 2002). Já a SP, situada ventralmente à placa cortical, desempenha importante papel no estabelecimento das conexões tálamo-corticais (revisto em O'LEARY & NAKAGAWA, 2002). Antes do término do desenvolvimento, a região da SP regride, não existindo no adulto.

As próximas células a migrar se estabelecem na placa cortical, formando suas camadas profundas (VI e V). As seguintes ultrapassam aquelas previamente estabelecidas e formam camadas progressivamente mais superficiais (IV, III e II). Assim, o padrão de formação das camadas corticais é denominado *inside-out* (de dentro para fora) (ANGEVINE & SIDMAN, 1961; RAKIC, 1974). (Figura 3).

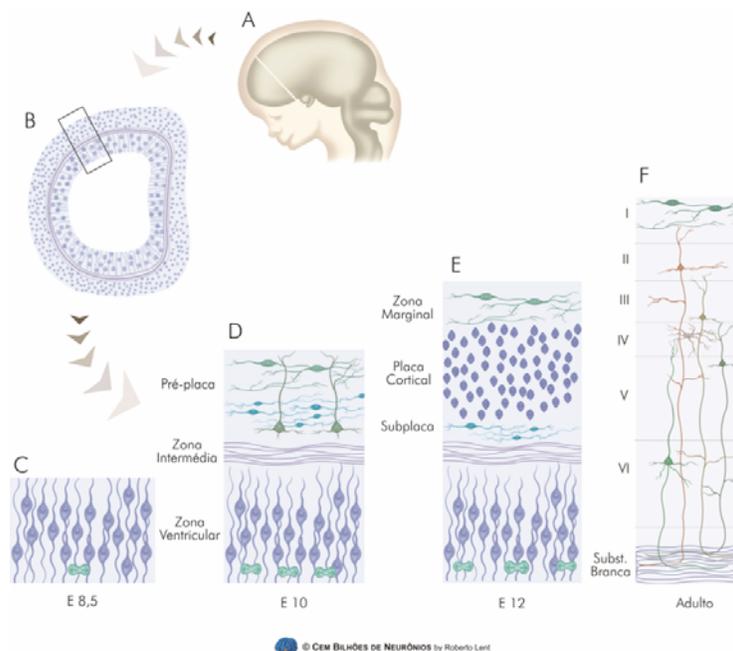


Figura 3 : Esquema representativo da formação das camadas corticais. Em A, esquema do SNC em desenvolvimento, em B, vista coronal de um momento precoce de proliferação celular. As células geradas na zona ventricular dos ventrículos laterais (C) migram para formar uma estrutura inicial denominada pré-placa (D). As próximas células migrantes se estabelecem no interior da pré-placa dividindo-a em duas porções, a zona marginal e a subplaca (E) e começam a formar a placa cortical com suas camadas conforme visto no adulto (F). Adaptada de Lent (2001).

## 1.2 Populações neuronais neocorticais

Duas principais populações neuronais formam as camadas corticais: os **neurônios de projeção**, que expressam o neurotransmissor excitatório glutamato, e os **interneurônios** de circuitaria local, que em sua maioria

expressam o transmissor inibitório ácido gama-amino butírico (GABA) (WALSH & CEPKO, 1988, 1993; O'ROURKE *et al.*, 1992, 1995, 1997; DE CARLOS *et al.*, 1996; ANDERSON *et al.*, 1997; MARIN & RUBENSTEIN, 2001, 2003; ANG *et al.*, 2003).

Os neurônios glutamatérgicos apresentam corpo de forma piramidal e longos axônios que os conectam com regiões distantes do sistema nervoso central: são, portanto, neurônios de projeção. Originam-se nas zonas proliferativas do telencéfalo dorsal (CHAN *et al.*, 2001; LETINIC *et al.*, 2002) e, portanto, assumem uma rota radial de migração para penetrar na placa cortical em formação. Utilizam como substrato para migração as fibras de glia radial, uma população glial transitória que apresenta um prolongamento ancorado na superfície ventricular e outro na superfície pial (RAKIC, 1971, 1972; SIDMAN & RAKIC, 1973). Esta é a denominada **migração radial**.

Segundo Rakic (1974), estes neurônios apresentariam uma posição látero-medial determinada desde o momento de sua geração na zona ventricular, onde haveria uma espécie de protomapa da placa cortical. Entretanto, estudos posteriores de clones celulares sugerem haver certa dispersão tangencial de precursores destas células ainda nas suas zonas proliferativas (WALSH & CEPKO, 1988, 1993; O'ROURKE *et al.*, 1992, 1995, 1997). Estudo mais recente sugeriu a existência de uma forma específica de migração tangencial realizada por esta população neuronal (BRITANOVA *et al.*, 2006).

Já a população de interneurônios GABAérgicos apresenta corpo celular de forma variada e prolongamentos restritos à circuitaria local. São originados nas principais zonas proliferativas do telencéfalo ventral: eminências

ganglionares lateral (EGL), medial (EGM) e caudal (EGC) (DE CARLOS *et al.*, 1996; ANDERSON *et al.*, 1997; MARIN & RUBENSTEIN, 2001; ANG *et al.*, 2003; MARIN & RUBENSTEIN, 2003). Estas zonas proliferativas originam ainda interneurônios que irão popular os núcleos da base e o bulbo olfatório, além do neocórtex (CORBIN *et al.*, 2001). Uma vez originadas no telencéfalo ventral, estas células devem adotar rotas de migração paralelas à superfície pial até seus locais de estabelecimento no córtex (ANDERSON *et al.*, 1997). Esta forma de migração é denominada **migração tangencial**.

Em camundongos, o período de migração tangencial neuronal para formar as camadas neocorticais compreende as idades de E12 a E18 (TAMAMAKI *et al.*, 1997). Neste intervalo temporal, os precursores apresentam uma morfologia comum a diferentes células migrantes, com corpo celular alongado, de onde se projetam dois prolongamentos: um mais longo e espesso, em direção ao qual a célula realiza seu movimento migratório (prolongamento líder) e um outro menor e menos espesso, que acompanha o movimento da célula (prolongamento seguidor) (TAMAMAKI, 1997; revisto em LAMBERT DE ROUVROIT & GOFFINET, 2001) (Figura 4).

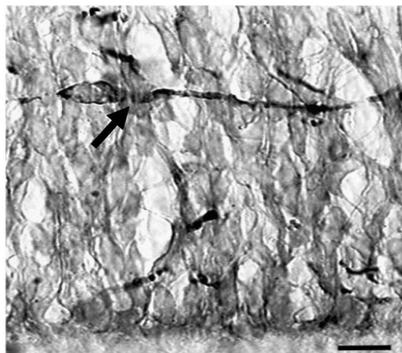


Figura 4: Morfologia característica de células migrantes, que apresentam corpo celular alongado (seta), sendo bipolares, com um prolongamento líder orientado na direção de migração da célula (à direita) e um prolongamento seguidor, localizado no pólo oposto (à esquerda). Adaptada de O'Rourke *et al.*, 1995.

A migração tangencial apresenta características diferentes da migração radial. Neste estudo, serão abordados somente aspectos da migração tangencial, tendo como principais regiões observadas o neocórtex e as eminências ganglionares.

### **1.3 Interneurônios GABAérgicos**

As células GABAérgicas, conforme citado previamente, são aquelas que utilizam GABA como neurotransmissor principal, e para tal é necessário que expressem a enzima glutamato-descarboxilase (GAD), que pode estar presente em uma de suas duas isoformas: GAD 65 (65KDa) ou GAD 67 (67KDa). Esta enzima participa da conversão de glutamato em GABA (MARTIN & RIMVALL, 1993; SHEIK & MARTIN, 1996; CONDIE *et al.*, 1997).

Os interneurônios GABAérgicos podem ser subdivididos em quatro subgrupos principais, de acordo com a proteína ligadora de cálcio com a qual colocalizam: células que expressam parvalbumina, calretinina, colecistoquinina, somatostatina, calbindina e neuropeptídeo Y. Estas subpopulações distribuem-se em camadas específicas do córtex (LOPEZ-BENDITO *et al.*, 2004) e podem ser correlacionadas às suas propriedades eletrofisiológicas (BUTT *et al.*, 2005). Seus sítios de origem também parecem ser específicos, sendo que os interneurônios originados na EGM, em sua maioria, contêm parvalbumina ou somatostatina (revisto por WONDERS & ANDERSON, 2006). Os outros subtipos parecem originar-se nas outras eminências ganglionares (EGL e EGC).

Deleções gênicas que inviabilizam a diferenciação dos interneurônios GABAérgicos produzem animais incapazes de sobreviver (XU, 2004 ; COBOS

*et al.*, 2005), e alterações funcionais destas células levam a distúrbios como epilepsias, entre outros (ZHOU *et al.*, 2004; COBOS *et al.*, 2005).

#### **1.4 Migração tangencial**

A migração celular compreende uma seqüência de eventos como alterações no citoesqueleto e aumentos na concentração de cálcio intracelular, que resultam no deslocamento da célula em uma certa direção (MOYA & VALDEOMILLOS, 2004).

Estudos de linhagem celular mostraram que os neurônios corticais sofrem dispersão tangencial no neocórtex antes de se estabelecerem definitivamente (WALSH & CEPKO, 1988, 1993). Este espalhamento pode ocorrer em diferentes camadas da parede neocortical como a zona intermediária (ZI), zona subventricular (ZSV), subplaca (SP) e placa cortical (PC) (O'ROURKE *et al.*, 1992, 1995, 1997). Esta dispersão tangencial das células originadas no telencéfalo dorsal é, no entanto, limitada a alguns poucos micrômetros, porém, conforme revisto por Rakic (1995), existe uma outra população celular que apresentava uma maior dispersão tangencial.

O telencéfalo ventral compreende três estruturas, as eminências ganglionares medial (EGM), lateral (EGL) e caudal (EGC), que originam as populações GABAérgicas que irão povoar não somente o neocórtex, mas também o bulbo olfatório, o corpo estriado, o hipocampo e o córtex piriforme (DE CARLOS *et al.*, 1996; ANDERSON *et al.*, 1997; TAMAMAKI *et al.*, 1997; LAVDAS *et al.*, 1999; PLEASURE *et al.*, 2000; MARIN & RUBENSTEIN, 2001; ANG *et al.*, 2003; para revisão, ver: MARIN & RUBENSTEIN, 2003) (Figura 5). A EGM é a principal fonte de interneurônios GABAérgicos para o córtex

cerebral, apesar de também haver uma contribuição da EGC (revisto por CORBIN *et al.*, 2001).

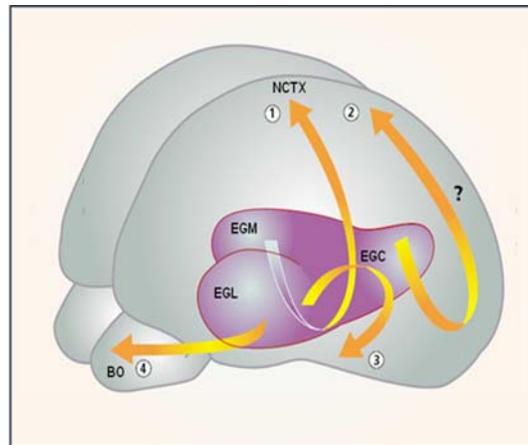


Figura 5: Esquema mostrando o posicionamento das eminências ganglionares dentro do telencéfalo e as rotas migratórias (setas amarelas) adotadas pelos interneurônios GABAérgicos originados em cada uma delas. Adaptada de Corbin *et al.* (2001).

Durante o processo de migração tangencial, os prologamentos dos precursores GABAérgicos são orientados paralelamente a superfície pial. Uma vez concluído o processo de migração látero-medial destas células, seu prolongamento líder é orientado radialmente e elas iniciam um processo de migração radial, de modo a penetrar as camadas corticais. Alguns autores sugerem que este deslocamento envolve interação com as fibras de glia radial de maneira semelhante ao observado para a migração de precursores glutamatérgicos (NADARAJAH & PARNAVELAS, 2002; LOPEZ-BENDITO *et al.*, 2004; YOKOTA *et al.*, 2007).

Como demonstrado na Figura 6, as células GABAérgicas seguem uma seqüência de passos para: (1) deixar a zona ventricular, (2) direcionar-se lateralmente evitando a zona do manto das eminências ganglionares, (3) ultrapassar o sulco córtico-estriatal, (4) atingir longas distâncias no eixo látero-

medial e por fim, (5) penetrar radialmente nas camadas corticais e se diferenciar. Para cada uma destas etapas, seguem pistas direcionadoras expressas no meio, seja na membrana celular de populações adjacentes, seja na matriz extracelular.

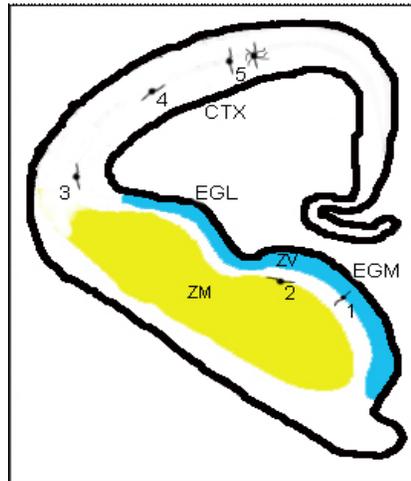


Figura 6: Esquema mostrando as etapas migratórias dos neurônios GABAérgicos originados na eminência ganglionar medial (EGM) e destinados ao córtex (CTX). As etapas de 1 a 5 são descritas no texto. ZV = zona ventricular, ZM = zona do manto, EGL = eminência ganglionar lateral.

### 1.5 Moléculas direcionadoras

Para atingir suas posições finais no córtex cerebral, os neurônios GABAérgicos são guiados por pistas moleculares expressas ao longo do seu caminho, semelhante ao mecanismo de direcionamento dos axônios na busca de seus alvos. Diversas moléculas parecem estar envolvidas neste processo, sejam elas atrativas ou repulsivas.

Sugere-se que a zona ventricular do telencéfalo ventral expresse slit-1, proteína difusível que repele estas células da camada proliferativa (Figura 7), porém esta molécula não parece desempenhar um papel diretamente no direcionamento destes precursores para o córtex (ZHU *et al.*, 1999; MARIN *et*

*al.*, 2003; ANDREWS *et al.*, 2006). Os receptores desta molécula são membros da família *roundabout (Robo)*, e são expressos de maneira coordenada pelas subpopulações de neurônios originados no telencéfalo ventral, além de neurônios que compõem a população estriatal (Revisto em ANDREWS *et al.*, 2007).

Durante o processo de migração, as células evitam determinadas áreas que expressam moléculas repulsivas. Dentre elas estão a área entopeduncular (ou área preóptica), que expressa slit. Até então, o papel desta molécula nesta região foi relacionado somente com o direcionamento axonal (BAGRI *et al.*, 2002). Marin e colaboradores (2003) sugerem que a molécula repulsiva à migração que seria expressa nesta região ainda não é conhecida, e que mesmo nos animais nocaute para slit-1 não há invasão desta região pelas células migratórias, o que nos impede de atribuir este papel a esta molécula. Há ainda a zona do manto das eminências ganglionares, onde ocorre expressão de semaforinas 3A e 3F, cujos receptores pertencem à família das neuropilinas. Assim, as células migrantes, que expressam neuropilinas (receptores de semaforinas), defletem lateral e dorsalmente, seguindo seu trajeto para o córtex em formação (MARIN *et al.*, 2001).

