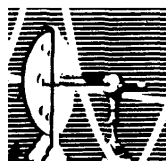


**ANAELLI APARECIDA NOGUEIRA
CAMPOS**

NEURÔNIOS NITRIDÉRGICOS DE S1 DO RATO:
DISTRIBUIÇÃO E MORFOMETRIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Anaelli Aparecida Nogueira Campos

Neurônios Nitridérgicos de S1 do Rato: Distribuição e Morfometria

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Orientador: João Guedes da Franca

Co-orientador: Jean Christophe Houzel

Rio de Janeiro

2008

Nogueira-Campos, Anaelli Aparecida

Neurônios nitridérgicos de S1 do rato: distribuição e morfometria / Anaelli Aparecida Nogueira-Campos. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2008.

xviii, 97 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: João Guedes da Franca e Jean Christophe Houzel.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia, 2008.

Referências bibliográficas: f. 106-115

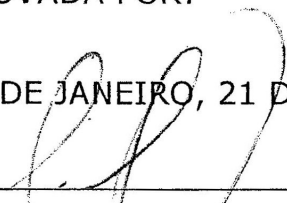
1. Óxido nítrico. 2. Córtex somatossensorial. 3. Neurônios nitridérgicos. 4. Ratos Wistar. 5. Fisiologia – Tese. I. Franca, João Guedes da. II. Houzel, Jean Christophe. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas, Fisiologia. IV. Título.

NEURÔNIOS NITRIDÉRGICOS DE S1 DO RATO:
DISTRIBUIÇÃO E MORFOMETRIA.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)

APROVADA POR:

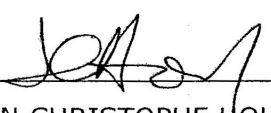
RIO DE JANEIRO, 21 DE MAIO DE 2008.



PROF. CELSO CARUSO NEVES (DOUTOR - UFRJ)
COORDENADOR DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(FISIOLOGIA)




PROF. JOÃO GUEDES DA FRANCA (DOUTOR - UFRJ)
ORIENTADOR



PROF. JEAN CHRISTOPHE HOUZEL (DOUTOR - UFRJ)
CO-ORIENTADOR



PROF. MARIO FIORANI JUNIOR (DOUTOR - UFRJ) - REVISOR



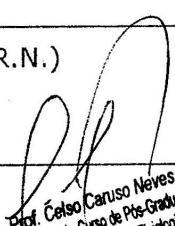
PROF^a DANIELA UZIEL ROZENTAL (DOUTOR - UFRJ)



PROF. MARCO AURELIO DE MOURA FREIRE (DOUTOR - U.F.R.N.)



PROF^a. PATRICIA FRANCA GARDINO (DOUTOR-UFRJ)



Prof. Celso Caruso Neves
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Fisiologia)
Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho
Av. Pasteur, 151 - SAQUE - 11261-100

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia II do Programa de Neurobiologia do Instituto de Biofísica da UFRJ, sob a orientação do Professor João Guedes da Franca e co-orientação do Professor Jean Christophe Houzel, e na vigência de auxílios concedidos pelo Centro de Aperfeiçoamento de Nível Superior (Capes), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) - Bolsa Nota 10 e do Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX).

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”.

Albert Einstein

A toda minha família - meu grande alicerce
e razão de tudo que faço nessa vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar sempre os meus passos e ter guiado o meu caminho para um lugar tão especial.

Ao Prof. João Guedes da Franca, pela oportunidade de me integrar ao Laboratório de Neurobiologia II e desenvolver esse trabalho. Por ter aberto as portas e entendido meus anseios e necessidades, num momento de grande dificuldade. Agradeço imensamente a atenção, a compreensão durante esses anos e por tudo que me ensinou.

Ao Prof. Jean Christophe Houzel pela colaboração e assistência durante todo o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pelo apoio e paciência em todas as etapas.

Aos meus pais, Antonio Campos e Terezinha Eliete, por terem me dado a vida melhor que eu poderia ter... Por serem para mim exemplo de seres humanos e humildade. Por serem meus melhores amigos e por viverem comigo todas as minhas viagens nessa vida. Vocês são os melhores pais do mundo! Amo muito vocês !!!

Aos meus irmãos, Antonielli N Campos e Anderson N Campos pelo carinho e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Por serem amigos e por se fazerem presentes em minha caminhada, apesar dos quilômetros de distância que nos separa. Vocês são muito especiais!

À tia Marly Nogueira, por ter fornecido um apoio maior do que ela mesma possa imaginar. Pelo abrigo, assistência integral e carinho constante. Por ter sido amiga, irmã, mãe e por ter me ensinado grandes valores. Você mora no meu coração!

À Marcelo de Almeida Sales por ser o meu porto seguro! Por compartilhar comigo todos os momentos, e, por além de entender, apoiar e participar das minhas escolhas. Te amo!

À todos amigos do Laboratório de Neurobiologia II pela amizade compartilhada durante esses anos e por proporcionarem um ambiente de trabalho tão maravilhoso.

À Thaise Almeida, aluna de iniciação científica, por ter colaborado nesse estudo.

À Mario Fiorani, pela disponibilidade, pela contribuição na discussão dos dados e pela revisão dessa dissertação.

À José Magalhães e Aureliano Imbiriba pela amizade e apoio na análise de dados.

À todos os colegas do Laboratório de Neuroplasticidade pela receptividade. A Ludmila pelo carinho, e em especial à Carlomagno Pacheco Bahia por ter contribuído no desenvolvimento de parte desse trabalho.

Agradeço aos amigos Wallace, Elaine e Célia que compartilharam de toda essa fase da minha vida. Obrigada pela ajuda na busca incansável pelo laboratório, pela força, carinho, paciência e apoio de sempre.

Toda conquista é proporcionada por grandes pessoas... Afinal, ninguém faz nada sozinho... Por isso, gostaria de agradecer também a todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento deste trabalho e que em um leve esquecimento podem não ter sido mencionadas. Aquelas pessoas que compartilharam de grandes conversas no laboratório e /ou nos corredores do Instituto de Biofísica, das companhias nas idas e vindas para o Fundão e aos amigos que mesmo de longe sempre torceram por mim. Muito obrigada!

RESUMO

Nogueira-Campos, Anaelli Aparecida. Neurônios Nitridérgicos de S1 do rato: distribuição e morfometria. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

No isocórtex, as células estão organizadas em camadas horizontais e módulos colunares, que se estendem da pia-máter à substância branca. No córtex somatossensorial primário (S1), os barris da camada IV definem os limites das unidades colunares funcionais do córtex, responsáveis pelo processamento dos *inputs* periféricos. A histoquímica para NADPH-diaforase (NADPHd) revela a enzima de síntese do óxido nítrico, um mensageiro gasoso envolvido em vários mecanismos fisiológicos e patofisiológicos. No córtex cerebral, a NADPHd está presente numa subpopulação de neurônios corticais, que podem ser caracterizados de acordo com a intensidade de marcação. Estudamos os neurônios do Tipo I cujo corpo celular e árvore dendrítica são fortemente marcados. Além disso, a histoquímica para NADPHd revela a marcação difusa de neurópila, que pode ser usada para identificar camadas e módulos corticais nas áreas sensoriais primárias de diferentes espécies de mamíferos (Franca e Volchan, 1995; Franca *et al.*, 2000; Freire *et al.*, 2004). Nesse estudo, todos os neurônios NADPHd+ do tipo I presentes na área S1 de ratos Wistar adultos foram reconstruídos a partir de secções coronais seriadas de 200 µm reagidas para histoquímica de NADPHd. Os neurônios foram reconstruídos usando uma objetiva de 100x com auxílio do sistema *NeuroLúcida* (MBFBiosciences). Os neurônios marcados (nNADPHd) distribuíram-se aleatoriamente ao longo de S1. Seus dendritos não respeitavam os limites arquitetônicos de barris ou das camadas corticais. Em alguns casos, os dendritos pareciam fazer contatos entre si. A quantificação mostrou que a maioria dos nNADPHd localiza-se nas camadas granulares e infragranulares, mas não houve diferenças entre os compartimentos colunares (barril e septo). Uma análise morfométrica quantitativa revelou que os corpos celulares dessa população neuronal são relativamente esféricos e os da camada IV possuem maior tamanho. O comprimento dendrítico, o número de segmentos e nodos dendríticos e o volume do campo dendrítico foram significativamente maiores para os neurônios localizados nas colunas septais, quando comparados com os neurônios das colunas de barris. A maioria dessas células (54%) apresentou uma árvore dendrítica orientada verticalmente, principalmente nas camadas granulares e infragranulares. Além disso, os neurônios septais possuem arborização mais ramificada e extensa do que os localizados nos barris. Os resultados demonstram que os neurônios nitridérgicos têm morfologia diferente nos diversos compartimentos anátomo-funcionais do córtex de barris.

Palavras-chave: área somatossensorial primária, córtex de barris, óxido nítrico, neurônios do tipo I.

Rio de Janeiro, Maio de 2008.

ABSTRACT

Nogueira-Campos, Anaelli Aparecida. Distribution and Morphometry of Nitridergic Neurons in Rat Area S1. Master course in Biology Science - Physiology. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Cells of the isocortex are organized in layers and columnar modules which axis extend throughout the cortical sheet, from the white matter up to the pial surface. In the primary somatosensory cortex (S1), barrels in layer IV define the boundaries of functional columnar cortical units responsible for processing peripheral inputs. The enzyme NADPH-diaphorase (NADPHd) is responsible for the synthesis of nitric oxide, a gaseous biological messenger that has been implicated in a myriad of physiological and pathological functions. In the cerebral cortex, NADPHd is present in a subpopulation of cortical neurons that might be distinguished according to their labelling intensity. We studied the Type I neurons characterized by densely stained cell bodies and dendritic arbors. In addition, NADPH-d histochemistry stains the neuropil and can therefore be used to reveal the limits of primary sensory areas and cortical modules in different mammalian species (Franca & Volchan, 1995; Franca *et al.*, 2000; Freire *et al.*, 2004). In the present study we reconstructed all Type I NADPHd reactive neurons (nNADPHd) from adult Wistar rat primary somatosensory area. Serial, 200- μ m-thick coronal sections were reacted for NADPHd histochemistry and all neurons were reconstructed with 100x oil-objective using the Neurolucida system (MBFBiosciences). nNADPHd were randomly distributed throughout S1, with dendrites crossing the limits of barrels and cortical layers. In some cases, neighboring NADPH-d cells displayed dendrites in very close apposition, suggesting eventual contacts between them. Quantification analysis indicated that most NADPHd cells were located in granular and infragranular layers, but there were no differences between columnar compartments. Statistical comparison of morphometric parameters between cell groups revealed that most NADPH-d cells had a spherical cell body; layer IV cells displayed the largest soma area. Dendritic length, number of segments, number of nodes and dendritic field volume were significantly larger for dendrites of NADPHd cells located in septal columns as compared to cells located inside barrels. Most dendritic arbors (54%), especially those from granular and infragranular layers, were vertically oriented, and most of those were double-tufted. In addition, septal neurons displayed more ramified dendritic trees. The results demonstrate that nitridergic neurons from the segregated anatomo-funcional compartments of the barrel cortex have distinct morphological features.

Key-words: primary somatosensory area, barrel cortex, nitric oxide, type I neurons.