Estudo desenvolvido em nosso laboratório mostrou a expressão do proteoglicano de condroitim sulfato ao longo do trajeto dos interneurônios GABAérgicos, sugerindo uma relação desta molécula com esta forma de migração. Uma vez que este proteoglicano é componente da matriz extracelular, ele também poderia servir como apresentador de outras moléculas menores como as semaforinas, ou seja, ter uma influência indireta na migração (SCHANUEL, 2004) (Figura 7).

A molécula de superfície axonal Tag-1 também foi sugerida como direcionadora para a migração tangencial (DENAXA *et al.*, 2001), entretanto, estudos mais recentes mostraram que ela parece estar envolvida no direcionamento de uma população celular específica, os neurônios que irão povoar o bulbo (DENAXA *et al.*, 2005). Lopez-Bendito (2006) sugere ainda que as células migrantes tangencialmente participam do direcionamento axonal e não o inverso, conforme acreditava-se.

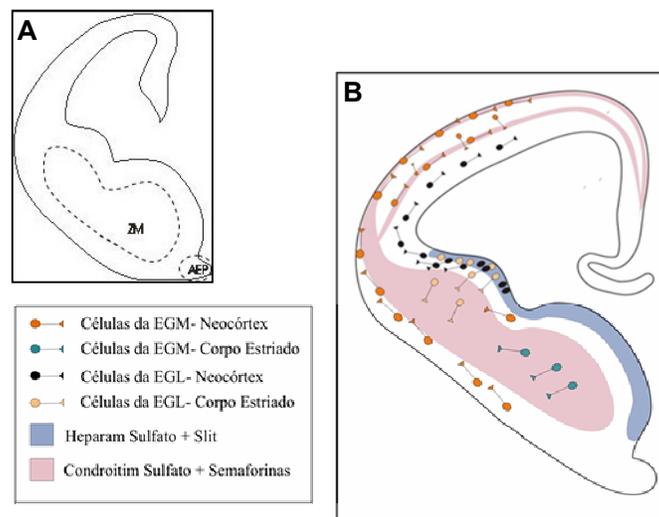


Figura 7: Esquema representando uma fatia de um hemisfério cerebral de camundongo em corte coronal em E14, ressaltando em A as regiões evitadas pelas células migrantes (pontilhadas) e, em B, as diferentes populações neuronais originadas no telocéfalo ventral e algumas moléculas que parecem participar do direcionamento para seus sítios finais. ZM = zona do manto, AEP = área entopeduncular, EGM = eminência ganglionar medial, EGL = eminência ganglionar lateral. Adaptada de Schanuel (2004).

Alguns neurotransmissores também exercem papel fundamental na migração tangencial, e a manipulação da atividade de receptores específicos interfere no trajeto e morfologia dos neurônios tangencialmente migrantes (METIN *et al.*, 2000; SORIA & VALDEOLMILLOS, 2002; LOPEZ-BENDITO, *et al.*, 2003). Estudos recentes mostraram que o bloqueio de determinado subtipo

de receptor interfere na migração destas células, alterando seu posicionamento na placa cortical (LOPEZ-BENDITO *et al.*, 2003; HECK *et al.*, 2007). O receptor GABA<sub>A</sub> está relacionado à passagem destes do telencéfalo ventral para o dorsal através da junção córtico-estriatal (CUZON *et al.*, 2006).

Outra molécula parece participar como sinalizadora, a neuregulina 1, uma vez que diferentes isoformas desta são expressas nas rotas de migração tangencial do córtex em desenvolvimento, e seu receptor ErbB4 é expresso pelos interneurônios GABAérgicos. Esta molécula pode, então, atrair os neurônios para o córtex a curta ou longa distância (FLAMES *et al.*, 2004).

### **1.6 Rotas de migração tangencial**

As células migrantes ultrapassam o ângulo córtico-estriatal e seguem rotas superficiais – próximas à superfície pial - (a partir de E12) ou profundas – próximas à superfície ventricular - (a partir de E13,5) para o telencéfalo dorsal (revisto por MARIN & RUBENSTEIN, 2001).

Até a idade aproximada E16, em camundongos, as células GABAérgicas destinadas ao córtex cerebral têm origem principalmente na EGM (ANDERSON *et al.*, 2001; MARIN & RUBENSTEIN, 2001). Após este momento e com a fusão das eminências medial e lateral, a principal fonte destas células é a EGL e as rotas utilizadas passam a ser as mais profundas (MARIN & RUBENSTEIN, 2001). A partir de E18, a maioria das células originadas na eminências ganglionar passa a destinar-se ao corpo estriado em formação (HAMASAKI *et al.*, 2001a; HAMASAKI *et al.*, 2001b).

Desta forma, observa-se que os neurônios originados mais precocemente adotam rotas mais superficiais, predominando a da zona

marginal, enquanto nas idades mais tardias as rotas predominantes são as mais profundas, através da subplaca e, por fim, na borda entre a zona intermediária e a zona subventricular. (revisão em Marin & RUBENSTEIN, 2001) (Figura 8).

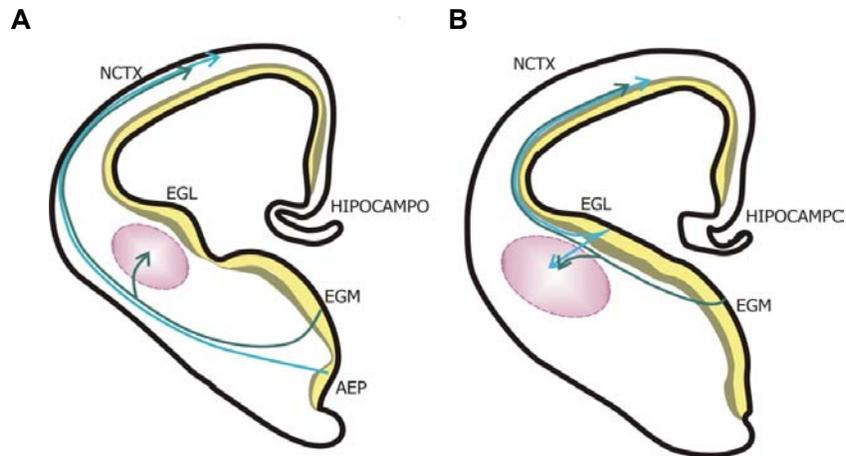


Figura 8: Esquema das principais rotas migratórias dos interneurônios que irão compor o neocórtex adulto. Nas idades mais precoces, as rotas são mais superficiais e a principal fonte de células é a EGM (A), enquanto nas idades mais tardias, predominam as rotas profundas e a EGL contribui com precursores GABAérgicos para o córtex (B). AEP = área entopeduncular, NCTX = neocórtex. Adaptada de Schanuel (2004).

Uma vez concluído o movimento tangencial, estes neurônios emitem um prolongamento radial de forma a penetrar a placa cortical em formação. Uma vez na placa cortical, as células migrantes movimentam-se em diferentes direções, o que pode ser concluído pelas diferentes posições de seus prolongamentos líderes a partir de vídeo-microscopia em fatias e no próprio cérebro (ANG *et al.*, 2003; TANAKA *et al.*, 2003).

## 1.7 Topografia da Migração Tangencial

Alguns autores já descreveram correlações topográficas entre os sítios de origem e os locais de estabelecimento dos interneurônios GABAérgicos no córtex cerebral, no eixos ântero-posterior e radial.

A distribuição topográfica no eixo ântero-posterior foi proposta com base em achados de que as células da EGM migram lateralmente e se espalham ao longo do córtex, enquanto a maioria das células da EGC migram caudalmente para a porção mais caudal do telencéfalo (ANG *et al.*, 2003; YOZU *et al.*, 2005). Experimentos de transplantes sugeriram que os destinos finais e as direções de migração das células da EGM e da EGC de camundongos são intrinsicamente determinados por volta de E13.5, mas as pistas ambientais também têm papel fundamental (NERY *et al.*, 2002; YOZU *et al.*, 2005).

Os interneurônios GABAérgicos também parecem seguir um gradiente “inside-out” de organização na placa cortical, e apesar de serem originados em zonas proliferativas distintas, ocupam as mesmas camadas corticais dos neurônios glutamatérgicos nascidos no mesmo dia (ANDERSON *et al.*, 2002; VALCANIS & TAN, 2003).

Estudo recente mostrou a existência de diferentes subdomínios dentro da zona ventricular das eminências ganglionares, sugerindo que diferentes subpopulações GABAérgicas poderiam ter diferentes origens dentro das zonas proliferativas (FOGARTY *et al.*, 2007). Flames e colaboradores (2007) mostraram a presença de diferentes domínios de expressão gênica nas regiões proliferativas do telencéfalo ventral (Figura 9). Entretanto, até o presente estudo ainda não havia ficado clara a existência de uma correlação topográfica entre os sítios específicos de origem dos interneurônios GABAérgicos dentro

das zonas proliferativas das eminências ganglionares e seus sítios de estabelecimento final no eixo látero-medial da placa cortical.

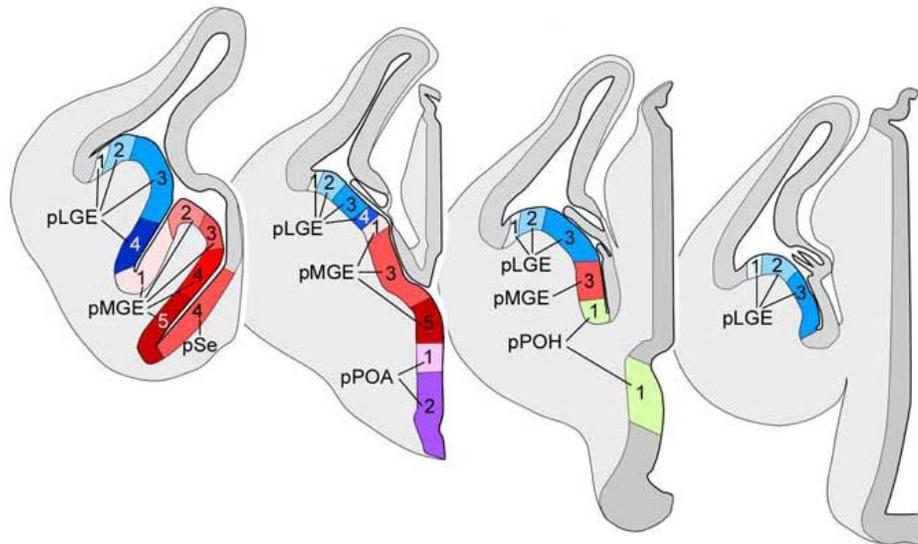


Figura 9: A zona ventricular do telencéfalo ventral compreende diferentes domínios de expressão gênica nos eixos ântero-posterior e látero-medial. p LGE= domínio de progenitores da LGE, pMGE = domínio de progenitores da MGE, pPOA = domínio de progenitores da área pré-óptica, pPOH = domínio de progenitores da área pré-óptica hipotalâmica, pSE = domínio de progenitores do septo. Adaptada de Flames *et al.*, 2007.

## **2 OBJETIVOS**

- 1- Observar a distribuição dos interneurônios GABAérgicos no eixo látero-medial do neocórtex, buscando relacioná-la com os sítios de origem dos precursores dentro da zona ventricular da EGM, principal fonte desta população para o córtex.
- 2- Analisar possíveis influências do momento de geração destas células em seu posicionamento final no neocórtex.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais utilizados.

Todos os procedimentos com animais estavam de acordo com as recomendações do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ. Todos os esforços foram realizados de modo a minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

Foram utilizados camundongos suíços (devido à indisponibilidade de animais C57-black - background genético dos transgênicos) embrionários nas idades de E14, E15 e E17 (considerando-se E1 como o dia da observação do tampão vaginal) e camundongos transgênicos embrionários, que expressavam o gene da proteína fluorescente verde (*enhanced Green Fluorescent Protein*, eGFP) ligado ao promotor da actina (OKABE *et al.*, 1997) nas mesmas idades embrionárias. Foram utilizados embriões F2 obtidos de fêmeas transgênicas heterozigotas acasaladas com machos heterozigotos para o gene eGFP. As ninhadas resultantes apresentavam uma média de 50% de embriões selvagens e 50% de embriões transgênicos.

Foram utilizadas 43 fêmeas suíças e 27 fêmeas híbridas, com uma média de 8 embriões por ninhada. Um total de 86 fatias foram obtidas, sendo 17 para os experimentos homotópicos contínuos, 29 para os homotópicos transitórios, 35 para os heterotópicos e 5 para os experimentos de transplante duplo (Tabela 1). Foram processadas aproximadamente 3 fatias do encéfalo de cada embrião. As mesmas foram selecionadas segundo suas características morfológicas de modo a assegurar que as análises foram realizadas mantendo sempre a mesma posição no eixo ântero-posterior.

Transplantes contínuos 4 DiV:

Tipo de transplante	Nº de fatias em E14	Nº de fatias em E15
EGMmedial → EGMmedial	9	2
EGMlateral → EGMlateral	3	3
EGMmedial → córtex	7	3
EGMlateral → córtex	6	4
EGMmedial → tronco encefálico	8	-
EGMlateral → tronco encefálico	7	-

Transplantes Transitórios E14:

EGMmedial → EGMmedial	2
EGMlateral → EGMlateral	3

Transplantes Transitórios E15:

Total de 4 DiV	10
Total de 7DiV	3

Transplantes Transitórios E17:

Total de 2DiV	8
Total de 5DiV	3

Transplantes duplos (E15-E17):

Total de 4 DiV	2
Total de 7DiV	3

Tabela 1: Número de experimentos realizados

### 3.2 Procedimentos cirúrgicos e Preparação de fatias e explantes.

Fêmeas grávidas com idade gestacional conhecida (E14, E15 ou E17) eram anestesiadas por inalação de éter e submetidas a incisão cesariana para retirada dos embriões. Estes eram expostos à luz UV para diferenciação quanto à expressão do gene da eGFP (Figura 10).

Uma vez separados, os embriões tinham seus encéfalos removidos em ambiente estéril e seccionados coronalmente para obtenção de fatias de

225 $\mu$ m (fatiador Mc Ilwain). As fatias provenientes dos encéfalos selvagens serviam como receptoras, enquanto aquelas obtidas dos encéfalos transgênicos eram utilizadas como doadoras dos explantes. As fatias eram, então, levadas à geladeira (4°C) em solução de Gey por 30 minutos para eliminação das proteases liberadas pelas células seccionadas no plano de corte.

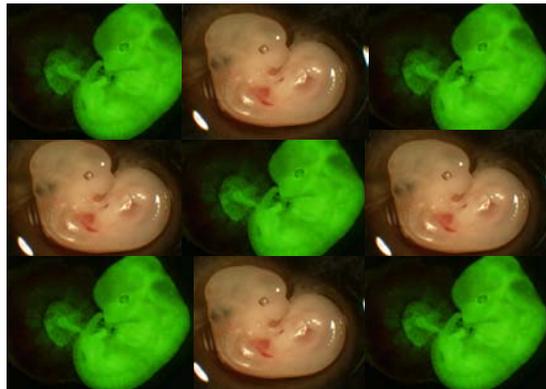


Figura 10: Fotomontagem exemplificando a diferença entre embriões selvagens e transgênicos para a proteína eGFP, que fluorescem em verde quando expostos à luz UV. Adaptada de foto retirada de <http://www.cdb.riken.jp/pcs/photo/tophoto.html>.

As fatias selvagens eram plaqueadas em lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina a 1:1000 e lavadas por três vezes em água Mili-Q estéril dentro de placas de 35mm. Já as fatias transgênicas tinham a zona ventricular da EGM dissecada em três porções, uma mais medial, uma mais lateral e uma intermediária. A porção intermediária era eliminada e as duas outras porções serviam como explantes a serem introduzidos homo ou heterotopicamente nas fatias receptoras (Figura 11).

### 3.3 Transplantes homotópicos permanentes

Neste ensaio experimental, os explantes retirados de regiões conhecidas da zona ventricular da EGM de fatias de encéfalos de camundongos transgênicos em E14 ou E15 eram introduzidos homotopicamente nas fatias obtidas de embriões selvagens de mesma idade (Figura 12).

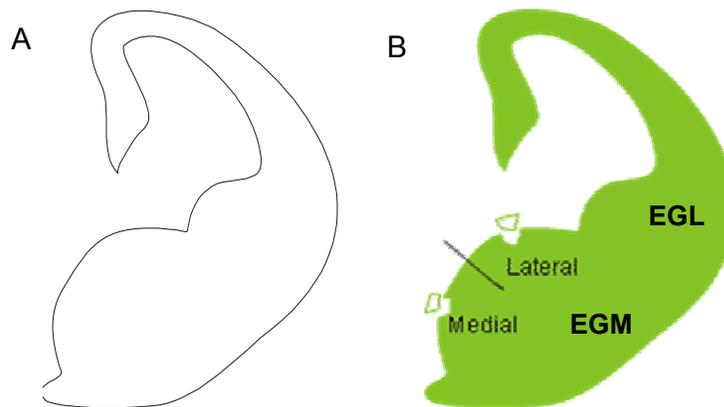


Figura 11: Desenho esquemático dos dois tipos de fatias utilizadas neste ensaio experimental. Em A, a fatia do animal selvagem, que serve como receptora do explante dissecado de regiões conhecidas da zona ventricular da EGM de embriões transgênicos, cuja fatia está representada em B.

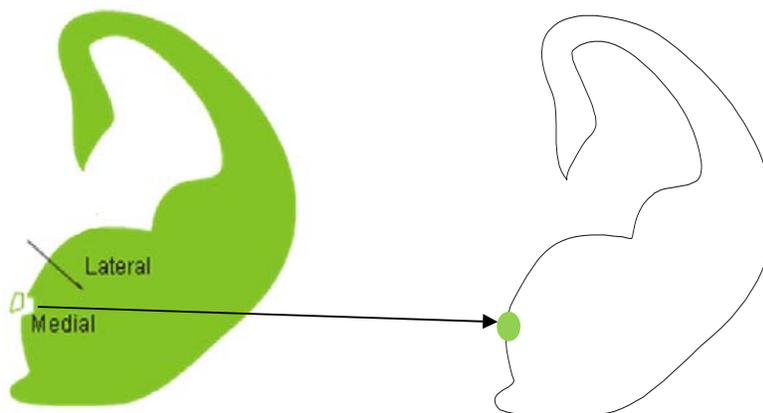


Figura 12: Desenho esquemático de um exemplo de transplante homotópico: o explante era introduzido no selvagem no mesmo local de onde era retirado do transgênico.

As fatias eram mantidas em cultura por 4 dias *in vitro* (DIV) em meio DMEM-F12 (Invitrogen, USA) enriquecido com soro fetal bovino a 10% (GIBCO), e suplementado com glicose (6,5 mg/ml), Fungizon, Penicilina (5000 U/ml) e Estreptomicina (5mg/ml) em um incubador a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Após este período, as fatias eram fixadas por 5 minutos em formalina a 10%, seguido de incubação em paraformaldeído (PFA) a 4% (em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4) por 20 minutos em temperatura ambiente. Após esta etapa, o material era lavado em tampão fosfato salina (PBS – 0,1M) por três vezes durante 5 minutos, incubado por 10 minutos com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Molecular Probes) para obter um padrão arquitetônico geral das fatias, sendo estas montadas em lâminas gelatinizadas para análise em microscópio de fluorescência.

### **3.4 Transplantes homotópicos transitórios**

Nos experimentos anteriormente descritos, o explante colocado no primeiro dia era mantido até o momento da fixação. Entretanto, o fato de este ser uma fonte continuamente geradora de precursores GABAérgicos poderia influenciar o padrão de distribuição celular observado ao final de 4 dias de cultura. Para contornar essa possibilidade, realizamos experimentos semelhantes aos acima descritos, retirando o explante da fatia após 2 DiV e mantendo-a em cultura por mais dois dias. Depois desse tempo as fatias eram fixadas como anteriormente.

### 3.5 Transplantes duplos

Para este conjunto de experimentos, foram utilizados embriões de camundongos suíços nas idades de E15 e E17. Neste caso, os explantes não provinham de fatias doadoras transgênicas, mas também de fatias de embriões suíços e eram previamente marcados com dois diferentes corantes fluorescentes: Cell Tracker Orange (CMTMR (5-(e-6)-(4-clorometil)benzoil)amino) tetrametil-rodamina) – Invitrogen, USA) e Cell Tracker Blue (CMAC (7-amino-4-clorometilcumarina) – Invitrogen, USA).

A zona ventricular da EGM era novamente dissecada em três porções (medial, intermediária e lateral), porém neste ensaio somente a porção medial era utilizada. Nestas idades mais tardias a EGM está se fundindo com a EGL e a dissecação precisa de explantes laterais ficaria comprometida.

No primeiro dia de experimento, fatias E15 receptoras eram plaqueadas e a porção mais medial da zona ventricular da EGM era dissecada e marcada com Cell Tracker Blue (5 $\mu$ M em DMSO) por 30 minutos. Os explantes eram lavados 3 vezes com meio de cultura e introduzidos homotopicamente nas fatias plaqueadas. Estas eram mantidas em cultura por dois dias.

A seguir, o explante era retirado das fatias e uma nova fatia doadora, proveniente de um embrião de idade correspondente (E17), tinha a zona ventricular da EGM dissecada conforme previamente descrito neste item. Os novos explantes obtidos eram marcados com Cell Tracker Orange (5 $\mu$ M em DMSO) como os anteriores, introduzidos homotopicamente no local ocupado pelo explante anterior e as fatias mantidas em cultura por mais dois dias, após os quais as fatias eram fixadas conforme descrito (Figura 13).

Alguns ensaios foram mantidos por 7DiV e, nestes casos, foram utilizados *inserts* da Millicell. A fixação foi realizada de maneira similar em todos os ensaios.

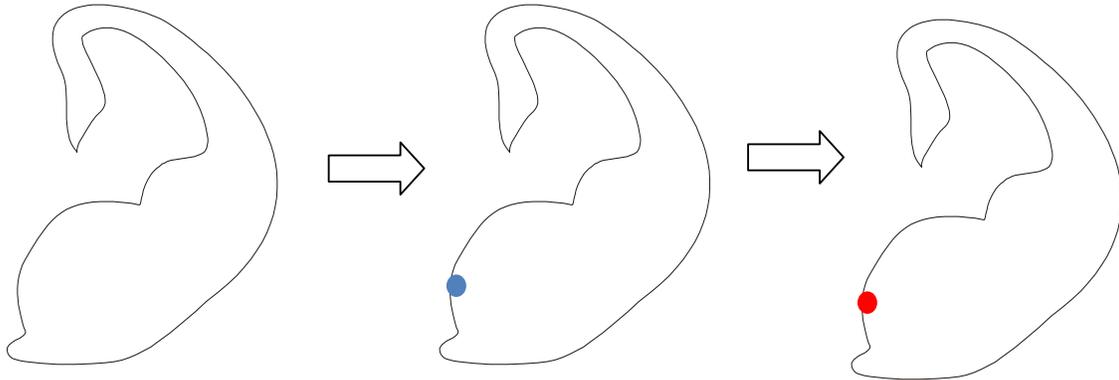


Figura 13: Transplantes duplos – após 2 DiV, o primeiro explante (marcado com cell tracker blue) era substituído por um outro de uma fatia de um animal 2 dias mais velho (E17) corado com Cell Tracker de outra cor (vermelho).

### 3.6 Transplantes heterotópicos permanentes

Explantes retirados de regiões conhecidas da zona ventricular da EGM de fatias eGFP+ eram introduzidos no córtex cerebral (sítio final de destino destas células) e do tronco encefálico (região usualmente não ocupada por esta população celular) de fatias selvagens nas idades E14 e E15. As fatias eram mantidas em cultura por 4 dias e fixadas conforme descrito previamente.

### 3.7 Análises

Algumas horas após a colocação do explante, as fatias eram desenhadas de forma a localizar o sítio de inserção e auxiliar na análise pós-fixação. Após 4 DiV, as fatias eram fixadas e analisadas em microscópio de fluorescência equipado com câmara clara (Zeiss Axioplan).

As posições das células eGFP na placa cortical eram desenhadas com objetiva de 20X e o filtro adequado: azul (450-490nm) para as células eGFP (que emitem verde), verde (510-560nm) para as células marcadas com Cell Tracker Orange (que emitem laranja) ou ultravioleta (365nm) para as células marcadas com Cell Tracker Blue (que emitem azul). Alguns exemplos de células migrantes eram fotografados utilizando o programa AxioVision. Os desenhos de câmara clara eram escaneados e analisados conforme abaixo, utilizando Photoshop 6.0. Em alguns casos, também foi observada a orientação dos prolongamentos-líderes das células migrantes.

### **3.8 Análise quantitativa**

De modo a quantificar as células migrantes, a área cortical total (do ângulo córtico-estriatal à porção mais medial do córtex) dos experimentos de transplantes transitórios era mensurada e dividida em três porções iguais no sentido látero-medial. Denominamos os posicionamentos como “proximal” (0-1,05mm), “médio” (1,05-2,09mm) e “distal” (2,09-3,41mm) em relação ao ângulo córtico-estriatal.

Contamos o número total de neurônios assinalados nessas três porções, que eram então comparadas quanto ao número presente em cada uma delas após o período de migração estabelecido. Para esta análise, foi utilizado o programa Image J. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste Two-way ANOVA através do programa Prisma 4.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Origem e Migração dos Precusores GABAérgicos – comparação com a literatura e validação do método de estudo

O período de migração tangencial em camundongos compreende as idades de E12 a E18. Durante este intervalo, as eminências ganglionares situadas no telencéfalo ventral originam precusores GABAérgicos destinados a diferentes regiões telencefálicas. Dentre estas células geradas, estão aquelas destinadas à formação das camadas neocorticais, cuja principal fonte é a EGM e cujo pico de migração encontra-se por volta de E14 (revisito por CORBIN *et al.*, 2001). Com base nestes dados, as regiões de interesse deste estudo foram a EGM e a placa cortical em formação e as idades abordadas compreenderam E14, E15 e E17.

Nossos dados corroboram dados prévios que mostraram que nas idades analisadas, os precusores GABAérgicos deixam a zona ventricular da EGM e direcionam-se às camadas corticais em formação através de rotas paralelas à superfície pial, com predomínio de porções mais superficiais nas idades mais precoces (zona marginal) e porções mais profundas em idades mais tardias (zona intermediária) (MARIN & RUBENSTEIN, 2001) (Figura 14).

A determinação do tempo de manutenção das fatias em cultura baseou-se na observação dos seguintes critérios: primeiro, que fosse tempo suficiente para que um número razoável de células migrantes atingisse a placa cortical e se espalhasse ao longo do eixo látero-medial desta e segundo, que mesmo após este período fosse garantida a sobrevivência da fatia.

O tempo de 4 DiV foi definido como ótimo para este ensaio experimental, pois conforme observado na Figura 15, durante este período as células migram

para o telencéfalo dorsal, inicialmente direcionadas tangencialmente à superfície pial (Figura 14A). Uma vez atingido certo posicionamento no eixo látero-medial, seus prolongamentos líderes defletem radialmente de modo a penetrar na placa cortical (Figura 14A). Experimentos com fatias E17 sugeriram que, após 2 DiV, as células migrantes já atingem regiões corticais distantes, chegando inclusive à porção mais medial do mesmo (Figura 15).

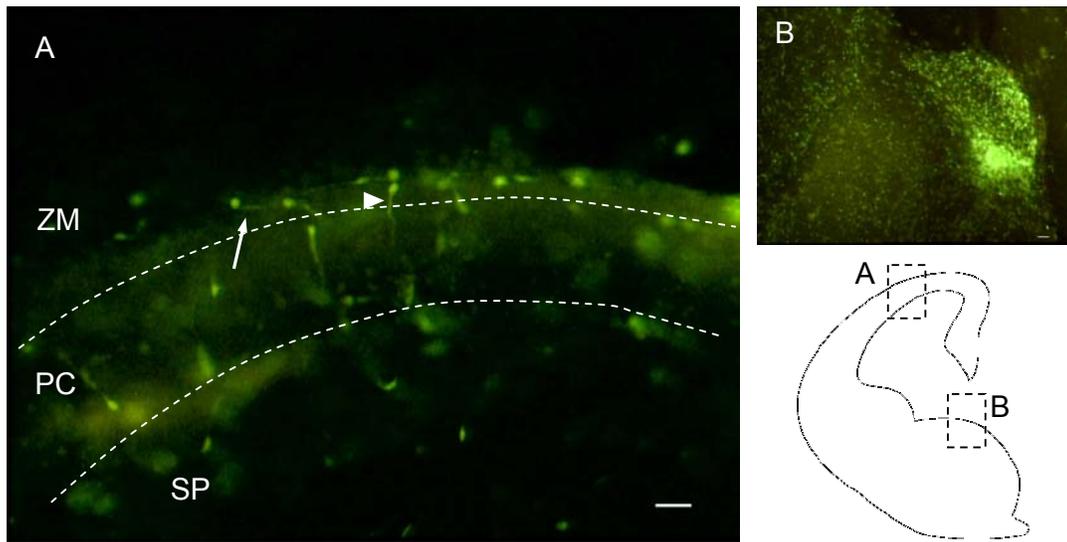


Fig. 14: Em A, células migrantes na idade E14, assumindo rotas superficiais através da zona marginal (ZM). O prolongamento líder inicialmente se posiciona tangencialmente (seta) e, em determinado momento, toma direção radial (cabeça de seta) de modo a penetrar a placa cortical em formação. Em B, observa-se um exemplo de explante em E14, mostrando um grande número de células que migraram em diversas direções. Em verde, células provenientes da ZV da EGM, expressando eGFP. Barras de escala = 100 $\mu$ m.