Rio de Janeiro, May 2008.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Óxido nítrico e suas funções no sistema nervoso	20
1.2 Histoquímica para NADPH-diaforase e a marcação da óxido nítrico sintase	23
1.3 Organização do Córtex Somatossensorial do Rato	26
1.3.1 Os subcampos de barris de S1	27
1.3.2 Barril e septo	29
1.3.3 Circuito vibrissa - córtex de barril	30
1.4 Neurônios NADPH-diaforase positivos do tipo I no córtex cerebral	34
1.4.1 Distribuição e morfologia dos nNADPHd+ do tipo I no córtex de barris	36
2 OBJETIVOS	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Animais	39
3.2 Procedimentos experimentais	39
3.2.1 Perfusão, dissecação e microtomia	39
3.2.2 Processamento histológico	40
3.2.3 Monitoramento da reação, lavagem, desidratação e montagem	41
3.3 Aquisição dos dados	42
3.3.1 Reconstrução tridimensional	42
3.3.2 Quantificação das células totalmente reconstruídas	44
3.3.3 Medida da área dos compartimentos dos campos de barris	44
3.4 Parâmetros morfométricos analisados	47
3.5 Análise estatística dos dados	54
4 RESULTADOS	57
4.1 Considerações técnicas	57

4.2 Avaliação qualitativa da morfologia e distribuição dos neurônios e neurópila NADPH-diaforase positivos	60
4.3 Análise quantitativa da morfologia dos neurônios NADPH-diaforase positivos.....	70
4.3.1 Medidas de áreas dos compartimentos de S1 e de distribuição dos nNADPH-d+ nos campos de barris	71
4.3.2 Avaliação da integralidade dos neurônios NADPH-diaforase positivos reconstruídos	74
4.3.3 Análise estatística dos parâmetros morfométricos	74
4.3.3.1 Morfologia do corpo celular dos neurônios NADPH-diaforase positivos.....	81
4.3.3.2 Morfologia da árvore dendrítica dos neurônios NADPH-diaforase positivos.....	84
4.3.3.3 Orientação da árvore dendrítica dos neurônios NADPH-diaforase positivos.....	86
5 DISCUSSÃO	91
5.1 Considerações metodológicas: avaliação dos casos R0610 e R0703	91
5.2 Distribuição dos neurônios NADPH-diaforase positivos	92
5.3 Análise da morfologia dos neurônios NADPH-diaforase positivos.....	94
5.3.1 Corpo celular	94
5.3.2 Arborização Dendrítica	96
5.3.3 Orientação da árvore dendrítica dos neurônios NADPH-d+ e os circuitos corticais	98
5.4 Os neurônios NADPH-d+ e as possíveis implicações funcionais do ON	102
6 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Córtex somatossensorial primário do rato	28
Figura 2 -	Representação da via de processamento da informação sensorial proveniente das vibrissas para o córtex de barris	31
Figura 3 -	Desenho esquemático do sistema <i>Neurolúcida</i>	43
Figura 4 -	Reconstrução de uma secção coronal na área S1 do córtex do rato, processada para histoquímica que revela a enzima NADPHd	45
Figura 5 -	Forma do corpo celular dos nNADPHd+	47
Figura 6 -	Representação de uma árvore dendrítica com sete ordens	49
Figura 7 -	Representação esquemática da <i>convex hull analysis</i>	50
Figura 8 -	Exemplo da análise setorial de orientação dendrítica (<i>Wedge Analysis</i>)	52
Figura 9 -	Fotomicrografia de cortes coronais ao nível da área S1 do rato, processados para NADPHd	59
Figura 10 -	As árvores dendríticas estendem-se além do compartimento laminar e/ou tangencial do corpo celular de origem e as células supragranulares apresentam dendritos com orientação horizontal	63
Figura 11 -	As células das camadas IV e infragranulares possuem orientação mais vertical	64
Figura 12 -	As células das camadas granular e infragranulares não respeitam os limites	

arquitetônicos de barris e/ou camadas e possuem arborização com orientação mais verticalizada	65
Figura 13 - Os nNADPHd+ parecem apresentar contatos dendríticos	66
Figura 14 - A arborização dendrítica dos neurônios das camadas supragranulares são mais horizontais do que os neurônios das demais camadas	67
Figura 15 - Representação dos nNADPHd+ ao longo de S1	68
Figura 16 - Fotomicrografia de um neurônio NADPHd+ na área S1 do caso R0703	69
Figura 17 - Gráfico de dispersão resultante da análise da função discriminante dos 1360 nNADPHd+ do caso R0610	71
Figura 18 - Área cortical média ocupada pelos compartimentos laminares (a) e colunares (b) de S1 do caso R0610	73
Figura 19 - Densidade (em células por μm^2) laminar (a) e colunar (b) dos nNADPHd+ do Tipo I em secções do hemisfério direito de S1 do rato R0610 (N= 24 secções)	73
Figura 20 - Representação de nNADPHd+ característicos nos diversos compartimentos laminares e colunares de S1	75
Figura 21 - Comparação entre os seis grupos (SB, SS, GB, GS, IB, IS) (A), inter-laminar (B) e inter-colunar (C) da área do corpo celular dos	

	neurônios nitridérgicos no caso R0610	82
Figura 22 -	Comparação inter-laminar (A) e inter-colunar (B) da área do corpo celular dos neurônios nitridérgicos no caso R0703	83
Figura 23 -	Comparação inter-laminar (A) e inter-colunar (B) da forma do corpo celular dos neurônios nNADPHd no caso R0610	84
Figura 24 -	Comparação inter-laminar (A) e inter-colunar (B) da forma do corpo celular dos nNADPHd+ no caso R0703	84
Figura 25 -	Análise das árvores dendríticas dos nNADPHd+ do caso R0610	85
Figura 26 -	Análise das árvores dendríticas dos nNADPHd+ do caso R0703	86
Figura 27 -	Análise da orientação da arborização dendrítica dos nNADPHd+ do caso R0610	87
Figura 28 -	Distribuição dos subtipos de nNADPHd+ em S1 no caso R0610	88
Figura 29 -	Análise laminar da orientação da arborização dendrítica (índice de verticalidade) dos nNADPHd+ do caso R0703	88
Figura 30 -	Índice de direcionalidade das árvores dendríticas dos (743) nNADPHd+ verticais no caso R0610	90
Figura 31 -	Modelo do circuito dos nNADPHd+ observado neste estudo	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Animais e procedimentos experimentais	46
Tabela 2 -	Neurônios NADPHd positivos em S1	53
Tabela 3 -	Subtipos dos neurônios NADPHd positivos verticais	53
Tabela 4 -	Modelo da tabela feita a partir dos dados obtidos pelo <i>Neuroexplorer</i>	56
Tabela 5 -	Resumo dos achados qualitativos	62
Tabela 6 -	Quantificação dos neurônios NADPHd positivos por compartimento	72
Tabela 7 -	Caso R0610: Comparação entre os seis grupos	77
Tabela 8 -	Caso R0610: Comparação entre as camadas corticais	78
Tabela 9 -	Caso R0610: Comparação entre colunas de septo e barril	79
Tabela 10 -	Caso R0703: Comparação entre as camadas corticais	80
Tabela 11 -	Caso R0703: comparação entre colunas de barril e septo	81

LISTA DE ABREVIações

ON	óxido nítrico
ONS	óxido nítrico sintase
ONSe	óxido nítrico sintase endotelial
ONSn	óxido nítrico sintase neuronal
ONSi	óxido nítrico sintase induzida
LTP	potenciação de longa duração
LTD	potenciação de curta duração
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzida
NADPHd	NADPH-diaforase
nNADPHd+	neurônio NADPH-diaforase positivo
NBT	<i>nitro blue tetrazolium</i>
S1	área somatossensorial primária
PMBSF	subcampo de barris póstero-medial
ALBSF	subcampo de barris ântero-lateral
SG	compartimento supragranular
GR	compartimento granular
IG	compartimento infragranular
SB	célula supragranular barril
SS	célula supragranular septo
GB	célula granular barril
GS	célula granular septo
IB	célula infragranular barril
IS	célula infragranular septo

1 INTRODUÇÃO

A função cerebral surge a partir das conexões existentes entre as células nervosas. Tais conexões existem tanto entre estruturas cerebrais distantes, bem como localmente, formando os microcircuitos neurais. No córtex somatossensorial primário, a rede de neurônios é conhecida por formar circuitos funcionais que processam a informação proveniente da periferia sensorial contralateral.

A informação sensorial é codificada ao longo do sistema nervoso central pela ativação de grupos de neurônios específicos. Encontram-se duas classes principais de neurônios no córtex (PETERS & JONES, 1984; DE FELIPE *et al.*, 2002). A primeira corresponde às células piramidais, que representam a maior parte dos neurônios corticais. O glutamato, que na maior parte das vezes é um neurotransmissor excitatório, é expresso por estas células. Com relação à morfologia celular, essa classe de neurônios caracteriza-se pela presença de um dendrito apical dominante que se origina do corpo celular cônico e estende verticalmente em direção à superfície pial, além de dendritos basais. Tais neurônios “piramidais” possuem dendritos predominantemente espinhosos em suas porções distais. A outra classe é a de células não-piramidais, mais heterogênea e contem diversos subtipos morfológicos (JONES, 1975; BUZSÁKI *et al.*, 2004; MONYER & MARKRAM, 2004) que possuem diferentes papéis na fisiologia cortical, podendo ser excitatórias, inibitórias e/ou modulatórias. Neurônios não-piramidais inibitórios usam o ácido gama-amino-butírico (GABA) como neurotransmissor (KUBOTA & KAWAGUCHI, 1994). Esses neurônios não apresentam uma característica morfológica típica e por isso é difícil classificá-los (JONES & HENDRY, 1986). Em geral são definidos em comparação aos neurônios piramidais por não apresentarem um dendrito apical dominante e nem dendritos espinhosos, ou por terem poucas espinhas

dendríticas. FELDMAN & PETERS (1978) sugeriram uma classificação com base no padrão de distribuição dos dendritos e a frequência na qual as espinhas dendríticas aparecem. Assim, com base na forma da árvore dendrítica as células não-piramidais podem ser multipolares (com dendritos originando de qualquer parte do corpo celular e estendendo em todas as direções da célula), em duplo-tufo (apresentam dendritos estendendo dos dois pólos opostos do corpo celular) e bipolares (com dendritos únicos originando do pólo apical e basal do corpo celular).

Um dos tipos de neurônios não-piramidais, GABAérgicos, consiste na população neuronal positiva para a enzima NADPH-diaforase (NADPHd) (KUBOTA & KAWAGUCHI, 1994; YAN & GAREY, 1997). Esses neurônios constituem um dos componentes do microcircuito cortical, que parecem possuir um importante papel no processamento neural, pois além de serem células inibitórias, sintetizam óxido nítrico (ON) - um mensageiro neuronal envolvido em vários processos fisiológicos no sistema nervoso central (BRENMAN & BREDT, 1997; ESTRADA & DEFELIPE, 1998; BISHOP & ANDERSON, 2005; GUIX *et al.*, 2005; FLORENZANO *et al.*, 2008).

1.1 O óxido nítrico e suas funções no sistema nervoso

O sistema nitridérgico é composto por um transmissor não-convencional, ON, o qual constitui uma das moléculas sinalizadoras que apresenta tanto funções autócrinas quanto parácrinas (para revisão ver CALABRESE *et al.*, 2007). Este é um gás altamente difusível, de meia-vida curta (0,5 a 5 segundos), cujo raio de ação abarca cerca de 100 μm (WOOD & GARTHWAITE, 1994).

No sistema nervoso, a síntese do ON é regulada pelo aumento dos níveis citoplasmáticos de íons cálcio, que ativa a nONS (óxido nítrico sintase neuronal) pela ligação com a calmodulina. O aumento do Ca^{++} no citoplasma pode ser desencadeado

pela ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (GARTHWAITE, 1991) ou através de receptores metabotrópicos capazes de promover a síntese intracelular de 1,4,5-inositol trifosfato (IP3) (BEN-ARI *et al.*, 1992) – um segundo mensageiro capaz de mobilizar os depósitos intracelulares de cálcio, aumentando sua concentração citoplasmática. Após ser produzido, um dos principais efeitos do ON tanto no sistema nervoso central quanto no periférico é a ativação da guanilil-ciclase, a enzima citosólica que catalisa a transformação da guanosina trifosfato (GTP) em 3,5'-guanosina-monofosfato-cíclica (GMPc). O GMPc é um segundo-mensageiro intracelular que pode regular o funcionamento da célula nervosa modificando diretamente a permeabilidade da membrana plasmática, ou regulando a atividade da proteína cinase G (PKG) e de fosfodiesterases (PDE). Por meio dessas vias, o ON exerce seu efeito na motilidade da musculatura lisa, na neurotransmissão, neuro-secreção e plasticidade sináptica (KRUMENACKER *et al.*, 2004; CALABRESE *et al.*, 2007).