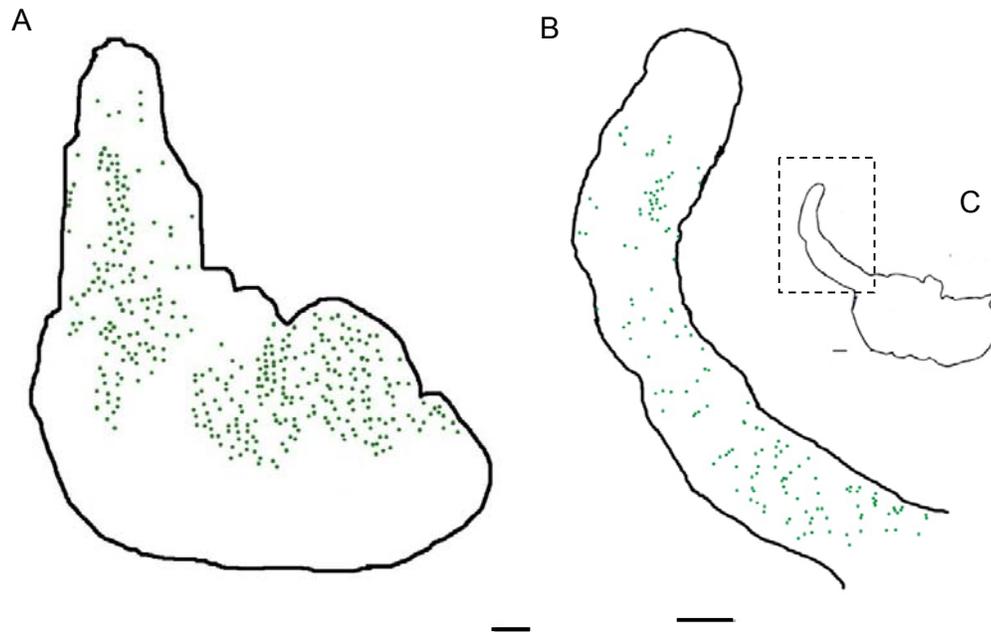


Figura 15: Em A, células originadas de um explante E14 se distribuem ao longo de todo o córtex cerebral após 4 DiV. Escala = 500 $\mu$ m. Em B, desenho em câmara clara da distribuição das células migrantes E17 ao longo de todo o córtex após 2 DiV. O detalhe (C) mostra desenho da fatia inteira correspondente ao córtex ilustrado parcialmente em B. Barras de escala = 500 $\mu$ m.

## 4.2 Morfologia dos Precusores GABAérgicos

Precusores neuronais migrantes apresentam morfologia característica com corpo alongado, bipolar, apresentando um prolongamento líder mais espesso e um prolongamento seguidor mais fino. A orientação do prolongamento líder prediz a direção para a qual o neurônio irá migrar (Figura 16).

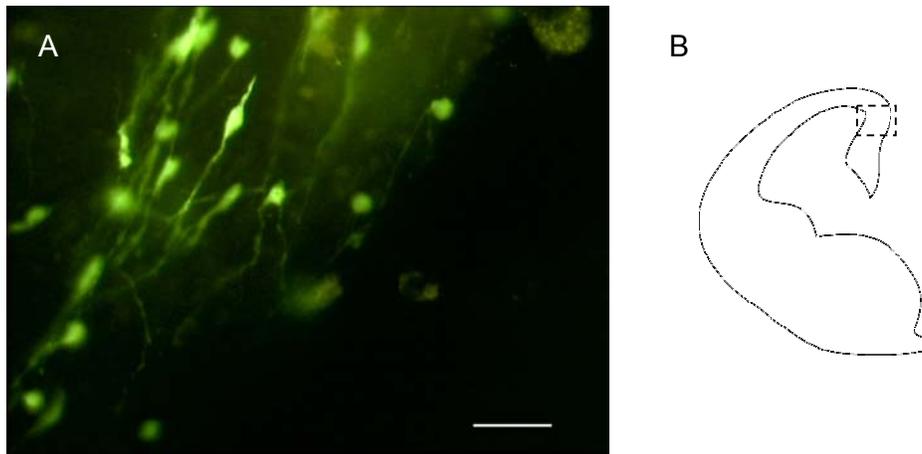


Figura 16: Células com morfologia típica de neurônios migrantes, apresentando corpo celular alongado, com prolongamento líder mais espesso e outro seguidor mais fino. Barra de escala = 100 $\mu$ m.

Uma vez dentro do neocórtex em formação, as células migram em direções e angulações diversas, como se de fato “tateassem” o ambiente em busca de informações de parada (Figura 17).

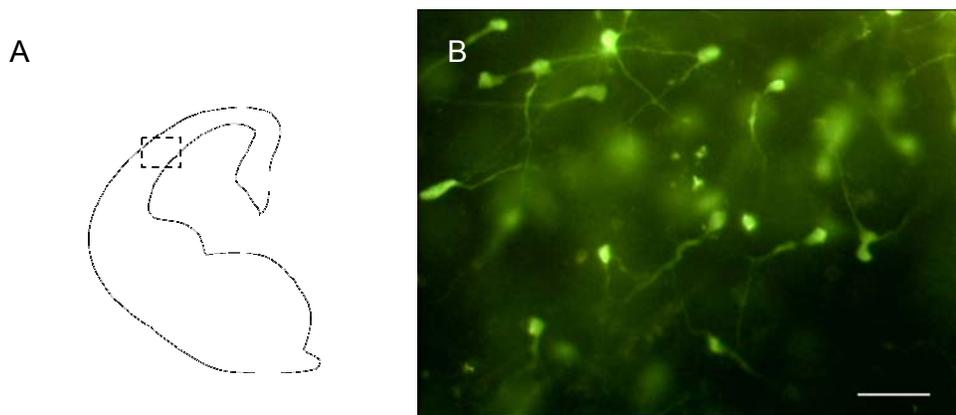


Figura 17: Em A, uma representação do campo de onde foi capturada a foto. Dentro da placa cortical, as células migram em diversas direções (B). Barra de escala = 100 $\mu$ m.

Uma vez tendo atingido a camada cortical adequada, os precursores GABAérgicos começam a se diferenciar. Seu corpo celular se torna mais arredondado e seus prolongamentos começam a ramificar, passando a apresentar uma arborização mais complexa.

#### **4.3 Migração dos precursores GABAérgicos em regiões não permissivas**

Algumas regiões do telencéfalo ventral de camundongos expressam moléculas reconhecidamente repulsivas. Uma destas áreas é a zona do manto das eminências ganglionares, onde há a expressão das semaforinas 3A e 3F, cujo receptor (neuropilina) é expresso pelas células destinadas ao neocórtex, porém não por aquelas direcionadas a outras regiões (MARIN *et al.*, 2001). Desta forma, as células corticais não penetram a zona do manto das eminências ganglionares, mas migram ao longo de sua borda seguindo em direção à placa cortical. Ao contrário, as células com destino estriatal não reconhecem a pista repulsiva, sendo capazes de penetrar e popular a zona do manto (MARIN *et al.*, 2001).

Nossos resultados indicaram que as células originadas na EGM nas idades analisadas e, portanto, destinadas à composição do neocórtex, evitam a área entopeduncular, além da zona do manto das eminências ganglionares, principalmente da EGM, que se mostra uma região com um número escasso de células (Figura 18). O presente estudo mostrou que, após o processo de migração, esta área permanece “inabitada”.

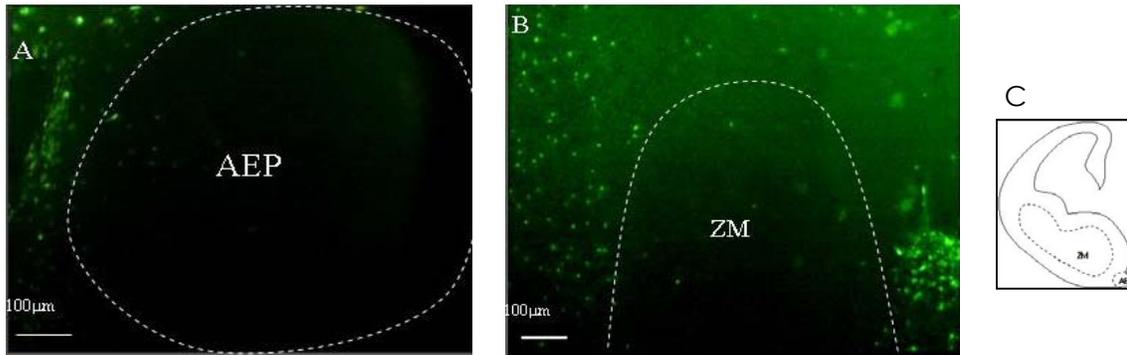


Figura 18: Algumas áreas do telencéfalo ventral são evitadas pelas células migrantes, como a área entopeduncular anterior (A) e a zona do manto das eminências ganglionares (B). Em C, esquema de uma fatia cerebral delimitando as áreas citadas. Barra de escala = 100µm (A e B) AEP = área entopeduncular; ZM = zona do manto.

#### 4.4 Distribuição dos precursores GABAérgicos no eixo látero-medial do córtex cerebral

##### 4.4.1 Interneurônios GABAérgicos originados na EGM migram ao longo de todo o eixo látero-medial do córtex cerebral

Estudos recentes mostraram a existência de diferentes domínios determinados de acordo com a expressão gênica dentro da zona ventricular das eminências ganglionares, o que poderia sugerir que diferentes populações celulares estariam sendo geradas (FLAMES *et al.*, 2007; FOGARTY *et al.*, 2007). Além disso, poder-se-ia pensar em uma determinação prévia dos destinos finais das células originadas nesta região, de acordo com o domínio genético a que pertencessem.

Análises realizadas com explantes homotópicos contínuos após 4DiV mostraram que, independente do sítio de origem dos precursores GABAérgicos dentro da EGM, eles eram capazes de migrar ao longo de todo o plano coronal

cortical, estabelecendo-se tanto em porções mais mediais como em regiões mais laterais (Figuras 19A e B).

O número de células espalhadas ao longo do neocórtex mostrou-se relacionado ao tamanho do explante. Assim, quanto maior o explante introduzido, maior o número de células que o deixam e iniciam a migração (Figuras 19C e D e Tabela 2).

A observação do posicionamento das células migrantes após 4DiV evidenciou um gradiente de concentração celular de lateral para medial, o que poderia se dever ao fato de a fonte de geração de interneurônios ser contínua. Para esclarecer esta questão, foram realizados experimentos de transplantes transitórios conforme previamente descrito, de modo a restringir o período de saída dos precursores dos explantes.

Mesmo com a retirada dos explantes das fatias após 2 DiV, as células ainda eram capazes de se espalhar ao longo do eixo látero-medial do neocórtex, mostrando que este efeito não se devia à geração contínua de precursores nos explantes (Figura 20). O número total de células dispersas no córtex, no entanto, era reduzido (Tabela 2). Também foi possível se observar um gradiente de concentração decrescente látero-medial de células, independente de sua origem na MGE. Nas porções mais laterais observamos uma média de 55,94 células posicionadas lateralmente (n=8), em comparação a uma média de 14,74 células situadas mais medialmente (n=8) para explantes E15 cultivados por 4 dias *in vitro*.

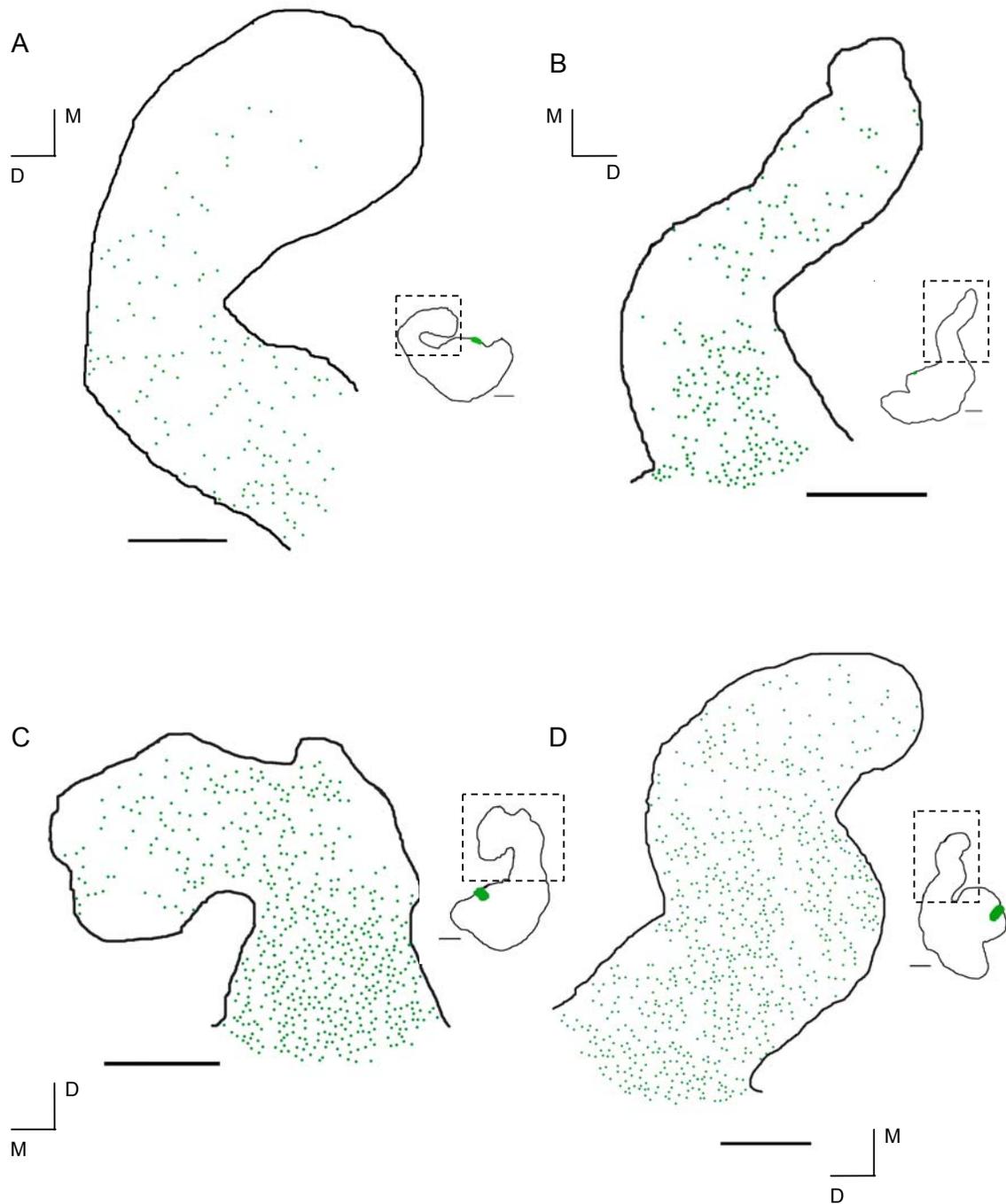


Figura 19: Desenhos de câmara clara mostrando a distribuição no eixo látero-medial do córtex de animais E14, das células provenientes de explantes pequenos (A e B) e grandes (C e D) após 4 DiV. Em menor aumento, desenhos da fatia completa e dos explantes. Barras de escala = 500 $\mu$ m.



Figura 20: Desenho em câmara clara mostrando a persistência do padrão de distribuição difusa das células mesmo com a retirada do explante. No detalhe, desenho de menor magnitude mostrando um esquema da fatia completa. Escalas = 500 $\mu$ m.