Dentre as diferentes funções desempenhadas pelo ON no sistema nervoso, uma das mais descritas é o seu efeito no controle do fluxo sanguíneo. Devido à associação existente entre os neurônios nitridérgicos e os vasos sanguíneos, a ativação da nONS leva à vasodilatação e conseqüente aumento do fluxo sanguíneo cerebral. Entretanto, esse efeito sobre o fluxo sanguíneo tende a ser local, pois esses neurônios provocam dilatação dos vasos localizados ao redor do corpo celular e dendritos (região com grande quantidade de ONS), ao mesmo tempo em que limitam esse efeito no espaço, visto que os neurônios ONS-positivos também co-localizam com neuropeptídeo Y (que é potente vasoconstritor) (ESTRADA & DEFELIPE, 1998).

Em nível celular, a sinalização mediada pelo ON parece ser essencial para dois tipos de plasticidade neuronal: potencialização de longa duração (LTP) no hipocampo e depressão de longa duração no cerebelo (SHIBUKI & OKADA, 1991). Nesses modelos, a estimulação neuronal repetida leva a alterações no fortalecimento sináptico. Estudos com camundongos nocaute mostram que os animais que apresentam diminuição da

expressão de eONS (óxido nítrico sintase endotelial) ou de nONS tem LTP normal, mas quando apresentam deficiência simultânea das duas isoformas dessa enzima, há um decréscimo essencial da LTP (SON *et al.*, 1996). O ON tem influência complexa também no processo de regulação da plasticidade sináptica durante o desenvolvimento, pois segundo WU *et al.* (1994), a inibição de ONS previne que axônios retinianos atinjam seu alvo preciso no tecto óptico. Além disso, estudos usando inibidores específicos da ONS e/ou da guanilil-ciclase em fatias de hipocampo e da amígdala demonstraram a inibição da LTP, enquanto ao utilizar um ativador da guanilil-ciclase, observou-se o efeito oposto (BOULTON *et al.*, 1995; CHIEN *et al.*, 2003). Isso demonstra uma modulação mediada pela via ON / guanilil-ciclase no processo de plasticidade. Este tipo de relação já é bem descrita, inclusive envolvendo os mecanismos subjacentes ao processo de consolidação de memória (EDWARDS & RICKARD, 2007).

Entretanto, o ON também pode exercer efeito neurotóxico, quando liberado após a estimulação persistente por aminoácidos excitatórios e/ou através da síntese de iONS (óxido nítrico sintase induzida) provocada por diferentes estímulos, como por exemplo a liberação de endotoxinas ou citocinas. Assim, o ON é uma molécula que pode exercer um papel duplo no organismo, protetor ou tóxico, dependendo de diversos fatores que incluem a isoforma da ONS envolvida, a concentração do ON, o tipo de célula em que é sintetizado, a disponibilidade do substrato L-arginina, a geração do GMPc e o ambiente extra- e intracelular em que ON é produzido (CHRISTOPHERSON & BREDT, 1997; GUIX. *et al.*, 2005; BISHOP & ANDERSON, 2005; CALABRESE *et al.*, 2007;).

Uma das condições nas quais o efeito tóxico do ON tem sido bem descrito consiste nos distúrbios que envolvem o estresse oxidativo, tais como doença de Alzheimer, isquemia, doença de Parkinson, de Huntington, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla. Nesses casos, ocorre produção de espécies de oxigênio reativas e formação de peroxinitrito, que contribui para o dano celular que ocorre nessas doenças

(CHRISTOPHERSON & BREDT, 1997; GUIX. *et al.*, 2005; BISHOP & ANDERSON, 2005; CALABRESE *et al.*, 2007).

Visto que o ON possui papel fundamental em diferentes processos fisiológicos e fisiopatológicos no sistema nervoso, este trabalho visa a melhor apreciação das relações topográficas dos neurônios nitridérgicos com a citoarquitetura do córtex cerebral, usando como modelo o córtex de barris da área somatossensorial primária de ratos.

1.2 Histoquímica para NADPH-diaforase e a marcação da óxido nítrico sintase

A técnica de histoquímica para nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida-diaforase (NADPHd) revela uma óxido nítrico sintase (ONS) em tecido fixado (BREDT *et al.*, 1991).

A ONS consiste em um monômero de 150 KDa que produz o ON pela oxidação do grupo guanina da L-arginina. Nessa reação, elétrons são doados pela NADPH para o domínio redutase da enzima. Esse processo ocorre via carreadores flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) para o domínio oxigenase. Estes interagem com ferro e tetrahidrobiopterina (BH₄) do lado ativo para catalisar a reação do oxigênio com a L-arginina, gerando além de ON, citrulina como produtos finais. O fluxo de elétrons ao longo do domínio redutase requer a presença do complexo cálcio/calmodulina (ALDERTON *et al.*, 2001).

Existem diferentes isoformas da enzima ONS no organismo e todas podem ser identificadas em células e tecidos pela histoquímica para NADPHd. No início da década de 1990 os diferentes tipos de ONS foram identificados e caracterizados (FORSTERMANN *et al.*, 1991; BREDT & SNYDER, 1992; LYONS *et al.*, 1992). As isoformas da ONS foram inicialmente subdivididas em constitutiva (cONS) e induzida

(iONS) (MONCADA *et al.*, 1991). No entanto, essa terminologia tornou-se obsoleta após a evidência de que as isoformas constitutivas podiam ser induzidas em algumas circunstâncias e que a ONS induzida podia ser expressa de forma similar à constitutiva em algumas células (MICHEL & FERON, 1997). Contudo é usada uma classificação adicional com base no tipo de célula onde as diferentes isoformas foram descritas pela primeira vez, e na dependência do aumento dos níveis intracelulares de cálcio para a ativação enzimática completa (NATHAN & XIE, 1994). Assim, de modo geral a ONS é classificada como sendo neuronal (nONS), a primeira isoforma encontrada no tecido neuronal; induzida (iONS) que está presente em muitas células e tecidos; e a endotelial (eONS) encontrada nas células endoteliais vasculares (ALDERTON *et al.*, 2001).

A nONS e a eONS constituem isoformas constitutivas do tecido que são controladas de forma dependente da concentração do complexo cálcio-calmodulina e, dessa forma, a elevação dos níveis de cálcio intracelular é necessária para a produção de ON (FÖRSTERMANN *et al.*, 1991; DAWSON & SNYDER, 1994; ANDREW & MAYER, 1999; LI & POULOS, 2005). Já a iONS consiste em uma isoforma da ONS que está fortemente ligada a calmodulina e produz um fluxo contínuo de ON, independente das oscilações intracelulares de cálcio. É expressa em macrófagos, astrócitos, microglia e outros subtipos celulares mediante a estimulação imunológica ou inflamatória (AKTAN, 2004). Além dessas isoformas, já foi também descrito uma isoforma mitocondrial (mtONS). Esta parece ser uma isoforma de nONS presente na membrana interna da mitocôndria (ELFERING *et al.*, 2002).

No sistema nervoso, a ONS está seletivamente localizada em populações de neurônios lisos distribuídos em todas as camadas do córtex cerebral, no corpo estriado, nas camadas molecular e granular do cerebelo, colículo superior e inferior, giro denteado do hipocampo, na medula espinhal, na glândula pituitária e, na periferia, está altamente concentrada em neurônios do plexo mioentérico do trato intestinal (BREDT *et al.*, 1990).

Estudos de co-localização por meio de uma combinação da imunohistoquímica para ONS e histoquímica para NADPHd demonstraram que, em preparações fixadas do tecido nervoso, os neurônios ONS-positivos marcados pelo processamento imunohistoquímico são idênticos aos neurônios marcados pela histoquímica para NADPHd. Estes achados foram confirmados por hibridização *in situ*, verificando que a sintase do óxido nítrico, juntamente com seu RNA-mensageiro, está presente nas mesmas populações neuronais reativas a NADPHd (BREDT *et al.*, 1991). Essa característica foi evidenciada em todas as regiões do tecido cerebral central e periférico, onde a ONS é encontrada (DAWSON *et al.*, 1991).

No entanto, a reação histoquímica para NADPHd é específica para a marcação da ONS apenas se não houver outras enzimas ativas e que estejam requerendo a NADPH. MATSUMOTO *et al.* (1993) verificou que o protocolo histoquímico para NADPH-d é um método confiável no estudo da distribuição da ONS devido à ação de fixadores, em especial o paraformaldeído, que inativam a grande maioria das diaforases presentes na célula nervosa, mantendo, contudo, a atividade diaforásica da ONS. Para a reação histoquímica, secções de tecido são incubadas em uma solução de reação contendo NADPH como substrato, e um cromógeno amarelado, o nitro blue tetrazolium (NBT), que funciona como o aceptor de elétrons transferidos do NADPH pela diaforase durante a reação histoquímica. Graças à ação da ONS, o NBT é reduzido a diformazan, de coloração azulada. A presença do diformazan no tecido torna-se, desta forma, um indicador de atividade diaforásica.

A utilização da histoquímica para NADPHd, em secções do isocórtex fixado, revela dois tipos distintos de marcação: neurópila e células individualizadas. Pela marcação de células individuais podemos dividir os neurônios em pelo menos dois grupos, distintos entre si quanto à intensidade da marcação e ao tamanho do corpo celular (SANDELL, 1986; AOKI *et al.*, 1993; LÜTH *et al.*, 1994; FRANCA *et al.*, 1997; YAN & GAREY, 1997): os neurônios do tipo I, que são intensamente marcados,

possuem corpos celulares grandes e uma forte marcação da suas arborizações dendríticas. Já os neurônios do tipo II são mais numerosos e fracamente marcados. Possuem corpos celulares pequenos, com pouco ou nenhum prolongamento dendrítico marcado (SANDELL, 1986; LUTH *et al.*, 1994; YAN GAREY, 1997). Segundo VALTSCHANOFF *et al.* (1993) e GABBOTT & BACON (1995), esses neurônios reativos para NADPHd representam cerca de 0,5 a 2 % da população dos neurônios corticais.

A marcação de neurópila consiste em uma distribuição difusa do produto de reação, onde não é possível, através de microscopia óptica, identificar prolongamentos celulares isolados. A identificação da neurópila reativa a NADPHd no córtex permite delimitar as suas diferentes camadas, bem como os diferentes compartimentos (ou módulos) corticais, de maneira semelhante a outros marcadores da atividade metabólica, como a citocromo-oxidase (SANDELL, 1986; FRANCA *et al.*, 1997). Assim, a histoquímica para NADPHd pode ser usada como um marcador para delimitar os barris, os septos e as camadas corticais na área S1 de roedores (FRANCA & VOLCHAN, 1995; FREIRE *et al.*, 2004).

1.3 Organização do córtex somatossensorial do rato

O neocórtex cerebral é caracterizado pela organização em seis camadas, e, em colunas que se estendem da superfície pial para a substância branca, separando efetivamente a representação sensorial periférica em um mosaico de módulos de processamento (MOUNTCASTLE, 1997). No isocórtex do rato, assim como em outros pequenos roedores e em alguns marsupiais, essa organização modular é mais evidente na camada IV da área somatossensorial primária (S1), onde agregados multicelulares

denominados barris estão presentes (RICE, 1995; LAND & ERICKSON, 2005; SANTIAGO *et al.*, 2007).

Nestes roedores, a extensão da camada IV de S1 que possui os agregados celulares formando os barris é denominada campo de barris; e a região cortical que engloba esses campos de barris, em conjunto com as regiões de transição (sem barris) que separa cada um dos campos, constitui o córtex de barris. Embora essa região do córtex apresente os barris, conferindo à mesma um padrão distinto, as regras básicas que governam os padrões do circuito sináptico em outras áreas corticais sensoriais primárias também se aplicam ao córtex de barris. Além disso, dados relacionados ao córtex de barris podem ser utilizados para formular generalizações a respeito do circuito funcional do córtex cerebral como um todo (WOOLSEY & VAN DER LOOS, 1970).