	Explantes grandes contínuos (tamanho médio=0,17mm <sup>2</sup> )	Explantes pequenos contínuos (tamanho médio=0,022mm <sup>2</sup> )	Explantes transitórios
Média de células no córtex (cells/mm <sup>2</sup> )	378,17	117,31	26,74
Numero de experimentos	4	8	8

Tabela 2: Média de células dispersas no córtex cerebral, de acordo com o tipo de explante e o tempo de cultivo. Explantes grandes variam entre 0,09 e 0,31mm<sup>2</sup> e explantes pequenos variaram entre 0,01mm<sup>2</sup> e 0,04mm<sup>2</sup>.

#### **4.4.2 O momento de origem do precursor GABAérgico influencia a posição por ele adotada na placa cortical**

Outro fator que poderia influenciar a distribuição celular na placa cortical seria o momento de origem dos precursores. De modo a avaliar esta possibilidade, foram realizados experimentos de duplo transplante de modo a observar a distribuição de duas ondas de migração neuronal diferentes e a relação de organização espacial entre elas.

Nestes ensaios, todos os explantes foram obtidos da porção mais medial da EGM, uma vez que nas idades mais tardias analisadas as eminências medial e lateral já estariam fundidas, o que tornaria inviável a definição de uma porção mais lateral da EGM.

Inicialmente foram realizados explantes homotópicos na idade E15, retirados após 2DiV e substituídos por um segundo explante agora obtido de um animal E17. As fatias eram mantidas por mais 2DiV, após os quais eram fixadas e devidamente analisadas (Figura 21A). Os resultados ficaram mais evidentes quando as fatias eram mantidas em cultura por um maior período (7DiV) (Figura 21B). Neste modelo, as células mais precoces se espalharam mais ao longo do córtex, ocupando principalmente as regiões laterais e intermediárias, enquanto as geradas mais tardiamente atingiam regiões bem mediais.

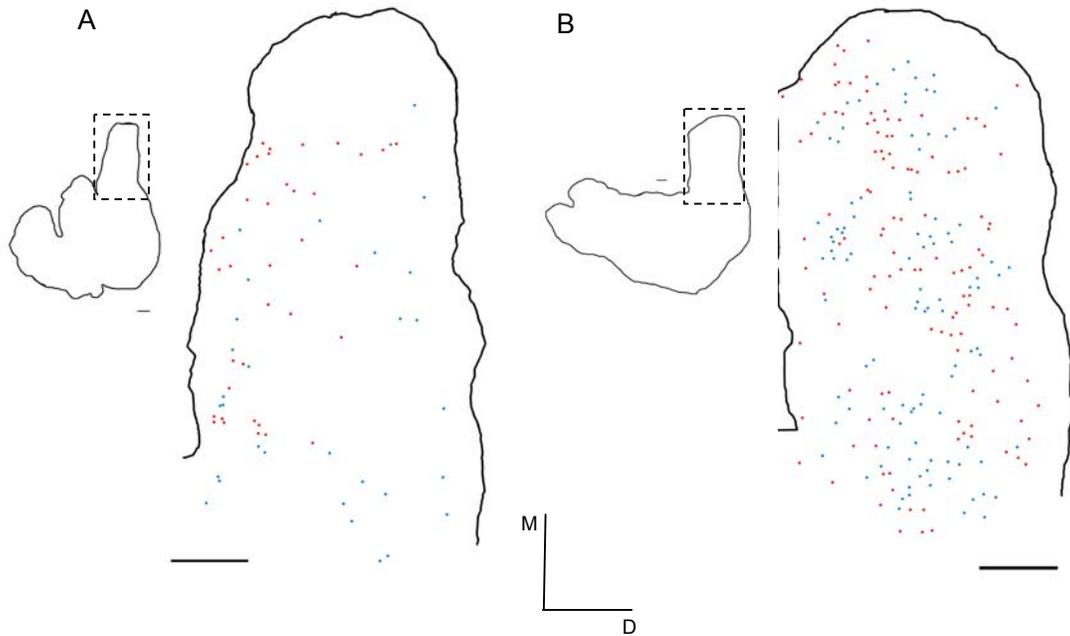


Figura 21: Desenho em câmara clara dos experimentos de transplantes duplos. As células representadas em azul correspondem às originadas no primeiro explante, enquanto aquelas representadas em vermelho correspondem ao segundo. Em menor aumento, esquema das fatias completas. Barras de escala = 500 $\mu$ m.

Apesar de ambas as populações serem capazes de migrar por longas distâncias, a quantificação destes experimentos sugeriu uma preferência das células originadas mais precocemente pelas porções mais laterais (proximais ao ângulo córtico-estriatal) e intermediárias da placa cortical, e daquelas originadas mais tardiamente pelas regiões mais mediais (distais ao ângulo córtico-estriatal). A distância de migração das células nascidas em E15 era dependente do tempo em cultura: quando mantidas por 4 dias, poucas atingiam regiões mais distais (Figura 22A). No entanto, quando cultivadas por 7 dias, observou-se uma tendência destas células a se posicionarem em regiões

intermediárias, apesar de não haver diferença estatística entre as três porções (Figura 22B).

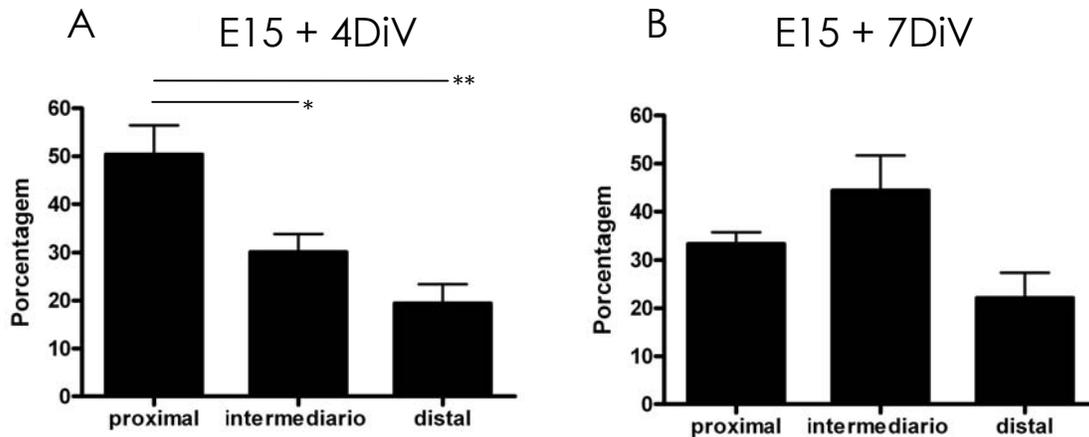


Figura 22: Distribuição percentual no eixo látero-medial das células originadas em E15. (A) Distribuição após 4DiV, (B) após 7DiV. Note que com um maior tempo de cultura, as células deixam de se concentrar nas porções mais proximais ao sulco córtico-estriatal (córtex lateral) e passam a ocupar regiões intermediárias. Proximal, médio e distal se refere à distância a partir do ângulo córtico-estriatal \* corresponde a  $p < 0.01$  e \*\* corresponde a  $p < 0.05$ .

Ao avaliarmos a distribuição das células originadas mais tardiamente (em E17), após 2DiV não houve preferência destas células por nenhuma das três regiões do eixo látero-medial (Figura 23A), entretando, após 5DiV, as mesmas apresentaram uma maior concentração nas porções mais mediais (distais ao ângulo córtico-estriatal; Figura 23B).

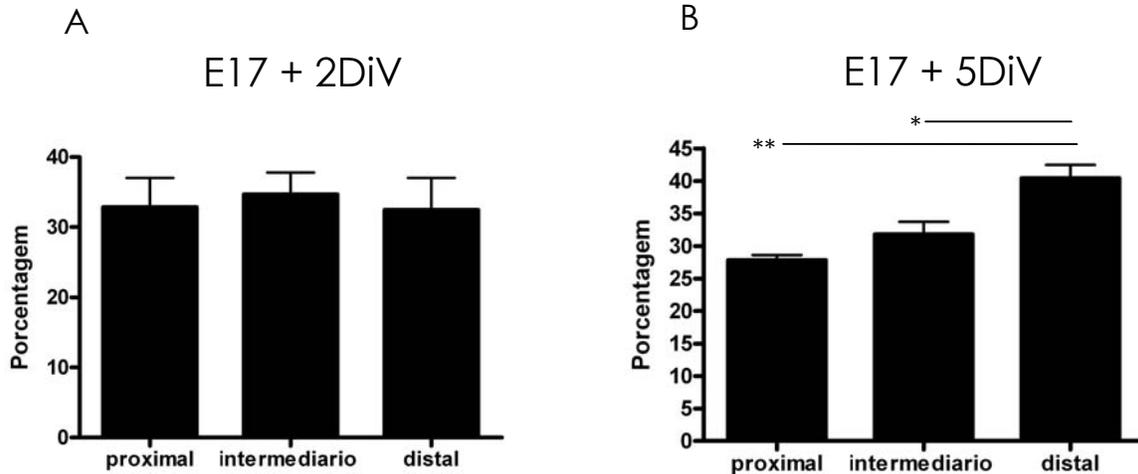


Figura 23: Distribuição percentual látero-medial das células originadas em E17 do neocórtex. (A) as células apresentam uma distribuição homogênea após 2DiV. (B) as células tendem a acumular-se mais medialmente com mais dias em cultura (5DiV). \* corresponde a  $p < 0,05$  e \*\* corresponde a  $p < 0,01$ .

Assim, pode-se inferir que as células originadas em idades mais tardias ultrapassam aquelas mais precocemente geradas e, possivelmente, apresentam uma maior velocidade de migração.

#### 4.5 Interneurônios migram por rotas alternativas inclusive em regiões “não-alvos”

Para avaliar a capacidade de migração destas células ao longo do sistema nervoso central, foram realizados transplantes heterotópicos para diferentes regiões: o neocórtex, alvo das células migrantes, e o tronco encefálico, estrutura usualmente não povoada por estas células.

Os explantes introduzidos no neocórtex originam células que, semelhante ao observado nos experimentos de transplantes homotópicos, se espalham por toda a extensão látero-medial da placa cortical, migrando porém

no sentido oposto, inclusive atingindo o ângulo córtico-estriatal (Figuras 24A e B). O padrão de distribuição se manteve semelhante, independente de se os explantes foram obtidos na região mais lateral ou mais medial da zona ventricular da EGM.

A população GABAérgica do tronco encefálico não é originada nas eminências ganglionares, portanto não é um sítio de migração das células aqui analisadas. Desta forma, o tronco encefálico foi considerado região “não-alvo” de migração, com o objetivo de avaliar a inespecificidade dos precursores GABAérgicos.

Para tal, foram realizados experimentos de transplantes para regiões do tronco encefálico em desenvolvimento. As células mostraram-se capazes de invadir o tecido, entretanto não apresentaram uma distribuição abundante conforme observado anteriormente nos experimentos que envolviam o neocórtex (Figuras 24C e D).

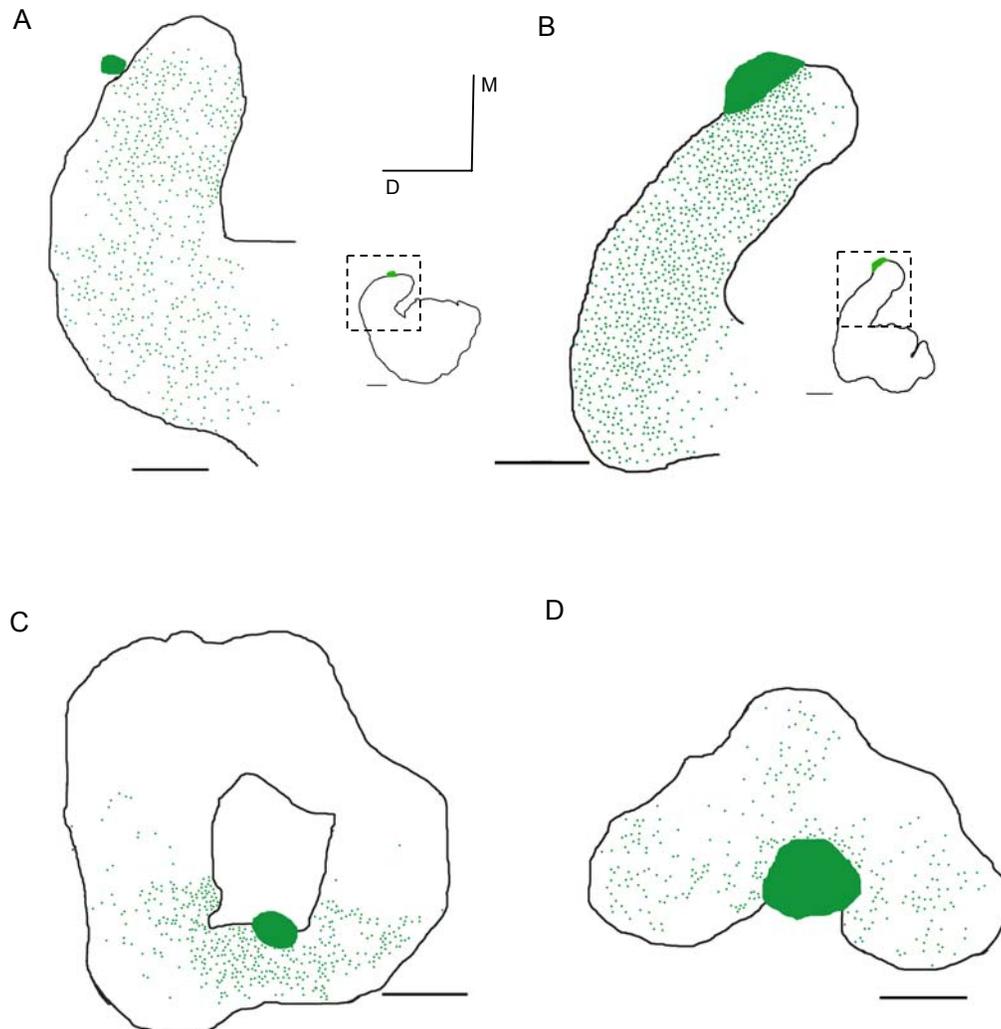


Fig. 24: Desenhos de câmara clara mostrando a distribuição celular quando os explantes são introduzidos heterotopicamente no córtex cerebral ou no tronco encefálico. As células invadem o córtex abundantemente (A e B) e são capazes de penetrar no tronco encefálico (C e D), neste caso porém com uma dispersão mais restrita. A coluna da esquerda representa transplantes mediais enquanto os da esquerda ilustra os laterais, não havendo diferença notável entre elas. Barras de escala = 500 $\mu$ m.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Rotas migratórias *in situ* e *in vitro*

A constatação de que as células GABAérgicas corticais eram provenientes das zonas ventriculares do telencéfalo basal feita pelo grupo de De Carlos (1996) fez com que diversos grupos de pesquisa em neurobiologia do desenvolvimento se voltassem para este tema. Como a migração tangencial ocorre no período embrionário, a maioria dos trabalhos até hoje publicada foi realizada *in vitro*, utilizando por exemplo, técnicas de transplantes de explantes ou de células dissociadas marcadas através de injeção de Dil, bem como provenientes de animais transgênicos para eGFP ( Anderson *et al.*, 2001; Marin *et al.*, 2003), inclusive aqueles a respeito da definição das rotas da migração tangencial. Em nossos experimentos, obtivemos resultados originais sobre a distribuição látero-medial das células, e pudemos evidenciar que as rotas migratórias descritas anteriormente são replicadas aqui, como discutido a seguir.

Logo que os precursores GABAérgicos interrompem seu ciclo celular, começa um processo de migração que faz com que atinjam seus destinos finais nas diversas regiões cerebrais, inclusive o neocórtex.

Diferentes moléculas já foram identificadas como envolvidas neste processo de migração, algumas como fatores motogênicos, por exemplo o fator neurotrófico derivado de cérebro (Brain Derived Neurotrophic Factor – BDNF) e neurotrofina 4, além do fator de crescimento de hepatócitos (Hepatocyte Growth Factor – HGF) (POLLEUX *et al.*, 2002). Outras moléculas sinalizam o caminho que esses precursores devem seguir para alcançar as regiões e camadas corticais adequadas. Na zona ventricular das eminências

ganglionares, onde esta população neuronal é originada, apresenta-se uma conhecida molécula repulsiva, slit-1, que promove a saída dos precursores GABAérgicos desta região (etapa 1, Figura 6) para que iniciem seu deslocamento para seus destinos finais (ZHU *et al.*, 1999; MARIN *et al.*, 2003; ANDREWS *et al.*, 2006). Uma vez tendo deixado a zona proliferativa, os precursores destinados ao córtex precisam adotar rotas paralelas à superfície pial para atingir seus destinos. Assim, ainda no telencéfalo ventral, eles são repelidos da área entopeduncular anterior, que expressa slit e possivelmente outras moléculas repulsoras (MARIN *et al.*, 2003). A seguir, evitam a zona do manto das eminências ganglionares (etapa 2, Figura 6) onde ocorre a expressão de semaforinas 3A e 3F (MARIN *et al.*, 2001). Esta região origina o corpo estriado do adulto, cujas células GABAérgicas também têm origem na zona ventricular das eminências ganglionares, mas presumivelmente são distintas daquelas que seguem ao córtex. Assim, as células que apresentam o receptor de semaforina (neuropilina) não penetram a zona do manto, dirigindo-se às camadas corticais, enquanto aquelas que não expressam o receptor são capazes de penetrar e se estabelecer nessa região (MARIN *et al.*, 2001).

No presente estudo, através da realização de explantes da zona ventricular do telencéfalo ventral, observou-se que as células deixam os explantes, seguindo seu trajeto em direção ao córtex cerebral, conforme descrito acima. Isto sugere que as pistas moleculares necessárias para que assumam esse direcionamento estão presentes e são capazes de influenciar estas células migrantes. Além disso, no modelo aqui utilizado, observamos que as células evitam áreas que conhecidamente expressam moléculas repulsivas, como a zona do manto das eminências ganglionares, principalmente da medial,

e a área entopeduncular anterior. Tais observações contribuem para validar o modelo utilizado.

As células migrantes seguem então em direção ao sulco córtico-estriatal, ultrapassando-o e atingindo o telencéfalo dorsal (etapa 3, Figura 6), o que parece ter envolvimento do neurotransmissor GABA através de seu receptor GABA<sub>A</sub> (CUZON *et al.*, 2006). Desta forma, o neurotransmissor GABA parece ter influência na motilidade de diferentes populações celulares, dependendo da concentração em que esteja presente no meio e do receptor estimulado (BEHAR *et al.*, 1998; LOPEZ-BENDITO, 2003). Observamos que as células originadas mais precocemente parecem se estabelecer em regiões mais laterais pelas quais passam aquelas originadas mais tardiamente até se estabelecer nas porções mais mediais do neocórtex (etapa 4, Figura 6). Isto poderia envolver sinalização por meio de GABA: se as células mais precoces se estabelecem e começam a produzir GABA, este seria um sinal para as próximas continuarem seu processo de migração ao passarem pelas primeiras. Sabe-se que o bloqueio específico de receptores GABAérgicos leva a alterações em diversas etapas da migração como na saída dos interneurônios da zona ventricular (LOPEZ-BENDITO *et al.*, 2003) e na passagem através do sulco córtico-estriatal (CUZON *et al.*, 2006). Desta forma, ensaios semelhantes aos nossos utilizando o bloqueio ou a superestimulação de receptores de GABA poderiam evidenciar alterações neste padrão de migração diferenciado entre as idades.

As células ultrapassam o sulco córtico-estriatal migrando no telencéfalo dorsal a partir de E11,5 por rotas superficiais ao longo da zona marginal, , ou profundas ao longo da zona intermediária a partir de E12,5 (revisto por MARIN

& RUBENSTEIN, 2001). Nosso trabalho mostrou que as células originadas em E14 assumem rotas tangenciais no córtex, superficial ou profundamente ao estriado em desenvolvimento, apresentando seu prolongamento líder orientado paralelamente à superfície pial. Após quatro dias *in vitro*, a análise do telencéfalo dorsal mostrou diversas células migrantes com seu prolongamento líder direcionado radialmente (etapa 5, Figura 6), indicando que estas encontraram seu destino colunar e irão migrar em direção às camadas apropriadas. Alguns autores sugerem que isto se dá através de interações com a glia radial (NADARAJAH & PARNAVELAS, 2002; LOPEZ-BENDITO *et al.*, 2004, YOKOTA *et al.*, 2007).

## **5.2 Fatores determinantes do posicionamento ântero-posterior, látero-medial e radial no córtex cerebral**

- Eixo ântero-posterior

Sabe-se que diferentes regiões do telencéfalo ventral originam interneurônios GABAérgicos. A EGM é a principal fonte destas células para o córtex cerebral, as quais se distribuem ao longo dos principais eixos desta estrutura.

Ang e colaboradores (2003) abordaram a invasão do córtex por precursores de interneurônios utilizando diferentes ensaios experimentais e mostraram que existem diferentes correntes migratórias de acordo com sua orientação ântero-posterior em E11,5. Segundo Tanaka e colaboradores (2006), neurônios GAD67-GFP apresentam uma dispersão não somente látero-medial, mas também ântero-posterior através das zonas marginal e ventricular. No córtex parietal, células GFP, migram distâncias de 400 $\mu$ m durante 1,5 dias após a injeção, e atingem até 800 $\mu$ m no eixo ântero-posterior após 3 dias.

Assim, apesar de parecer existir uma correspondência entre sítio de origem e destino final da célula GABAérgica no eixo ântero-posterior, ocorre também grande dispersão neste eixo.

Nosso estudo tem como foco o eixo látero-medial para a migração destas células, porém observamos que seus prolongamentos líderes assumem diferentes direções. Isto sugere que ocorre migração em outros planos, como no eixo ântero-posterior, que no entanto são mais difíceis de detectar com a técnica utilizada.

- Eixo látero-medial

Marin e colaboradores (2003) sugerem a presença de moléculas repulsoras no telencéfalo ventral e atratoras no telencéfalo dorsal que teriam papel direcionador fundamental para a migração tangencial. Além disso, sugere a presença de moléculas difusíveis produzidas no córtex cerebral em forma de gradiente médio-lateral, o que justificaria a maior concentração celular observada nas porções mediais, em contraste com a presença de células esparsas nas regiões laterais. Esta observação se dá em animais E13,5, mantidos por apenas 48 horas em cultura, e isto pode ter forte influência no resultado, uma vez que estas células ainda não terminaram seu processo de migração. Além disso, neste ensaio os explantes são introduzidos em uma região média do córtex cerebral, ou seja, elas ainda teriam espaço para percorrer no sentido habitual de migração.

Em nosso ensaio experimental de transplantes heterotópicos, nos quais o explante é introduzido nas porções mais distais do córtex, constatamos que as células migrantes são capazes de realizar o caminho inverso e se espalhar

por todo o córtex, não parecendo haver diferença de concentração das mesmas ao longo do eixo látero-medial.

Em 2006, Britto e colaboradores implantaram células da EGM no ventrículo lateral em E12,5, mostrando que as células ultrapassavam a zona ventricular e a maioria se estabelecia no córtex lateral, poucas sendo observadas nas regiões mediais. Através da manipulação da orientação médio-lateral do córtex, mostraram ainda que, dependendo da idade do animal (E12,5 ou E13,5), o córtex medial poderia ser mais atrativo às células migrantes.

O grupo de Marin (FLAMES *et al.*, 2004), mostrou ainda que a expressão de Neuregulina no córtex se dá de forma semelhante, ou seja, inicialmente é mais marcante nas porções laterais, e à medida que os precursores atingem setores mais mediais, a expressão desta molécula se expande de maneira similar.

Rymar & Sadikot (2007) correlacionaram a data de nascimento de interneurônios positivos para calretinina e parvalbumina com sua distribuição médio-lateral e radial no córtex sensorial de ratos adultos. Ao analisarem o córtex destes animais em P35, observaram um gradiente decrescente de concentração médio-lateral das células parvalbumina-positivas, enquanto as células calretinina-positivas apresentavam o padrão inverso. As células parvalbumina-positivas que se estabelecem mais lateralmente são originadas em idades mais precoces (E13-E15) do que aquelas que ocupam o terço medial (E17-E19), o que sugere uma regulação topográfica temporal do posicionamento final destas células.

O presente estudo, através de explantes em E15 e E17, reforça a idéia dos gradientes observados por Britto e colaboradores (2006) e Rymar &

Sadikot (2007), uma vez que observamos uma preferência das células geradas mais precocemente pelas regiões mais laterais, enquanto as geradas mais tardiamente ultrapassam as primeiras e se estabelecem nas regiões mais mediais. Isto pode estar correlacionado à expressão de neuregulina sugerida por Flames e colaboradores (2004), ou a uma modulação pelo GABA liberado pelas células, como propusemos (ver item 5.1). Quanto mais tempo as fatias eram mantidas em cultura, mais mediais eram as posições ocupadas pelas células migrantes originadas em E15, enquanto as originadas em E17 naturalmente tendiam a se posicionar ainda mais medialmente, mesmo somente após dois dias *in vitro*.

- Eixo radial

Desde a década de 1960 já havia sido demonstrado que neurônios de projeção com mesma data de nascimento ocupam a mesma camada neocortical (ANGEVINE & SIDMAN, 1961). Apesar de os interneurônios GABAérgicos serem originados em zonas proliferativas distintas daquela dos neurônios de projeção e, portanto, adotarem rotas migratórias diferentes para atingir as camadas corticais, estas células ocupam a mesma camada que os neurônios originados sincronicamente no telencéfalo dorsal. (FAIREN *et al.*, 1986; ANDERSON *et al.*, 2002; VALCANIS & TAN, 2003). Tal observação pode sugerir uma regulação temporal de pistas moleculares no córtex reconhecidas por ambas populações neuronais que fariam com que os neurônios migrantes ocupassem a posição adequada e que ambas respeitassem o padrão “inside-out” de formação das camadas neocorticais.

Entretanto, estudo com transplantes heterocrônicos realizado por Valcanis & Tan em 2003 mostrou que os precursores GABAérgicos têm sua

camada de destino definida antes mesmo do início da migração. Além disso, os neurônios de projeção podem esperar a chegada dos interneurônios GABAérgicos para iniciar a invasão da placa cortical, e a migração radial destes pode ser guiada também por fibras de glia radial (KRIEGSTEIN & NOCTOR, 2004). De acordo com nossos dados, a localização látero-medial também já seria pré-definida aproximadamente desde o momento de nascimento da célula, visto que aquelas mais precoces se destinam a regiões mais laterais do córtex, enquanto aquelas mais tardias atingem regiões mais mediais.

Tanaka e colaboradores (2003, 2006) mostraram que as células GABAérgicas são capazes de migrar em diversas direções tanto em fatias quanto em montagens planas do córtex. Além disso, o grupo de Rakic (ANG *et al.*, 2003) mostrou, por meio de vídeo-microscopia *in utero*, que as células migram em diversas direções antes de penetrar a placa cortical em formação, onde se estabelecerão como interneurônios GABAérgicos.

De acordo com Hevner e colaboradores (2004), os precursores GABAérgicos, independente do momento de sua origem, migram em direção ao ventrículo a partir da zona marginal e em direção à pia a partir da borda entre a zona intermediária e a zona subventricular, enquanto neurônios de projeção nascidos tardiamente migram somente em direção à pia a partir da zona intermediária para posições definidas na placa cortical.

Pla e colaboradores (2006) investigaram o papel da Relina na migração de interneurônios, tanto na fase de dispersão tangencial como no seu deslocamento radial. Eles mostraram que o número e as rotas de migração durante estágios embrionários em mutantes nocautes para VLDLR/ApoEr2,

*Dab1* e no *reeler*, moléculas a jusante da cascata de sinalização da relina, encontravam-se normais, apesar de haver alteração na alocação dos interneurônios corticais adultos (HEVNER *et al.*, 2004). Além disso, interneurônios corticais deficientes em *Dab1* não apresentaram alterações quando cultivados em um ambiente normal. Estes autores acreditam que, além da sinalização de relina, os interneurônios respondem também à sinalização dos neurônios de projeção à medida que estes se estabelecem no córtex. Isto também deve influenciar no posicionamento laminar correspondente destas duas populações.

Importante ressaltar que as células Cajal-Retzius presentes na camada I durante o desenvolvimento, portanto, mais superficialmente em relação aos interneurônios GABAérgicos, são guiadas a migrar por influência da quimiocina CXCL12 produzida pelas meninges de maneira dependente de seu receptor CXCR4, que influenciam sua dispersão tangencial e permanência na zona marginal. Esta posição estratégica permite que estas células influenciem a distribuição dos neurônios migrantes nas camadas através da produção de relina (BORREL & MARIN, 2006).

### **5.3 Determinação das propriedades neuroquímicas dos interneurônios corticais**

As subpopulações GABAérgicas corticais têm sido foco de diversos estudos nos últimos anos. Os interneurônios corticais podem apresentar diversas propriedades anatômicas, eletrofisiológicas e moleculares. Isto levou à proposição de diferentes classificações destas células, por exemplo quanto à distribuição e aos alvos de seus neuritos; quanto ao seu padrão de disparo (de

disparo rápido, não-piramidais de disparo regular, de disparo irregular ou “gagos”); e quanto às suas características neuroquímicas (co-expressão de parvalbumina, somatostatina, colecistocinina ou calretinina) (MA *et al.*, 2006). Uma vez que não parece haver relação estrita entre subtipos anatômicos e neuroquímicos, torna-se bastante significativo o número de combinações possíveis entre as diferentes características dos interneurônios, o que resulta em um número bastante elevado de subpopulações GABAérgicas que ocuparão o córtex cerebral. Para o bom funcionamento do córtex é necessário, no entanto, que estas células ocupem as camadas corretas e estabeleçam circuitos adequados (DOUGLAS & MARTIN, 2004; MA *et al.*, 2006).