1.3.1 Os subcampos de barris de S1

O arranjo regular característico no córtex de barris representa toda a periferia sensorial contralateral e pode ser dividida em subcampos específicos, representando regiões distintas do corpo, demonstrados na Figura 1 (BENNETT-CLARKE *et al.*, 1997).

O subcampo póstero-medial de barris (PMBSF, *posteromedial barrel subfield*) compreende cerca de 40 - 50 % do campo de barris e é formado por barris grandes que apresentam formas elipsóides quando vistos em secções tangenciais. Este subcampo está organizado em cinco fileiras (designadas pelas letras A - E) e colunas (representadas por números) que reproduzem a disposição espacial das vibrissas do focinho contralateral do animal em uma correspondência de um para um (RICE, 1995). As quatro vibrissas mais posteriores, e seus barris correspondentes, são identificados como *straddlers*, pois não se alinham com nenhuma das cinco fileiras, sendo denominados individualmente pelas letras gregas α , β , γ e δ . (WOOLSEY & VAN DER LOOS, 1970).

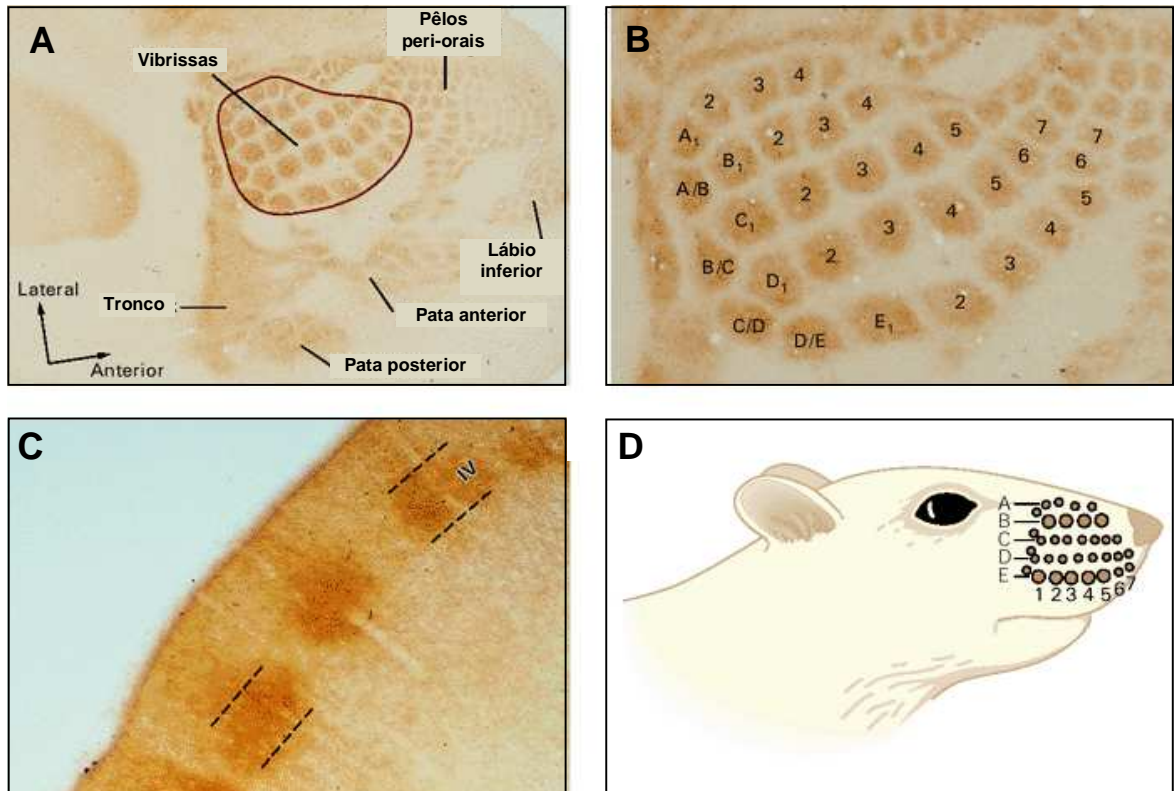


Figura 1. Córtex somatossensorial primário do rato. A) Fotomicrografia de uma secção tangencial da camada IV processada para serotonina. É possível identificar os diferentes subcampos de barris. B) O subcampo pótero-medial de barris (PMBSF), que contém a representação ordenada das vibrissas principais do focinho controlateral. C) Identificação de barris e septo por meio de uma secção coronal feita na mesma região. D) Arranjo topográfico dos barris no córtex corresponde à disposição espacial em fileira e colunas das vibrissas na face do animal. Modificado de Bennett-Clarke et al, Somatosens. Mot. Res. 14(1):27-33, 1997.

VAN DER LOOS & WOOLSEY (1973) demonstraram pela primeira vez essa relação de um para um existente entre vibrissas no focinho e barris no córtex por meio de estudo no qual foi utilizada a técnica de cauterização de uma fileira dos folículos das vibrissas em camundongos recém-natos. O córtex de barris desses animais foi examinado na adolescência e os autores observaram que não houve formação dos barris da fileira contralateral correspondente.

Além do PMBSF, o córtex de barris possui um subcampo denominado “ântero-lateral” ou ALBSF (*anterolateral barrel subfield*), formado por barris pequenos localizados dentro da representação somatotópica dos pêlos dos lábios e da região ao redor da boca do animal (RICE, 1995).

Outros subcampos de barris também são identificados, incluindo os de representação dos membros, tronco, pescoço e mandíbula. Tais subcampos são compostos por barris de tamanhos diversos, que, em secções tangenciais possuem formas circulares ou elipsoidais, nem sempre tão claramente distintos quanto os barris que compõem o PMBSF e o ALBSF (WELKER, 1976, RICE, 1995).

1.3.2 Barril e septo

O exame da citoarquitetura da área S1 utilizando a coloração de Nissl em secções tangenciais do encéfalo de camundongo, rato, esquilo e coelho demonstra que os barris podem ser de três tipos: ocos (formados por uma cavidade central oca, pobre em neurônios, circundada por um anel com alta densidade celular); sólidos (formado por unidades citoarquitetônicas multicelulares, onde a região central é preenchida por corpos celulares e não oca); e, os barris indistintos (que possuem uma alta densidade celular, mas cujo padrão de distribuição não reflete a representação das vibrissas de maneira fidedigna. Os barris ocos são encontrados no córtex somatossensorial primário de ratos e camundongos, os sólidos em ratos, e, os indistintos em esquilos e coelhos (RICE, 1995).

No rato, os barris são ocos no ALBSF do córtex de barris, ao longo de toda a espessura da camada IV, mas na região do PMBSF os barris são ocos apenas na parte mais profunda da camada IV, adjacente à camada V. No restante do PMBSF os barris são sólidos (LAND & SIMONS, 1985).

LAND & ERICKSON (2005) utilizando histoquímica para citocromo-oxidase em cortes do encéfalo de rato jovem e adulto, observaram que os barris “ocos” no PMBSF apresentavam um padrão de marcação não-uniforme e denominaram as subregiões dos barris decorrentes dessa marcação como domínios sub-barris. Esses autores sugeriram que esses domínios sub-barris correspondiam a entidades colunares dentro dos barris desse subcampo. Isso não foi observado nos barris de S1 do camundongo, e nem nos barris “ocos” no ALBSF do rato. Com isso, os autores sugeriram que ao contrário do que ocorre em parte do PMBSF do rato, em S1 do camundongo e no ALBSF dos ratos, os barris deveriam constituir um domínio colunar único.

Outro domínio citoarquitetônico distinto no córtex somatossensorial primário do rato é denominado septo. Este compõe a região entre os barris e caracteriza-se por uma densidade celular mais baixa na camada IV. O septo não é encontrado nas espécies que apresentam barris indistintos, é pequeno entre barris ocos e facilmente visíveis entre os sólidos (RICE, 1995).

1.3.3 Circuito vibrissa – córtex de barril

A via somatossensorial na qual a informação proveniente de cada vibrissa é conduzida ao córtex de barris, é caracterizada por dois circuitos de processamento que são parcialmente segregados (ALLOWAY, 2008). Os folículos pilosos de cada vibrissa possuem mecanorreceptores que transduzem a informação sensorial via axônios aferentes no nervo trigeminal para o núcleo trigeminal do tronco encefálico, principalmente os núcleos principal e espinhal. Os neurônios no núcleo trigeminal principal são organizados somatotopicamente por estruturas denominadas barriletes, onde cada qual recebe *input* de uma vibrissa (VEINANTE & DESCHENES, 1999). Os neurônios desse núcleo projetam para o núcleo ventral posterior medial (VPM) do tálamo, que também é somatotopicamente organizado em unidades anatômicas

chamadas barrilóides. Os axônios dos neurônios em VPM localizados em um barrilóide individual projetam para um barril correspondente em S1. Já os neurônios da subdivisão espinal do complexo trigeminal projeta para o núcleo ventral posterior medial (POm) no tálamo, que então envia as informações proveniente das vibrissas para o córtex de barris, terminando primariamente dentro do septo (VAN DER LOOS, 1976; DIAMOND *et al.*, 1994; KIM & EBNER, 1999; FELDMAN & BRECHT, 2005; LUBKE & FELDMEYER, 2007; ALLOWAY, 2008) (Figura 2).

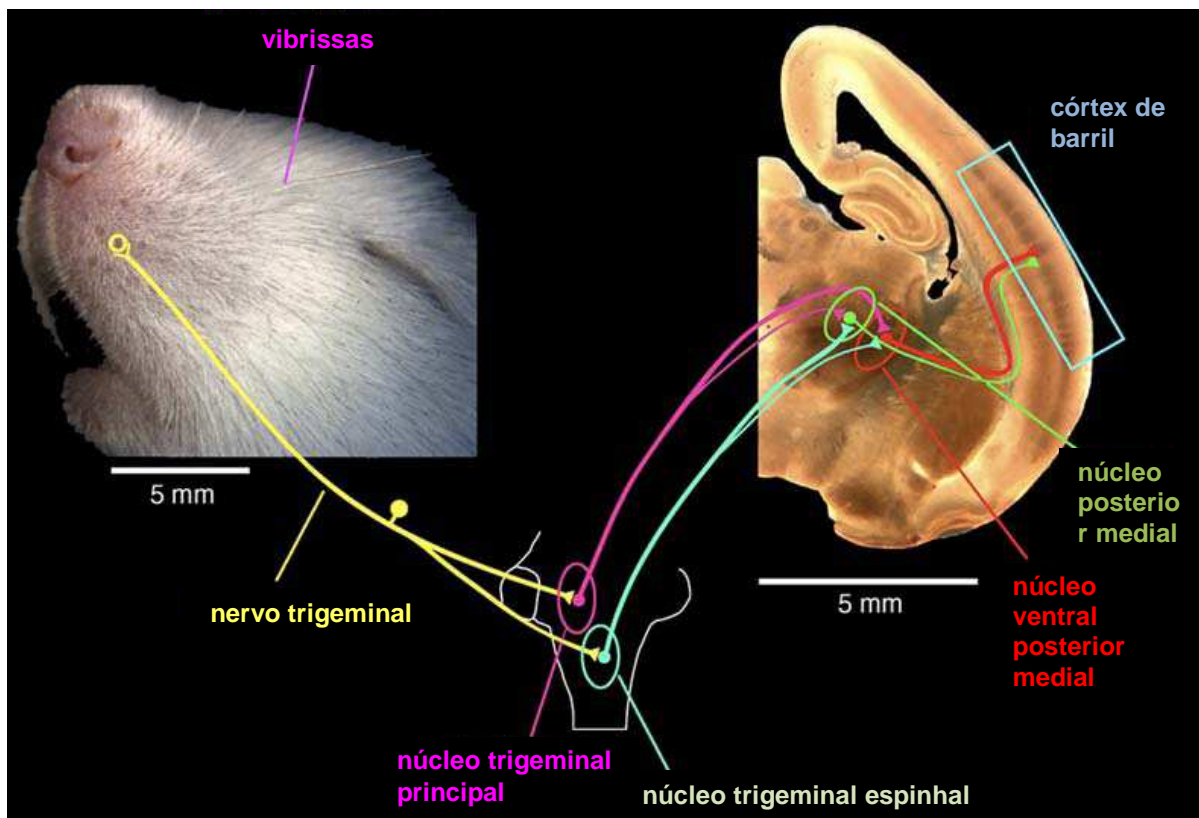


Figura 2. Representação da via de processamento da informação sensorial proveniente das vibrissas para o córtex de barris. (Modificado de Lübke J, Feldmeyer D., *Brain Struct Funct.* ; 212(1):3-17, 2007).