Para as células GABAérgicas que apresentam fenótipos neuroquímicos distintos, de acordo com a proteína ligadora de cálcio que expressam, foi possível rastrear sua data de nascimento e sua camada de destino. Interneurônios que expressam parvalbumina apresentam um gradiente de estabelecimento radial seguindo uma padrão *inside-out*, de maneira similar aos neurônios de projeção (ANGEVINE & SIDMAN, 1961). As células destinadas às camadas V-VI apresentam pico de neurogênese em E16, as que ocuparão a camada IV nascem em E17 e, por fim, no final da gestação aquelas que compõem as camadas mais superficiais (II-III) (RYMAR & SADIKOT, 2007). Em contraste, o mesmo estudo mostrou que as células calretinina-positivas ocupam as camadas corticais da mais superficial para a mais profunda, ou seja, os interneurônios das camadas II-III, IV e V-VI apresentam neurogênese máxima em E16, E17 e E19 respectivamente (RYMAR & SADIKOT, 2007).

De acordo com o proposto pelo grupo de Marin (FLAMES *et al.*, 2007; FOGARTY *et al.*, 2007), o telencéfalo ventral apresenta diferentes nichos

geneticamente determinados onde cada combinação de genes leva à geração de uma população cortical específica. Todos os interneurônios nascem em uma região com expressão de Lhx6. A região mais medial da EGM expressa fortemente Nkx2.1 e contribui com 70-80% das células parvalbumina-positivas e somatostatina-positivas no córtex somatomotor do adulto, confirmando dados prévios (NERY *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2004). A EGM parece ser fonte exclusivamente destas duas subpopulações GABAérgicas. Transplante de fragmentos de regiões conhecidas da EGM *in utero* origina preferencialmente células parvalbumina-positivas ou somatostatina-positivas, que se estabelecem na camada cortical correspondente à sua data de nascimento (FLAMES *et al.*, 2007; FOGARTY *et al.*, 2007). Desta forma, pode-se dizer que existe uma correlação topográfica não somente com a data de nascimento, mas também com o fenótipo celular.

O marcador neuroquímico a ser expresso por determinada célula parece ser definido precocemente entretanto, a expressão do mesmo parece ser detectável somente em idades mais tardias, aparentemente após o nascimento do animal. Cavanagh & Parnavelas (1988) mostraram a presença de interneurônios somatostatina-positivos em P1, no córtex de ratos. Já Xu e colaboradores (2004) em seus experimentos de transplantes de EGM ou neocórtex em E14, introduziam as células no neocórtex de animais P0 e somente após 14-28 dias de cultura conseguiam observar a expressão de seu fenótipo neuroquímico.

Em nosso estudo, tentamos abordar o subtipo neuroquímico das populações neuronais migrantes, entretanto não conseguimos obter marcação

com os anticorpos utilizados, uma vez que as idades analisadas eram muito precoces e, possivelmente, estes fenótipos ainda não estão definidos.

Os dados do presente estudo mostraram que, independente do nicho específico onde os interneurônios GABAérgicos são originados dentro da zona ventricular da EGM, eles se espalham por toda a superfície látero-medial do córtex cerebral, desta forma contribuindo para os circuitos de diferentes áreas corticais. Não foi possível, no entanto, correlacionar a dispersão látero-medial com o subtipo celular GABAérgico.

#### **5.4 Especificação da circuitaria cortical**

O neocórtex adulto é uma estrutura altamente especializada, que apresenta diversas áreas com diferentes características de citoarquitetura, quimioarquitetura e padrões de conexões específicos, o que lhes confere especializações funcionais. Diversos fatores parecem estar envolvidos na especificação das áreas corticais tanto genéticos, como por exemplo genes regulatórios e centros padronizadores, mais explorados nos últimos anos; como epigenéticos, como por exemplo a atividade neural recebida através das fibras aferentes, segundo evidências experimentais (revisto por O'LEARY & NAKAGAWA, 2002).

O córtex adulto apresenta uma organização básica em que a camada IV recebe as aferências de regiões subcorticais e envia as informações para circuitos locais nas camadas adjacentes, supra (II e III) e infragranulares (V e VI). Daí, as informações seguem para outras áreas corticais através das projeções das camadas II e III, ou seguem para regiões subcorticais através das camadas infragranulares possibilitando a execução de comportamentos, ou

a modulação dos inputs recebidos (revisto por THOMSON & BANNISTER, 2003). Para o correto funcionamento deste circuito, é necessário que as células de projeção e de circuitaria local nasçam e migrem de uma forma temporalmente organizada. Este padrão de conexões, bem como o padrão de conexões dos neurônios inibitórios parecem ser conservados ao longo de todo o neocórtex, compreendendo as diferentes áreas neocorticais (DOUGLAS & MARTIN, 2004).

Uma região cortical que vem sendo extensivamente estudada é o córtex somestésico primário de roedores, que inclui a região dos barris, mais especificamente o subcampo pósteromedial, onde se localiza a representação das maiores vibrissas do animal. Esta região apresenta uma organização característica, com as aferências talâmicas chegando à camada IV de maneira ordenada, compreendendo o interior dos barris, enquanto sua parede é formada essencialmente de interneurônios GABAérgicos e, portanto, inibitórios. Isto confere um grande confinamento da informação processada, possibilitando a localização precisa da vibrissa estimulada (revisto por ERZURUMLU & KIND, 2001).

A determinação das áreas corticais com suas características específicas resulta de diferenças temporais e regionais da geração dos precursores que a compõem e das conexões que irão estabelecer, porém sofre influência importante da atividade elétrica que as refina mais tarde (ERZURUMLU & KIND, 2001). Desta forma, foram originadas duas principais linhas de raciocínio: a do predomínio genético e a do predomínio epigenético.

Segundo Rakic (1988), as células originadas no telencéfalo dorsal, ou seja, os neurônios piramidais, sofrem pequena dispersão tangencial na zona

ventricular antes de iniciarem seu processo de migração radial de modo a penetrar a placa cortical. Isto falaria a favor de uma determinação genética de seu posicionamento final. Desta forma, na zona proliferativa haveria uma espécie de modelo, que ele denominou “protomapa” do que seria a placa cortical do adulto.

Entretanto, sabe-se que eventos regressivos como morte celular e eliminação axonal (refinamento de conexões) compreendem uma etapa importante do desenvolvimento do sistema nervoso central e que durante o desenvolvimento, a placa cortical ainda não apresenta as características citoarquitetônicas e conectivas que distinguem as áreas no adulto. Além disso, estudos antigos sugerem a dispersão de progenitores (O’ROURKE *et al.*, 1995) e um estudo recente sugeriu um novo tipo de migração tangencial possivelmente realizado pelos precursores dorsais (BRITANOVA *et al.*, 2006). Isto nos leva então, a uma segunda possibilidade proposta por O’Leary (1989) em que a placa neocortical funcionaria como uma *tabula rasa*, ou seja, seguiria um padrão único ao longo das áreas cerebrais, moldado de acordo com os estímulos recebidos. Tal observação levou à hipótese de um neuroepitélio inicialmente formado por linhagens celulares uniformes que, com o decorrer do desenvolvimento e as interações com estruturas próximas ou distantes, iriam se diferenciando, o que originaria as diferentes áreas cerebrais.

A primeira hipótese nos leva a acreditar que a formação do sistema nervoso segue caminhos absolutos, em que as células e seus circuitos são formados precocemente de forma precisa, menos maleável. A segunda hipótese, alternativamente, abre a possibilidade de que haja uma imprecisão inicial e que só mais tarde com o início da atividade elétrica os circuitos sejam

firmemente estabelecidos. Baseado nisso, Douglas e Martin (2004) sugeriram a existência de circuitos canônicos, que poderiam se adequar a qualquer região, e que seriam funcionais desde que recebessem o “input” adequado. Sendo necessária uma maior precisão para a cadeia funcional ou uma maior diversificação dos “outputs”, não são formados circuitos inteiramente novos, mas há um enriquecimento de um mesmo padrão básico de conexões excitatórias interlaminares (DOUGLAS & MARTIN, 2004).

É necessário, no entanto, levar em conta que os dois principais tipos de neurônios existentes no córtex, de projeção e de circuitaria local, têm não apenas padrões de conexão diferente, mas também origem em diferentes nichos ventriculares.

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, neurônios de projeção são originados no telencéfalo dorsal e iniciam seu processo de migração radial de modo a se posicionar nas camadas corticais adequadas direcionados por pistas moleculares. Uma vez posicionados, poderão então se diferenciar, emitindo seus prolongamentos por longas distâncias e estabelecendo conexões de forma a trocar informações com células próximas a eles ou não. Não somente os neurônios de projeção, mas também aferências, eferências e conexões intrínsecas se organizariam com relação às camadas dentro das áreas corticais (POWELL *et al.*, 1973; POWELL *et al.*, 1981; JONES, 1999) e a forma como os aferentes e eferentes se organizam se daria de maneira similar em todas as áreas corticais (DOUGLAS & MARTIN, 2004).

Os neurônios de projeção compõem a maior parte da população cortical (~80%), porém estabelecem poucas conexões com células vizinhas. Atualmente se sabe que os neurônios piramidais não são determinantes para

circuitos específicos, porém, seus prolongamentos (dendritos e axônios) se ramificam e comunicam com diversos neurônios dentro de uma mesma coluna cortical, embora nem todas estas sinapses sejam de fato funcionais (KALISMAN *et al.*, 2005).

Interneurônios GABAérgicos são caracteristicamente inibitórios, sendo essenciais na manutenção do equilíbrio dos estímulos excitatórios. A população GABAérgica neocortical compreende uma menor parcela da população neuronal total (~20%) e, diferentemente dos neurônios piramidais, não estabelecem conexões com regiões distantes, sendo portanto interneurônios de circuitaria local. Apresentam propriedades anatômicas, eletrofisiológicas e moleculares diversificadas, o que lhes confere uma classificação segundo determinadas características (FREUND & BUZSAKI, 1996; KAWAGUCHI & KUBOTA, 1997; MARKRAM *et al.*, 2004). Uma vez que os circuitos locais são balanceados por estas células, diferenças em suas concentrações ao longo das diferentes camadas corticais são críticas, pois as proporções relativas de sinapses dependem diretamente de sua posição laminar (DOUGLAS & MARTIN, 2004).

Nossas observações podem corroborar a existência de sistemas canônicos como proposto por Douglas & Martin, uma vez que as células migrantes parecem se espalhar de maneira similar ao longo de todo o córtex cerebral, estabelecendo-se em regiões ainda não populadas por elas. Isto sugere um padrão básico de organização ao longo das áreas corticais semelhante ao proposto por Douglas & Martin (2004). No entanto, apesar de os precursores GABAérgicos se espalharem ao longo de todo o eixo látero-medial do córtex em formação, eles não se espalham de maneira tão abundante nas

fatias de tronco encefálico, sendo porém observável certo grau de dispersão a partir dos explantes introduzidos neste local. Isto pode sugerir certo grau de especificidade regional na dispersão da população GABAérgica.

Segundo Bayer & Altman (1987), o córtex cerebral apresenta um gradiente látero-medial de maturação. Nosso estudo sugere que a migração tangencial dos interneurônios corticais segue este padrão de modo temporo-espacial, pois observamos que as células originadas mais precocemente tendem a se estabelecer nas porções mais laterais do córtex cerebral, enquanto aquelas originadas posteriormente ultrapassam as primeiras de forma a se situar nas porções corticais mediais.

## 6 CONCLUSÕES

1- As células migrantes apresentam morfologia bipolar com um prolongamento líder, que dita sua direção de migração, e um prolongamento seguidor. Na idade de E14, a rota de migração através da zona marginal ainda é marcante, com neurônios orientados paralelamente à superfície pial. A seguir, estes se direcionam radialmente de modo a penetrar a placa cortical em formação.

Uma vez tendo penetrado esta, assumem diversas direções até atingirem suas posições finais. Tais dados corroboram dados prévios da literatura e validam o modelo experimental por nós adotado.

2- Os neurônios migrantes, gerados em E14 e E15 se espalham por todo o eixo látero-medial do neocórtex, independente do sítio específico da zona ventricular do telencéfalo ventral onde são originados. O número de células presentes no córtex está diretamente relacionado com o tamanho do explante inserido.

3- Após 4 DiV para as idades E14 e E15, observamos células espalhadas ao longo de toda a superfície cortical, ocupando preferencialmente as regiões mais laterais. Ao aumentarmos o tempo de manutenção das culturas para 7DiV, observamos um maior espalhamento destas células, porém, ainda com preferência pelas porções lateral e intermediária do córtex. Já para a idade E17, após somente 2 DiV, já era possível observar o espalhamento das células, que não somente atingiam as porções mais mediais, mas se estabeleciam mais nesta região. Após 5 DiV, este padrão foi observado mais marcadamente.

- 4- O momento de geração dos interneurônios GABAérgicos parece influenciar seu posicionamento no córtex, uma vez que as células geradas mais precocemente se estabelecem nas porções corticais mais laterais e aquelas geradas mais tardiamente ocupam regiões corticais mais mediais. Possivelmente um fator temporalmente regulado participa deste processo.
- 5- Estes precursores parecem apresentar uma grande inespecificidade migratória, uma vez que são capazes de se deslocar e se espalhar mesmo quando inseridos na porção final do seu trajeto ou, até mesmo em áreas onde usualmente não estão presentes, como no tronco encefálico, apesar de aí a dispersão se dar de maneira menos abundante.

## 7 REFERÊNCIAS

ANDERSON SA, EISENSTADT DD, SHI L & RUBENSTEIN JL (1997) **Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes.** *Science* 278: 474-476

ANDERSON SA, MARIN O, HORN C, JENNINGS K, RUBENSTEIN JL. (2001) **Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences.** *Development*, 128: 353-63.

ANDERSON SA, KAZNOWSKI CE, HORN C, RUBENSTEIN JL, MCCONNELL SK (2002). **Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo.** *Cereb Cortex* 12:702-9.

ANDREWS W, LIAPI A, PLACHEZ C, CAMURRI L, ZHANG J, MORI S, MURAKAMI F, PARNAVELAS JG, SUNDARESAN V, RICHARDS LJ (2006).. **Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain** *Development* 133: 2243-52.

ANDREWS WD, BARBER M, PARNAVELAS JG (2007). **Slit-Robo interactions during cortical development.** *J Anat.*211:188-98.

ANG ES, JR., HAYDAR TF, GLUNCIC V & RAKIC P (2003) **Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex.** *J.Neurosci* 23: 5805-5815.

ANGEVINE JB & SIDMAN RL (1961) **Autoradiography study of cell migrations during histogenesis of cerebral cortex in the mouse.** *Nature* 192: 766-768.

BAGRI A, MARÍN O, PLUMP AS, MAK J, PLEASURE SJ, RUBENSTEIN JL, TESSIER-LAVIGNE M. (2002) **Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain.** *Neuron* 33:233-48.

BAYER SA, ALTMAN J (1987) **Directions in neurogenetic gradients and patterns of anatomical connections in the telencephalon.** *Prog Neurobiol* 29:57-106.

BEHAR TN, SCHAFFNER AE, SCOTT CA, O'CONNELL C & BARKER JL (1998) **Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus.** *J Neurosci.* 18:6378-87.

BORRELL V & MARÍN O (2006) **Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling.** *Nat Neurosci.* 9:1284-93.

BRITANOVA O, ALIFRAGIS P, JUNEK S, JONES K, GRUSS P & TARABYKIN V (2006) **A novel mode of tangential migration of cortical projection neurons.** *Dev.Biol* 298: 299-311.