O circuito que está relacionado com a via direcionada para o septo, codifica a cinética dos movimentos das vibrissas e enviam a informação para as regiões do cérebro que regulam o comportamento de movimentação ativa das vibrissas (*whisking*). Já os barris e seus circuitos conectados processam a informação espaço-temporal que codifica o contato das vibrissas com os objetos no ambiente externo (ALLOWAY, 2008).

Contudo, a informação processada por ambos os circuitos deve ser integrada para permitir a orientação do animal no espaço, o reconhecimento de objetos e outros comportamentos relacionados. Essas vias possuem algumas conexões entre si: a via leminiscal que fornece *inputs* predominantemente para os barris na camada IV envia também projeções secundárias que terminam nas camadas II, Vb e VI, que estão na mesma coluna vertical do barril. Já a via paraleminiscal, que consiste nas projeções que terminam na região de septo da camada IV, envia projeções secundárias que terminam nas camadas II e III da coluna de septo e nas camadas I e Va de ambas as colunas, septo e barril (ALLOWAY, 2008).

Além disso, a segregação parcial dessas vias foi retratada em alguns estudos. SIMONS & WOOLSEY (1984) demonstraram que o corpo celular e os dendritos proximais dos neurônios espinhosos septais da camada IV estão localizados na região inervada por P_{Om}, enquanto seus dendritos distais estendem aos barris, que são inervados por VPM. De fato, conexões monossinápticas funcionais entre neurônios de VPM e septais foram descritas (BRUNO & SIMONS, 2002; BRUNO & SAKMANN, 2006). Foram também demonstradas conexões sinápticas entre neurônios espinhosos da camada IV e células piramidais da camada Va e conexões intralaminares entre as células na camada V (FELDMEYER *et al.*, 2005; BRUNO & SAKMANN, 2006, FRICK *et al.*, 2007).

Sendo assim, essa via de processamento apresenta duas características que a torna um modelo experimental altamente interessante para o estudo da organização cortical, pois possui uma representação isomórfica em todas as estações de

processamento e consiste em duas vias parcialmente segregadas compostas pelos circuitos de barris e de septos.

Estudos recentes que associam técnicas de registro intracelular com reconstruções morfológicas no córtex de barris revelam parte da organização neuronal fina desse circuito (SARID *et al.*, 2007). SCHUBERT *et al.* (2003) avaliaram as duas principais classes morfológicas de neurônios excitatórios envolvidos no processamento do sinal sensorial na camada IV. Esse grupo verificou que as células estreladas espinhosas recebem monossinápticamente sinais excitatórios e inibitórios que originam de neurônios localizados em um mesmo barril, enquanto células piramidais, ao contrário das primeiras, recebem *inputs* excitatórios de diferentes camadas e de barris vizinhos, e os *inputs* inibitórios de neurônios localizados nos mesmos barris. Isto sugere que as células estreladas espinhosas atuam no processamento local, dentro de um único barril e as piramidais globalmente, ou seja, integrando a informação horizontal e *top-down* dentro de uma ou mais colunas funcionais.

LÜBKE *et al.* (2003) demonstraram que diferentes pares formados por neurônios espinhosos da camada IV e células piramidais das camadas supragranulares II e III conectados monossinápticamente apresentam seu campo de projeção axonal e o dendrítico confinadas a um mesmo barril, ou seja, estão restritas nas colunas de barril. Entretanto os axônios das células piramidais das camadas II e III têm um campo de projeção vertical que se estende ao longo de todas as camadas corticais, e um campo de projeção horizontal restrito as camadas supragranulares. Dessa forma, nessas camadas supragranulares o fluxo de sinal excitatório no neocórtex pode ser intracolunar ou transcolunar. Outros trabalhos mostraram que os neurônios dentro do córtex de barris têm conexões locais e interações que variam sistematicamente com sua posição laminar e colunar (SCHUBERT *et al.*, 2003; FELDMEYER *et al.*, 2005, 2006; SHEPHERD & SVOBODA, 2005; SCHUBERT *et al.*, 2006).

Entretanto, estudos que objetivaram a relação entre esse circuito e os neurônios nitridérgicos ainda são raros (ver item 1.4 a seguir). Com isso, o entendimento do padrão de distribuição e da morfologia desses neurônios dentro de todo o córtex somatossensorial pode trazer informações acerca de como tais células participam do circuito de processamento da informação somestésica, fornecendo também pistas quanto ao papel funcional do ON.

1.4 Neurônios NADPH-diaforase positivos do tipo I no córtex cerebral

Na literatura, a primeira avaliação da morfologia e o padrão de distribuição laminar dos neurônios NADPH-diaforase positivos (nNADPHd+) do tipo I foi realizada de forma qualitativa. Tais estudos indicavam que, no córtex cerebral, os neurônios nitridérgicos se distribuíam de forma uniforme. Por exemplo, KUCHIWA *et al.* (1994) realizou um estudo restrito à borda de transição entre a substância branca e cinzenta do córtex do gato, encontrando um padrão de distribuição uniforme dos nNADPHd+. EGBERONGBE *et al.* (1994) demonstrou, no córtex humano, e HASHIKAWA *et al.* (1994) no córtex de macacos, que a distribuição dos nNADPHd+ é similar ao longo de todas as regiões corticais. Segundo YAN & GAREY (1997) não há diferença na distribuição dos nNADPHd+ entre as áreas corticais localizadas na metade anterior ao sulco central do córtex de diferentes espécies de mamíferos.

No entanto, ao realizarem uma abordagem quantitativa da distribuição espacial dos nNADPHd+ no córtex do gambá, VOLCHAN & FRANCA (1994) demonstraram que na verdade o padrão de distribuição dos neurônios nitridérgicos não é uniforme. Em secções tangenciais, estes autores verificaram que os neurônios do tipo I estão mais concentrados na metade anterior do que na metade posterior do córtex; e, no eixo médio-lateral, o número de neurônios é maior na metade lateral da superfície cortical.

Ao avaliar o córtex no plano coronal, esses autores observaram que a maioria dos nNADPHd+ está localizada na substância cinzenta. Mais tarde, esse mesmo grupo realizou estudos adicionais caracterizando a distribuição espacial dos nNADPHd+ no córtex de outras espécies de mamíferos além do gambá (FRANCA *et al.* 2000). Neste trabalho, o padrão de distribuição dos nNADPHd+ no neocórtex de quatro espécies de mamíferos (*Ratus norvegicus*, *Callitrix jacchus*, *Monodelphis domestica* e *Didelphis aurita*) foi avaliado, visando não só a comparação entre as espécies, mas também uma análise entre as áreas sensoriais primárias visual e somatossensorial. Este estudo revelou que, em todos os animais estudados, a densidade celular na área somatossensorial primária foi significativamente maior do que na visual, demonstrando mais uma vez que os neurônios do tipo I não são distribuídos de forma uniforme no isocórtex. Na avaliação da distribuição laminar foi observado que o número de neurônios tende a aumentar das camadas mais superficiais para as profundas da substância cinzenta no *Didelphis aurita*; no rato as camadas infragranulares e supragranulares têm densidade maior que a camada IV; e todas as espécies estudadas têm o maior número de neurônios do tipo I localizados na substância branca.

WIENCKEN & CASAGRANDE (2000) analisaram a distribuição dos neurônios NADPH/ONS positivos em relação aos compartimentos funcionais das áreas V1 e V2 do córtex visual de primatas e no núcleo geniculado lateral (NGL). Semelhante à FRANCA *et al.* (1997), esse estudo revelou que as células marcadas distribuem-se uniformemente entre os compartimentos *blob* (grupo de células centrada em uma coluna de dominância ocular) e *interblob* (região entre o *blob*) de V1. Quanto à distribuição laminar, a maior parte das células concentra-se na substância branca, abaixo da camada VI, tanto em V1 quanto em V2. Na substância cinzenta, no entanto, a distribuição é diferente: em V1 há poucas células do tipo I nas camadas I ou IV, enquanto que em V2, a camada IV tende a apresentar mais células reativas.

Diferentes grupos têm se dedicado ao estudo da distribuição dos neurônios nitridérgicos em diversas áreas do córtex cerebral. BARONE & KENNEDY (2000) demonstraram que não existe uniformidade na distribuição dos nNADPH-d ao analisar seis áreas diferentes do córtex de macaco adulto (área visuais primária e secundária, sulco temporal superior, córtex auditivo, área 4 e 6).

Segundo GARBOSSA *et al.* (2005) no córtex cerebral humano, ao avaliar três áreas (área 11 do córtex frontal, área 22 do córtex temporal, e área 17 / 18 do córtex occipital), o número de nNADPHd+ é maior nas camadas infragranulares, mas ao analisar as camadas supra- e infragranulares, a densidade é maior no córtex frontal e menor no temporal evidenciando assim que existe uma diferença clara relacionada com essas áreas quanto ao padrão de distribuição desses neurônios.

1.4.1 Distribuição e morfologia dos nNADPHd+ do tipo I no córtex de barris

A distribuição dos nNADPHd+ no córtex de barris do rato foi descrita por VALTSCHANOFF *et al.* (1993), FRANCA & VOLCHAN (1995) e FREIRE *et al.* (2004). Tais autores demonstraram que essas células possuem um padrão de distribuição característico, concentrando-se nas regiões de septos. FREIRE *et al.* (2004) realizaram seu estudo na região de PMBSF do campo de barris de ratos em desenvolvimento e descreveram que, ao longo de todas as idades avaliadas (de 10 dias a 90 dias pós-natal), o número de células NADPH/ONS positivas foi sempre maior na região de septo do que nos barris. Esses autores avaliaram também a distribuição laminar dessas células e demonstraram uma maior concentração ao redor do limite da camada VI com a substância branca.

FREIRE *et al.* (2005) realizaram um outro estudo envolvendo a caracterização do padrão de distribuição dos nNADPHd+. Nesse trabalho, além da análise qualitativa da distribuição laminar e colunar desses neurônios, avaliaram parâmetros morfométricos,

tais como: área de corpo celular, medida do campo dendrítico e dimensão fractal. Um dos objetivos foi avaliar a morfologia da arborização dendrítica dos nNADPHd+ localizados nos barris e septos da região de PMBSF de S1 do camundongo adulto. Esses autores evidenciaram mais uma vez uma diferença significativa entre essas duas regiões, com os neurônios septais tendo uma arborização dendrítica maior em relação aos neurônios intrabarris. A partir disso, sugeriram que tais diferenças morfométricas encontradas entre os neurônios da camada IV corroboram evidências prévias (KIM & EBNER, 1999) para a existência de duas vias paralelas para o processamento da informação tátil, uma passando ao longo do septo e a outra do barril (ver item 1.1.4). A distribuição laminar e colunar dos nNADPHd+ em S1 é similar à descrição feita para o rato (FREIRE *et al.*, 2004). No entanto, a análise da distribuição e morfologia de todos os nNADPHd do tipo I presentes na área S1, incluindo todos os subcampos de barris, ainda não foi realizado, e, constitui o principal objetivo deste estudo.

O conhecimento da organização estrutural, incluindo a descrição da estrutura laminar, da morfologia neuronal fina, assim como a distribuição de enzimas e outros marcadores ao longo dos eixos horizontal e vertical do córtex podem contribuir para o entendimento de parte do papel do encéfalo no processamento da informação que chega até ele. Nesse sentido, a literatura disponível sobre a topografia dos neurônios nitridérgicos pode ser resumida em estudos da distribuição dos corpos celulares em diferentes áreas corticais e espécies de mamíferos. Além disso, no que se refere ao córtex somatossensorial de roedores, os estudos que incluíram a análise da morfologia desses neurônios restringiram-se apenas à camada IV, em especial à região do PMBSF. O presente trabalho visou analisar a morfologia fina de uma subpopulação de neurônios não-piramidais, os nNADPHd+, em toda a área S1 e não apenas do PMBSF, usando para isso cortes coronais que permitiam a identificação das camadas corticais bem como dos barris individuais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar qualitativa e quantitativamente a morfologia dos neurônios nitridérgicos da área S1 de ratos adultos, verificando qual a relação desta com o padrão de arranjo arquitetônico laminar e modular característico dessa área cortical.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a morfologia de todos os nNADPHd+ do tipo I de S1 do rato, por meio da quantificação de parâmetros morfométricos relacionados ao corpo celular e à arborização dendrítica.

2. Caracterizar o padrão de distribuição dos nNADPHd+ do tipo I ao longo de todo o campo de barris, incluindo os compartimentos colunares e laminares, ou seja, barris/septos e camadas corticais, que foram previamente definidos pela reatividade histoquímica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Nesse estudo foram utilizados 12 ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) adultos machos (Tabela 1).

Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pela Comissão de Avaliação do uso de Animais em Pesquisa do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - IBCCF (Protocolo n.º 029).

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Perfusão, dissecação e microtomia

Os animais eram profundamente anestesiados com inalação de éter, e, após a verificação da ausência de reflexos dolorosos, foram submetidos ao procedimento de perfusão. O animal era mantido em decúbito dorsal num aparato próprio; o esterno era pinçado, e com o auxílio de uma tesoura realizava-se uma ampla toracotomia, seguida da secção do pericárdio e exposição do músculo cardíaco. A seguir, uma injeção intraventricular de 5000 U.I. de heparina sódica (Liquemine, ROCHE) era aplicada para evitar a coagulação sanguínea. Uma cânula era inserida no ventrículo esquerdo e, com auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex Pump Controller), era passada uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (300 ml), seguida por paraformaldeído a 2 % ou 4 % (300 a 400 ml), em tampão fosfato 0,1 M. Procedia-se então a retirada do encéfalo da caixa craniana. Este era colocado em uma matriz de acrílico milimetrado (Adult Rat

Brain Matrix - RBMA-300C), onde era possível seccioná-lo no tamanho desejado. De acordo com o atlas estereotáxico do rato (ZILLES, 1995) o lobo parietal possui uma extensão rostro-caudal de aproximadamente 8 mm. Após a secção, o bloco preparado tinha cerca de 13 mm.

Com o auxílio de um vibrátomo (Pelco 101 Internacional, Série 1000), o encéfalo era seccionado no plano coronal em cortes seriados de 200 μm de espessura. O plano coronal permite a visualização das camadas e áreas corticais, e cortes mais espessos facilitam a reconstrução tridimensional, pois minimiza o número de cortes a serem alinhados, assim como a secção das arborizações dendríticas.

Todos os cortes eram recolhidos em tampão fosfato 0,1 M. Porém em alguns casos, problemas relacionados à microtomia resultaram em perda de cortes (Tabela 1). Em seguida, os cortes eram processados para revelar a enzima NADPHd.

3.2.2 Processamento histológico

Existem pelo menos dois protocolos histoquímicos que podem revelar a NADPHd, o direto e o indireto (modificados a partir de SCHERER-SINGLER *et al.*, 1983). Como o padrão de marcação obtido com os dois protocolos é idêntico (SANDELL, 1986; FRANCA *et al.*, 2000), escolhemos o método indireto, por ser economicamente mais vantajoso.

O método “indireto” da enzima málica, utiliza o NADP como substrato que será inicialmente reduzido a NADPH, por enzimas do próprio tecido, antes de funcionar como doador de elétrons. O protocolo consiste na incubação em uma solução de Tris 0,1 M (pH = 8,0) com 0,6 % de D-L-ácido málico, 0,03 % de nitroblue tetrazolium, 1 % de dimetil-sulfóxido, 0,03 % de cloreto de manganês, 0,1 % de β -NADP e 1 % de triton X-100 (SANDELL, 1986).

Os cortes coronais eram lavados três vezes durante 10 minutos em solução de tampão Tris 0,1 M (pH = 8,0) para retirar o excesso de fixador e, a seguir, incubadas na solução acima sob agitação suave e constante e ao abrigo da luz, em uma estufa mantida a 37 °C.

3.2.3 Monitoramento da reação, lavagem, desidratação e montagem

A evolução da reação era avaliada a cada 20 minutos, através da observação microscópica da aparição de corpos celulares de neurônios reativos, e de detalhes da sua morfologia fina, como dendritos secundários e terciários.

Geralmente, a marcação atingia uma intensidade ideal em 2 a 6 horas. Os principais critérios para a interrupção da incubação era o aparecimento dos prolongamentos dendríticos de forma geral, e da marcação da neurópila, que permite identificar os barris na camada IV. No entanto, mesmo com um constante monitoramento da reação, em alguns casos a neurópila ficava muito reativa, o que dificultava a delimitação de S1, dos campos de barris e a identificação dos dendritos terminais, impossibilitando assim o procedimento de reconstrução. Em alguns casos obtivemos um padrão de marcação heterogêneo onde parte dos cortes ficava com a neurópila bem reativa, enquanto outras partes do mesmo corte simplesmente não marcavam, e, com isso uma reconstrução completa não podia ser feita (Tabela 1).

Após a incubação, os cortes eram submetidos novamente a três lavagens de 10 minutos em tampão Tris 0,1 M (pH = 8,0) e montados sobre lâminas gelatinizadas com auxílio de um papel milimetrado para padronizar a orientação dos cortes. Este era um cuidado importante, pois facilitava o alinhamento dos cortes consecutivos, que constitui um passo essencial no processo de reconstrução tridimensional. No dia seguinte, após a secagem ao ar livre, os cortes eram desidratados com álcool etílico em concentrações crescentes (70 %, 80 %, e 90 % por 2 minutos, 100 % I por 5 minutos e em 100 % II por

10 minutos em cada solução), seguidas de xileno (I e II também por 5 minutos cada), sendo posteriormente cobertas com lamínula, usando-se como meio de montagem Entellan (MERK).

3.3 AQUISIÇÃO DOS DADOS

3.3.1 Reconstrução tridimensional

As preparações histológicas eram analisadas em microscopia óptica, e, as que apresentavam neurônios aparentando uma marcação dendrítica completa no córtex de barris eram selecionadas para a reconstrução tridimensional. Logo, foi realizada a reconstrução total de S1 no caso em que foi encontrada uma boa marcação de neurópila e todas as secções do tecido foram mantidas; e reconstrução parcial nos casos em que houve perda de algumas secções durante o processamento histológico (Tabela 1).

A reconstrução foi realizada com o auxílio do sistema *NeuroLúcida 6.0* (*MicroBrightField Inc.*, USA), que consiste em um *software* integrado a um microscópio com platina motorizada, o qual facilita a aquisição de dados tridimensionais em microscopia óptica ou eletrônica, permite reconstruções de estruturas anatômicas ou neuronais e fornece dados morfométricos quantitativos sobre as estruturas reconstruídas.

O *design* no qual se baseia o sistema de morfometria 3-D é o *Image Combining Computer Microscope* (ICCM), que associa o *software* à instrumentação microscópica para gerar imagens sobrepostas, com controle preciso dos movimentos de uma platina nos eixos *x*, *y* e *z*. Além do controlador da platina (*stage controller*), um captador adicional de alta precisão permite um controle muito fino do foco do microscópio que fornece a informação de profundidade (Figura 3; GLASER & GLASER, 1990).

A grande vantagem desse sistema é permitir a fusão da imagem da preparação histológica com o desenho que está sendo feito, podendo para isso usar diferentes objetivas. Assim, os contornos dos cortes eram feitos usando um aumento de 5x; os corpos celulares eram plotados com aumento de 10x, e a reconstrução da árvore dendrítica com a objetiva de imersão de 100x.

Todos os nNADPHd+ do tipo I localizados em toda a extensão de S1 puderam ser reconstruídos, englobando dessa forma os neurônios de todas as camadas corticais, bem como os neurônios localizados nas colunas de barril e septo.

Depois que todos os neurônios foram reconstruídos através do sistema *Neurolúcida*, o software *Neuroexplorer* foi utilizado para fornecer os dados quantitativos referentes a cada parâmetro morfométrico estudado (a seguir no item 3.4), que eram exportados para o programa *Excel (Microsoft)* e submetidos à análise estatística.

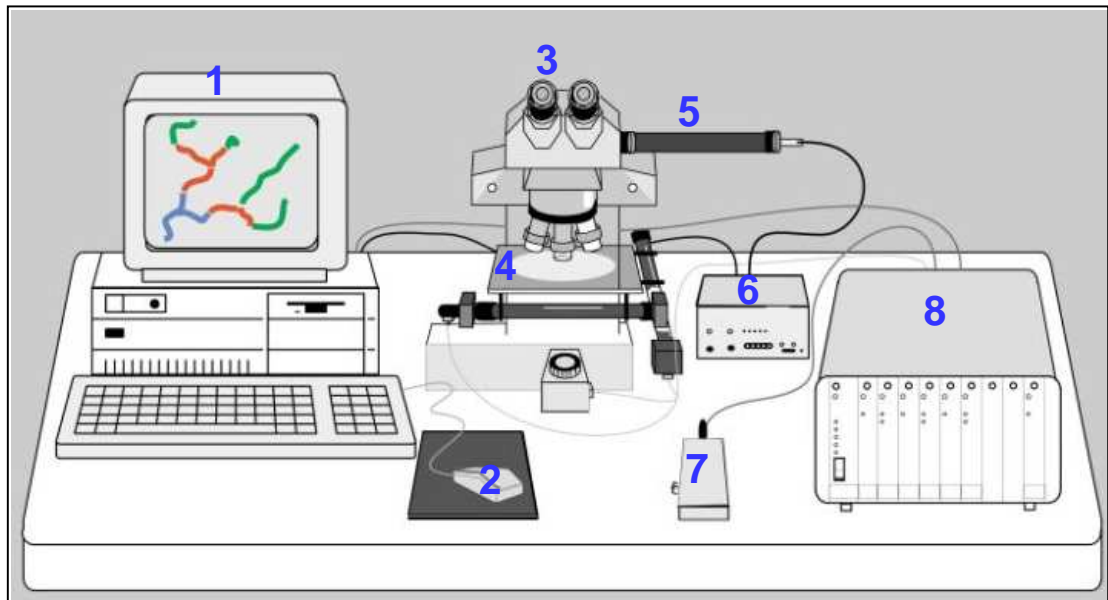


Figura 3. Desenho esquemático do sistema *Neurolúcida*. 1: computador; 2: mouse; 3: microscópio *Nikon Optiphot*; 4: platina motorizada nos três eixos; 5: micromonitor CRT (lucivid); 6: separador de feixe de vídeo (beam splitter); 7: joystick; 8: controlador da platina motorizada MAC5000.

3.3.2 Quantificação das células totalmente reconstruídas

Foi criado, no sistema *Neurolúcida*, um arquivo com os desenhos de todos os cortes, salvo em formato *ASCII* e exportado para o programa *Matlab 6.5 (MathWorks)*, onde desenvolvemos rotinas para análise da porcentagem de células que foram reconstruídas em sua totalidade.