BRITTO JM, OBATA K, YANAGAWA Y, TAN SS (2006). **Migratory response of interneurons to different regions of the developing neocortex.***Cereb Cortex* 16 Suppl 1:i57-63.

BUTT SJ, FUCCILLO M, NERY S, NOCTOR S, KRIEGSTEIN A, CORBIN JG, FISHELL G. (2005). **The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype.** *Neuron.* 48:591-604.

BYSTRON I, RAKIC P, MOLNAR Z & BLAKEMORE C (2006) **The first neurons of the human cerebral cortex.** *Nat.Neurosci.*, 9: 880-886.

BYSTRON I, BLAKEMORE C, RAKIC P (2008) **Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited.** *Nat. Rev. Neurosci.*, 9: 110-122.

CAVANAGH ME, PARNAVELAS JG (1988) **Development of somatostatin immunoreactive neurons in the rat occipital cortex: a combined immunocytochemical-autoradiographic study.** *J Comp Neurol* 268:1-12.

CAVANAGH ME, PARNAVELAS JG (1990) **Development of neuropeptide Y (NPY) immunoreactive neurons in the rat occipital cortex: a combined immunohistochemical-autoradiographic study.** *J. Comp Neurol.*, 297: 553-563

CAVINESS VS, JR., FILIPEK PA & KENNEDY DN (1989) **Magnetic resonance technology in human brain science: blueprint for a program based upon morphometry.** *Brain Dev* 11: 1-13.

CHAN CH, GODINHO LN, THOMAIDOU D, TAN SS, GULISANO M & PARNAVELAS JG (2001) **Emx1 is a marker for pyramidal neurons of the cerebral cortex.** *Cereb.Cortex* 11: 1191-1198.

COBOS I, CALCAGNOTTO ME, VILAYTHONG AJ, THWIN MT, NOEBELS JL, BARABAN SC & RUBENSTEIN JL (2005) **Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy.** *Nat.Neurosci.* 8: 1059-1068.

CONDIE BG, BAIN G, GOTTLIEB DI & CAPECCHI MR (1997) **Cleft palate in mice with a targeted mutation in the gamma-aminobutyric acid-producing enzyme glutamic acid decarboxylase 67.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 11451-11455.

CORBIN JG, NERY S & FISHELL G (2001) **Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain.** *Nat. Neurosci.*, 4 Suppl:1177-1182.

CUZON VC, YEH PW, CHENG Q. & YEH HH (2006) **Ambient GABA promotes cortical entry of tangentially migrating cells derived from the medial ganglionic eminence.** *Cereb. Cortex* 16:1377-1388.

DE CARLOS JA, LOPEZ-MASCARAQUE L & VALVERDE F (1996) **Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat.** *J. Neurosci.* 16: 6146-6156.

DENAXA M, CHAN CH, SCHACHNER M, PARNAVELAS JG & KARAGOGEOS D (2001) **The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system.** *Development* 128: 4635-4644.

DENAXA M, KYRIAKOPOULOU K, THEODORAKISK, TRICHAS G, VIDAKI M, TAKEDA Y, WATANABE K & KARAGOGEOS D (2005) **The adhesion molecule TAG-1 is required for proper migration of the superficial migratory stream in the medulla but not of cortical interneurons.** *Dev. Biol.* 288: 87-99.

DOUGLAS RJ & MARTIN KA (2004) **Neuronal circuits of the neocortex.** *Annu Rev Neurosci.* 27:419-51

ERZURUMLU RS & KIND PC (2001) **Neural activity: sculptor of 'barrels' in the neocortex.** *Trends Neurosci.* 24:589-95

FAIRÉN A, COBAS A, FONSECA M (1986) **Times of generation of glutamic acid decarboxylase immunoreactive neurons in mouse somatosensory cortex.** *J Comp Neurol.* 251:67-83.

FLAMES N, LONG JE, GARRATT AN, FISCHER TM, GASSMANN M, BIRCHMEIER C, LAI C, RUBENSTEIN JL & MARIN O (2004) **Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1.** *Neuron.* 44: 251-261.

FLAMES N, PLA R, GELMAN DM, RUBENSTEIN JL, PUELLES L & MARÍN O (2007) **Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes.** *J Neurosci.* 27:9682-95.

FOGARTY M, GRIST M, GELMAN D, MARÍN O, PACHNIS V, KESSARIS N (2007) **Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex.** *J Neurosci.* 27:10935-46.

FREUND TF, BUZSÁKI G (1996). **Interneurons of the hippocampus.** *Hippocampus* 6:347-470.

HAMASAKI T, GOTO S, NISHIKAWA S & USHIO Y (2001) **A role of netrin-1 in the formation of the subcortical structure striatum: repulsive action on the migration of late-born striatal neurons.** *J.Neurosci.* 21: 4272-4280.

HAMASAKI T, GOTO S, NISHIKAWA S & USHIO Y. (2001) **Early-generated preplate neurons in the developing telencephalon: inward migration into the developing striatum.** *Cereb.Cortex.* 11: 474-484.

HECK N., KILB W, REIPRICH P, KUBOTA H, FURUKAWA T, FUKUDA A. & LUHMANN HJ (2007) **GABA-A receptors regulate neocortical neuronal migration in vitro and in vivo.** *Cereb.Cortex.* 17: 138-148.

HEVNER RF, DAZA RA, ENGLUND C, KOHTZ J, FINK A. (2004) **Postnatal shifts of interneuron position in the neocortex of normal and reeler mice: evidence for inward radial migration.** *Neuroscience.* 124:605-18.

JACOBSON M (1991) **Developmental neurobiology**, 3<sup>rd</sup> edition, Plenum Pub Corporation.

JONES T (1999) **Present and future capabilities of molecular imaging techniques to understand brain function.** *J Psychopharmacol.* 13:324-9.

KALISMAN N, SILBERBERG G, MARKRAM H. (2005) **The neocortical microcircuit as a tabula rasa.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:880-5.

KAWAGUCHI Y, KUBOTA Y. (1997) **GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex.** *Cereb Cortex.* 7::476-86.

KRIEGSTEIN AR, NOCTOR SC. (2004) **Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex.** *Trends Neurosci.* 27:392-9.

LAMBERT DE RC & GOFFINET AM (2001) **Neuronal migration.** *Mech.Dev.*, 105: 47-56.

LAVDAS AA, GRIGORIOU M, PACHNIS V & PARNAVELAS JG (1999) **The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex.** *J.Neurosci.*, 19: 7881-7888.

LENT,R (2001) **Nascimento, Vida e Morte do Sistema Nervoso.** *Cem Bilhões de Neurônios - Conceitos Fundamentais de Neurociência.* pp. 29-64.

LETINIC K, ZONCU R & RAKIC P (2002) **Origin of GABAergic neurons in the human neocortex.** *Nature.* 417: 645-649.

LOPEZ-BENDITO G, CAUTINAT A, SANCHEZ JA, BIELLE F, FLAMES N, GARRATT AN, TALMAGE DA, ROLE LW, CHARNAY P, MARIN O & GAREL S

- (2006) **Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation.** *Cell*. 125: 127-142.
- LOPEZ-BENDITO G, LUJAN R, SHIGEMOTO R, GANTER P, PAULSEN O & MOLNAR Z (2003) **Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons.** *Cereb.Cortex*. 13: 932-942.
- LOPEZ-BENDITO G, STURGESS K, ERDELYI F, SZABO G, MOLNAR Z & PAULSEN O (2004) **Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical interneurons.** *Cereb.Cortex*. 14: 1122-1133.
- MA Y, HU H, BERREBI AS, MATHERS PH & AGMON A (2006) **Distinct Subtypes of Somatostatin-Containing Neocortical Interneurons Revealed in Transgenic Mice.** *J. Neurosci* 26:5069 –5082.
- MARIN O & RUBENSTEIN JL (2001) **A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon.** *Nat.Rev.Neurosci*. 2: 780-790.
- MARIN O, YARON A, BAGRI A, TESSIER-LAVIGNE M, RUBENSTEIN JL (2001) **Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions.** *Science*. 293: 872-5.
- MARIN O & RUBENSTEIN JL (2003) **Cell migration in the forebrain.** *Annu.Rev.Neurosci*. 26: 441-483.
- MARIN O, PLUMP AS, FLAMES N, SANCHEZ-CAMACHO C, TESSIER-LAVIGNE M & RUBENSTEIN JL (2003) **Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction.** *Development*. 130: 1889-1901.
- MARKRAM H, TOLEDO-RODRIGUEZ M, WANG Y, GUPTA A, SILBERBERG G, WU C. (2004) **Interneurons of the neocortical inhibitory system.** *Nat Rev Neurosci*. 5:793-807.
- MARTIN DL & RIMVALL K (1993) **Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain.** *J.Neurochem*. 60: 395-407.
- METIN C, DENIZOT JP & ROPERT N (2000) **Intermediate zone cells express calcium-permeable AMPA receptors and establish close contact with growing axons.** *J.Neurosci*. 20: 696-708.
- MOYA F & VALDEOLMILLOS M (2004) **Polarized increase of calcium and nucleokinesis in tangentially migrating neurons.** *Cereb.Cortex*. 14: 610-618.
- NADARAJAH B, PARNAVELAS JG. (2002) **Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex.** *Nat Rev Neurosci*. 3:423-32.

NERY S, FISHELL G, CORBIN JG. (2002) **The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations.** *Nat Neurosci.* 5(12):1279-87.

O'LEARY DD (1989) **Do cortical areas emerge from a protocortex?** *Trends Neurosci.* 12:400-6.

O'LEARY DD & NAKAGAWA Y (2002) **Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex.** *Curr.Opin.Neurobiol.* 12: 14-25.

O'ROURKE NA, DAILEY ME, SMITH SJ & MCCONNELL SK (1992) **Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex.** *Science.* 258: 299-302.

O'ROURKE NA, SULLIVAN DP, KAZNOWSKI CE, JACOBS AA & MCCONNELL SK (1995) **Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex.** *Development.* 121: 2165-2176.

O'ROURKE NA, CHENN A & MCCONNELL SK (1997) **Postmitotic neurons migrate tangentially in the cortical ventricular zone.** *Development.* 124: 997-1005.

OKABE M, IKAWA M, KOMINAMI K, NAKANISHI T, NISHIMUNE Y. (1997) **'Green mice' as a source of ubiquitous green cells.** *FEBS Lett.* 407: 313-9.

PLA R, BORRELL V, FLAMES N, MARÍN O. (2006) **Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling.** *J Neurosci.* 26:6924-34.

PLEASURE SJ, ANDERSON S, HEVNER R, BAGRI A, MARIN O, LOWENSTEIN DH & RUBENSTEIN JL (2000) **Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons.** *Neuron.* 28: 727-740.

POLLEUX F, WHITFORD KL, DIJKHUIZEN PA, VITALIS T, GHOSH A. (2002) **Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling.** *Development.* 129:3147-60.

POWELL D, LEEMAN S, TREGEAR GW, NIALI HD, POTTS JT JR. (1973) **Radioimmunoassay for substance P.** *Nat New Biol.* 21;241(112):252-4

POWELL TP, HENDRICKSON AE. (1981) **Similarity in number of neurons through the depth of the cortex in the binocular and monocular parts of area 17 of the monkey.** *Brain Res.* 216:409-13.

- RAKIC P (1971) **Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus.** *J Comp Neurol.* 141:283-312.
- RAKIC P (1972) **Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex.** *J Comp Neurol.* 145:61-83.
- RAKIC P (1974) **Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition.** *Science.* 183:425-427.
- RAKIC (1988) **Specification of cerebral cortical areas.** *Science.* 241: 170-6.
- RAKIC P (1995) **Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92: 11323-11327.
- RYMAR VV, SADIKOT AF (2007) **Laminar fate of cortical GABAergic interneurons is dependent on both birthdate and phenotype.** *J Comp Neurol.* 501:369-80.
- SARNAT HB, FLORES-SARNAT L. (2002) **Role of Cajal-Retzius and subplate neurons in cerebral cortical development.** *Semin Pediatr Neurol* .9:302-8.
- SCHANUEL S (2004) **Expressão de Condroitin Sulfato no Telencéfalo de Embriões de Camundongo: Possível Relação com o Trajeto Migratório dos Precusores GABAérgicos Neocorticais.** Tese de Mestrado – UFRJ, 72 páginas.
- SHEIKH SN & MARTIN DL (1996) **Heteromers of glutamate decarboxylase isoforms occur in rat cerebellum.** *J.Neurochem.* 66: 2082-2090.
- SIDMAN R L & RAKIC P (1973) **Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review.** *Brain Res.* 62:1-35.
- SORIA JM & VALDEOLMILLOS M (2002) **Receptor-activated calcium signals in tangentially migrating cortical cells.** *Cereb.Cortex.* 12: 831-839.
- SORIANO E, DEL RÍO JA. (2005) **The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after.** *Neuron* 46:389-94
- TAMAMAKI N, FUJIMORI KE, TAKAUJI R. (1997) **Origin and Route of Tangentially Migrating Neurons in the Developing Neocortical Intermediate Zone.** *JNeurosci* 17: 8313-8323
- TANAKA DH, MAEKAWA K, YANAGAWA Y, OBATA K,MURAKAMI F. (2006) **Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex.** *Development.* 133:2167-76.

- TANAKA D, NAKAYA Y, YANAGAWA Y, OBATA K & MURAKAMI F (2003) **Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins.** *Development.* 130: 5803-5813.
- THOMSON AM & BANNISTER AP (2003) **Interlaminar connections in the neocortex.** *Cereb Cortex* 13:5-14.
- VALCANIS H, TAN SS. (2003) **Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex.** *J Neurosci.* 23:5113-22.
- WALSH C & CEPKO CL (1988) **Clonally related cortical cells show several migration patterns.** *Science.* 241: 1342-1345.
- WALSH C & CEPKO CL (1993) **Clonal dispersion in proliferative layers of developing cerebral cortex.** *Nature.* 362: 632-635.
- WONDERS CP & ANDERSON SA (2006) **The origin and specification of cortical interneurons.** *Nat Rev Neurosci.* 7:687-96.
- XU Q, COBOS I, DE LA CE, RUBENSTEIN JL & ANDERSON, S.A. (2004) **Origins of cortical interneuron subtypes.** *J. Neurosci.* 24: 2612-2622.
- YOKOTA Y, GASHGHAEI HT, HAN C, WATSON H, CAMPBELL KJ, ANTON ES. (2007) **Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex.** *PLoS ONE.* 2:e794.
- YOZU M, TABATA H, NAKAJIMA K. (2005) **The caudal migratory stream: a novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain.** *J Neurosci.* 25:7268-77.
- ZHOU QP, LE TN, QIU X, SPENCER V, DE MJ, DU G, PLEWS M, FONSECA M, SUN JM, DAVIE JR & EISENSTADT DD (2004) **Identification of a direct Dlx homeodomain target in the developing mouse forebrain and retina by optimization of chromatin immunoprecipitation.** *Nucleic Acids Res.* 32: 884-892.
- ZHU Y, LI H, ZHOU L, WU JY & RAO Y (1999) **Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex.** *Neuron.* 23: 473-485.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)