3.3.3 Medida da área dos compartimentos dos campos de barris

As reconstruções, incluindo os contornos dos cortes e neurônios, eram visualizadas no *software Neuroexplorer*. Reconstruções de cortes individuais eram exportadas no formato *DXF* para o programa *Canvas X (ACD Systems)*, o qual permitia o processamento final dos desenhos, e salvar os mesmos como imagens no formato *TIFF*. Tais arquivos podiam ser analisados no programa *ImaqVision 6.0 (National Instruments)* para o cálculo da área dos compartimentos de S1 definidos arquitetonicamente. Ou seja, os compartimentos laminares: supragranular (SG), englobando a região das camadas supragranulares na extensão do campo de barris; granular (GR), englobando a região da camada IV que apresenta barris; e, infragranular (IG), englobando a região das camadas infragranulares na extensão do campo de barris. Além desses compartimentos, foram definidos os compartimentos colunares: a) coluna de barril, incluindo toda a extensão vertical do córtex no volume definido pela projeção de cada barril visualizado na camada IV, dorsalmente até a superfície pial, e ventralmente até a substância branca; b) a coluna de septo, correspondendo às regiões corticais entre as colunas de barris (Figura 4), incluindo todas as regiões entre os subcampos de barris, também através de toda a extensão radial do córtex. Essa divisão da área S1 em compartimentos laminares e colunares foi usada para subdividir as

células reconstruídas, de acordo com a localização de seus corpos celulares (ver item 3.5).

A medição da área das diferentes regiões era feita a partir de um contorno geral de cada um dos compartimentos, dos barris na camada IV e do contorno da região correspondente dos mesmos, projetada nas camadas supra- e infragranulares. A medida da área septal era obtida a partir da diferença entre a área total e a área ocupada pelos barris. Tais medidas foram usadas para calcular a densidade celular em cada um desses compartimentos.

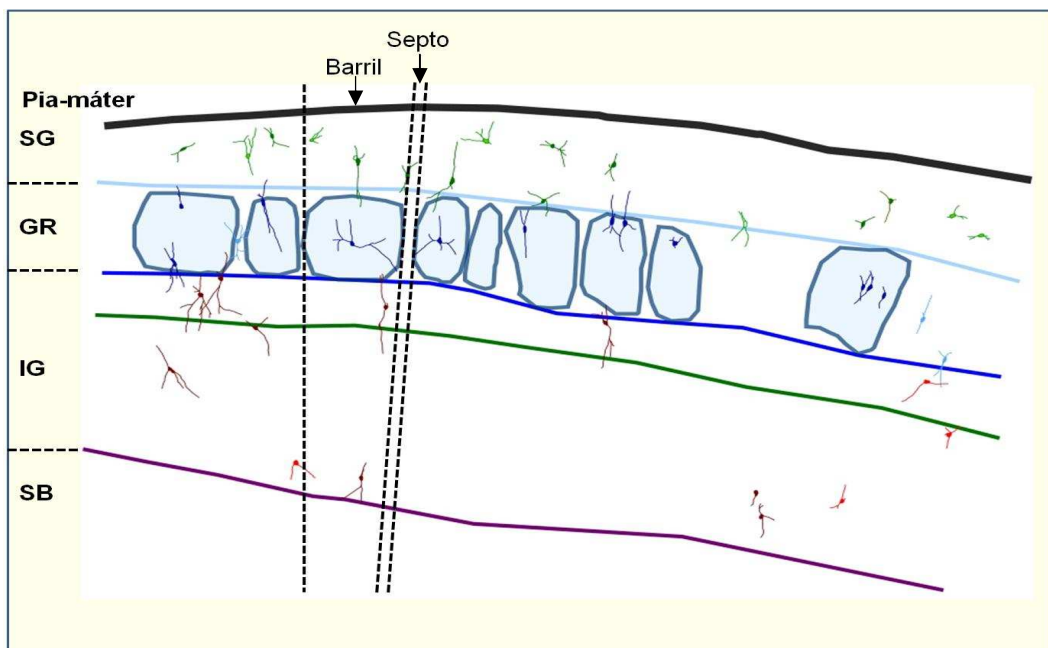


Figura 4. Reconstrução de uma secção coronal na área S1 do córtex do rato, processada para histoquímica que revela a enzima NADPHd. Com base na marcação diferencial das camadas corticais, foram delimitados os seguintes compartimentos: supragranular (SG); granular (GR); e infragranular (IG). Usando a referência dos barris, dividimos os seguintes compartimentos colunares: barris e septos. (SB, substância branca). Linhas pontilhadas: separação de uma coluna de barril e septo.

TABELA 1 - ANIMAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Animal	Plano de Corte	Microtomia	Histoquímica para NADPHd	Reconstrução Tridimensional
R0607	HD -parassagital HE - tangencial	Todos os cortes recolhidos	Neurópila muito reativa	Não
R0608	HD -parassagital HE - tangencial	Perda de cortes	Neurópila muito reativa	Não
R0609	HD - parassagital HE - tangencial	Perda de cortes	Neurópila muito reativa	Não
R0610	Coronal	Todos os cortes recolhidos	Bom padrão de neurópila	Total
R0612	Coronal	Todos os cortes recolhidos	Neurópila muito reativa	Não
R0613	Coronal	Todos os cortes recolhidos	Neurópila muito reativa	Não
R0614	HD - parassagital HE - tangencial	Todos os cortes recolhidos	Alguns cortes não reagiram	Não
R0615	HD - parassagital HE - tangencial	Todos os cortes recolhidos	Alguns cortes não reagiram	Não
R0617	Coronal	Perda de cortes	Neurópila muito reativa	Não
R0702	Coronal	Perda de cortes	Marcação heterogênea	Não
R0703	Coronal	Perda de cortes	Marcação heterogênea	Parcial
R0704	Coronal	Perda de cortes	Marcação heterogênea	Parcial

3.4 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS ANALISADOS

Além da sua distribuição cortical, os nNADPHd+ foram analisados quanto a sua morfologia por meio da avaliação dos seguintes parâmetros morfométricos (NEUROLUCIDA - users guide, 2004):

A) Quanto ao corpo celular:

A área foi obtida por meio da fórmula: $a = \frac{1}{2} \left| (x_0y_n - x_ny_0) + \sum_{l=1}^{n-1} (x_{l-1}y_l - x_ly_{l+1}) \right|$.

Assim, a área (a) é calculada determinando as coordenadas de cada ponto ao redor do contorno do corpo celular e somando a área contida dentro desse contorno.

A forma ou *form factor* ($4 \sqrt{a} / \text{perímetro}^2$) do corpo celular era expresso por valores numéricos que variavam de 0 a 1, sendo que quando o valor se aproximava de 0, era um indicativo de que o corpo celular era menos esférico, e quanto mais próximo de 1, seria o oposto (Figura 5).

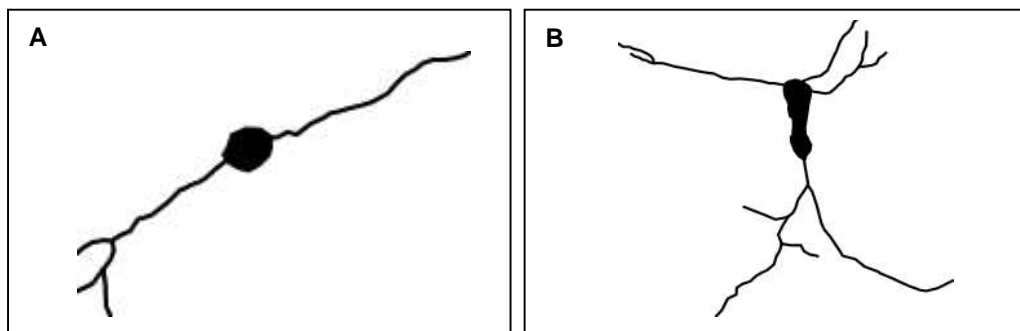


FIGURA 5. Forma do corpo celular dos nNADPHd+. A) célula com corpo celular bem esférico (*form factor* = 0,92); e, B) menos esférico (*form factor* = 0,46). A espessura dendrítica relativa não foi mantida nesta representação.

B) Quanto à arborização dendrítica (Figura 6)

- Comprimento dendrítico: corresponde ao somatório do comprimento de todos os segmentos da árvore dendrítica.

- Volume dendrítico: refere-se à medida do calibre de toda a árvore dendrítica. O volume dos dendritos é registrado ao longo de todo o procedimento de reconstrução, onde em cada passo do desenho o calibre é medido de forma bem cuidadosa.

- Número de dendritos de primeira ordem: soma total dos dendritos de primeira ordem de cada nNADPHd+.

- Número de nodos: somatório dos nodos de cada nNADPHd+, que retrata o grau de ramificação dendrítica.

- Número de segmentos dendríticos totais: refere-se à soma de todos os segmentos da árvore dendrítica, incluindo assim dendritos primários, secundários, terciários entre outros.

- Análise fractal:

É uma das medidas usada para quantificar a arborização dendrítica neuronal e descrever como um neurônio preenche por completo seu campo dendrítico. Existem três métodos para o cálculo dessa análise: *cumulative-mass*, *coastline measurement* e *box counting* (CASERTA *et al.*, 1995). Esse último é o método fornecido pelo *Neuroexplorer*.

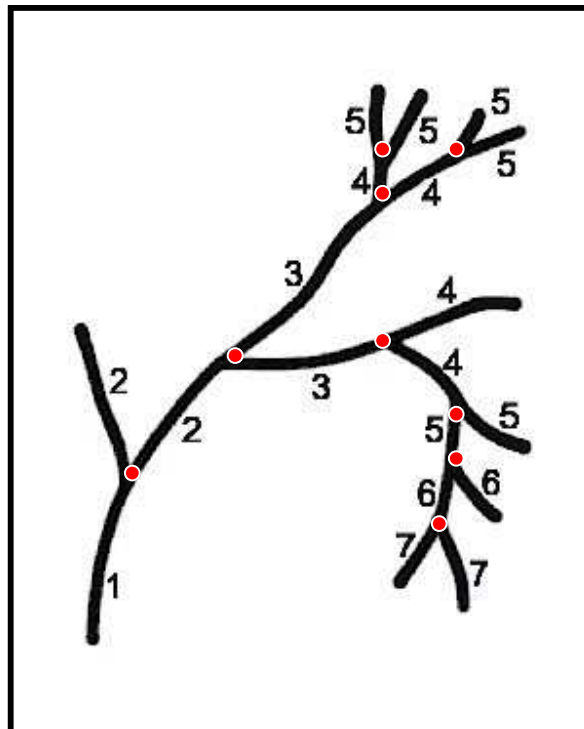


FIGURA 6. Representação de um dendrito com sete ordens. Tomando essa representação como um modelo, é possível verificar o procedimento de medida de comprimento dendrítico, onde é preciso somar o comprimento de todos os dendritos (1 a 7); o número de dendritos de primeira ordem, que nesse caso é apenas um; número de segmentos dendríticos totais, refere a soma de todos os segmentos da árvore dendrítica, que nesse exemplo, é igual a 19; número de nodos, corresponde ao somatório de todos os pontos onde ocorre ramificações dendríticas (esse exemplo tem 9 nodos). Bolas vermelhas: nodos.

- Medida do campo dendrítico: *convex hull analysis*

Essa análise permite o cálculo da área e / ou volume de campo dendrítico de um neurônio. É uma medida importante, visto que células com campo dendrítico maior podem potencialmente integrar *inputs* numa porção maior do parênquima cortical (Figura 7). Essa medida também é fornecida pelo *Neuroexplorer*.

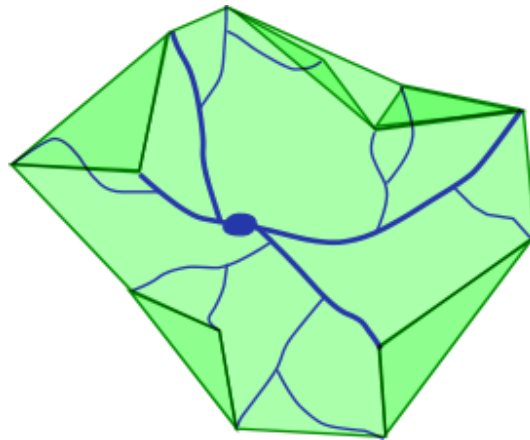


FIGURA 7. Representação esquemática da *convex hull analysis*. Todos os dendritos terminais são ligados de forma a criar o menor polígono convexo possível. A medida do campo dendrítico corresponde ao volume dessa estrutura sólida, ocupando um dado espaço físico.

C) Quanto à orientação da arborização dendrítica: análise setorial de orientação dendrítica (*wedge analysis*).

Além dos parâmetros já descritos foi também utilizada a análise setorial de orientação dendrítica, a qual permite avaliar a distribuição dos dendritos em um espaço definido arbitrariamente por um ponto fixo e direção (GOLDSTEIN *et al.*, 1993). Nessa análise, o ponto fixo era centrado no corpo celular e o eixo principal era orientado verticalmente para a pia-máter. Para essa medida eram utilizados oito setores, dos quais podia ser extraído o comprimento dendrítico (Figura 8).

Com base nessa análise foram criados dois índices, o de verticalidade e de direcionalidade. O índice de verticalidade $[(DL_1 + DL_4 + DL_5 + DL_8) / \sum DL_{(1-8)}]$ consiste na razão entre o somatório dos valores dos comprimentos dendríticos (DL: *dendritic length*) dos quatro setores adjacentes ao eixo vertical principal e o comprimento dendrítico total (nos oitos setores, ver Figura 8). Os valores obtidos foram transferidos

para uma tabela no programa *Excel*, convertidos em valores percentuais, e os neurônios foram classificados como demonstrado na Tabela 2.

Essa análise foi de suma importância para este estudo, pois possibilitou a identificação objetiva da direção para a qual esses neurônios estavam orientados, ou seja, se essas células apresentavam uma distribuição mais horizontal, vertical ou mais circular.

O índice de direcionalidade $[(DL_1 + DL_8) - (DL_4 + DL_5) / (DL_1 + DL_4 + DL_5 + DL_8)]$ foi criado com o objetivo de quantificar a direção da arborização dendrítica das células verticais, pois a observação qualitativa indicava que algumas estavam direcionadas para a pia e outras para a substância branca (ver Tabela 3).

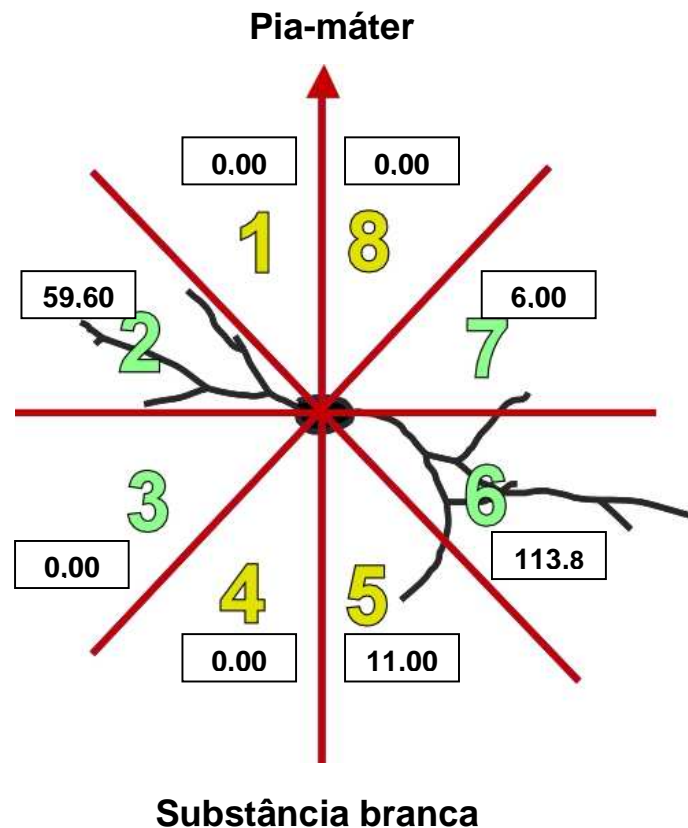


FIGURA 8. Exemplo da análise setorial de orientação dendrítica (*wedge analysis*). Os valores expressos nos retângulos em cada setor correspondem ao valor do comprimento dendrítico (DL) do nNADPHd+ no mesmo.

Usando como modelo o nNADPHd+ mostrado na figura anterior podemos analisar o seu padrão da árvore dendrítica. Os valores referentes ao comprimento dendrítico (DL) foram aplicados na fórmula do índice de verticalidade (iv).

$$iv = [(DL_1 + DL_4 + DL_5 + DL_8) / \sum DL_{(1-8)}]$$

$$iv = (0 + 0 + 11,0 + 0) / 0 + 59,60 + 0 + 0 + 11,00 + 113,80 + 6,00 + 0$$

$$iv = 0,05$$

Dessa forma, com base na observação qualitativa e no valor do iv, esse nNADPHd+ foi classificado como possuindo uma arborização dendrítica mais horizontalizada.

TABELA 2 - NEURÔNIOS NADPHd POSITIVOS EM S1

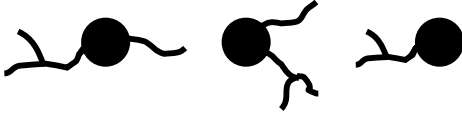

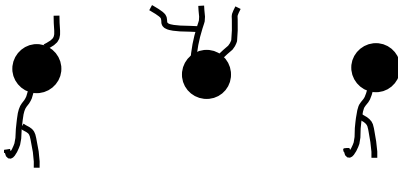
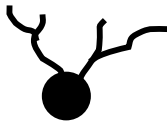
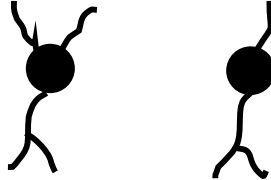

TIPO CELULAR	ÍNDICE DE VERTICALIDADE	
Horizontais	0 a 0,32	
Multipolares	0,33 a 0,65	
Verticais	0,66 a 1,00	

TABELA 3 - SUBTIPOS DOS NEURÔNIOS NADPHd POSITIVOS VERTICAIS

TIPO CELULAR	ÍNDICE DE DIRECIONALIDADE	
Orientada para a Pia-máter	+ 0,51 a + 1,00	
Duplo-tufo e / ou bipolar	- 0,50 a + 0,50	
Orientada para a Substância branca	-1,00 a - 0,49	

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados referentes aos parâmetros morfométricos de cada nNADPHd+, obtidos pelo *Neuroexplorer*, foram transferidos para o programa *Excel*, e a partir disso foi feita uma tabela englobando todos os dados de todos os neurônios (Tabela 4).

Com base nos valores representados nessa tabela do *Excel*, os nNADPHd+ foram submetidos a análise estatística visando 1) distinguir eventuais morfotipos através de uma análise discriminante; 2) comparar os neurônios provenientes dos diferentes compartimentos de S1 (ver item 3.3.3).

Com relação à localização laminar e tangencial, os nNADPHd+ foram divididos em seis grupos: 1) neurônios supra-granulares localizados na coluna do barril (SB), 2) neurônios supra-granulares localizadas na coluna septal (SS), 3) neurônios da camada IV da coluna do barril (GB), 4) neurônios da camada IV da coluna septal (GS), 5) neurônios infra-granulares da coluna do barril (IB), e 6) neurônios infra-granulares da coluna septal (IS). Dessa forma, foi realizada uma comparação estatística entre esses seis grupos; uma análise laminar (comparação entre os nNADPHd+ localizados nos compartimentos laminares) e análise colunar (comparação entre os nNADPHd+ localizados na coluna de barris e septo).

As comparações estatísticas dos seis grupos e as laminares, assim como a medida de área dos compartimentos laminares foram feitas por meio da análise de variância (ANOVA). Já as comparações colunares e a medida de área da coluna de barris e septo foram feitas usando o teste *t* para grupos independentes. Em ambos os casos foi aplicado em *post hoc* o teste de *Tukey* com 95 % do intervalo de confiança ($p \leq 0,05$), usando o *software Statistica 6.0 (Statsoft, Inc)*.

Os grupos definidos previamente foram avaliados por meio do método da análise da função discriminante. Este tipo de análise permite a determinação de qual / ou quais parâmetros morfométricos (variáveis) proporcionam a melhor forma para separar essa

população neuronal em grupos específicos. Com isso é possível investigar quais características realmente definem um grupo ou tipo neuronal. Computacionalmente, a análise da função discriminante é bastante similar à análise multivariada de variância (MANOVA). A idéia básica subjacente a este procedimento é determinar se os nNADPHd+ diferem com relação à média de uma variável, e então usar esta variável para classificar os neurônios em grupos específicos. O aplicativo usado (*Statistica 6.0, Statsoft, Inc*) permitiu efetuar comparações entre a matriz total de covariância, bem como entre as matrizes das variâncias totais e covariância de cada grupo. Estas matrizes foram comparadas através do teste de *Fischer* com a finalidade de determinar se existem ou não diferenças relacionadas a todas as variáveis entre os nNADPHd+.

TABELA 4 - MODELO DA TABELA FEITA A PARTIR DOS DADOS OBTIDOS PELO NEUROEXPLORER

POSIÇÃO DA CÉLULA	CORPO CELULAR		ÁRVORE DENDRÍTICA						CAMPO DENDRÍTICO				ORIENTAÇÃO DENDRÍTICA
	Área (μm^2)	Form Factor	N.º de dendritos de 1. ^a ordem	Compri mento (μm)	Volume (μm^3)	N.º de nod os	N.º de seg men tos	Análi se Fract al	Área (μm^2)	Perí metr o (μm)	Volume (μm^3)	Superfí cie (μm^2)	Índice de Verticalidade
SB001	88,33	0,848	1	105,2	70,95	1	3	1,000	1439,14	263	4485,02	6010,5	0,22
SS073	123,17	0,848	3	86,1	59,47	2	7	0,992	851245,0	137,2	1157,28	1746,4	0,00
GB080	11760	0,4876	2	214,3	226,46	1	4	1,01	2918,53	391,2	6372,95	7891,7	1,00
GS005	132,82	0,818	3	115,5	91,94	1	5	0,982	28284,2	612,3	1036620,0	156784	0,28
IB255	91,165	0,727	3	150,3	92,70	1	5	0,985	2045,82	217,6	4666,60	4282,0	1,00
IS013	163,06	0,847	2	212,5	139,75	4	10	0,994	28284,3	612,3	773371	150968	0,25

4 RESULTADOS

4.1 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS

Todo o material histológico produzido era cuidadosamente avaliado, visando-se selecionar um conjunto de secções coronais que permitisse a reconstrução de S1 no sistema *Neurolúcida*. Assim, os hemisférios apresentando uma neurópila bem reativa, com marcação clara de todo o campo de barris, das camadas corticais e dos neurônios NADPH-diaforase-positivos (nNADPHd+) eram considerados ideais para serem analisados e reconstruídos.

Os casos descartados para a análise foram aqueles que apresentaram problemas durante alguma etapa do processamento: na perfusão (tecido mal fixado), durante a microtomia (perda de cortes ou de parte dos cortes), ou ainda durante o processamento histoquímico (interrupção da reação antes do tempo ideal, tendo um tecido sem uma marcação nítida do campo de barris e / ou células NADPHd-positivas do tipo I; ou o contrário, uma interrupção tardia da reação, onde a reconstrução ficava também comprometida porque o tecido apresentava atividade de fundo – *background* – muito alta).

O hemisfério direito do caso R0610 foi selecionado para a reconstrução completa da área S1. Todas as secções contendo campos de barris (N = 24) e todos os neurônios nNADPHd+ de S1 nestas secções foram desenhados no sistema *Neurolúcida*, totalizando 1360 células. Adicionalmente, o hemisfério direito dos casos R0703 e R0704 foram selecionados para reconstrução parcial, pois apresentavam um bom padrão de marcação, sendo possível visualizar os campos de barril e as células nNADPHd. No entanto, nestes casos, houve perda de algumas secções durante a

microtomia, impossibilitando a reconstrução completa. No caso R0703 reconstruímos apenas, os contornos das secções (N = 13), campos de barris e 48 neurônios, sendo que, todos os corpos celulares marcados em S1 foram plotadas (N = 572), permitindo a análise de sua distribuição. No caso R0704 apenas os contornos das secções contendo campos de barris (N = 17), e a posição dos corpos celulares (N = 585) foram reconstruídos. Logo, a análise morfométrica dos neurônios nNADPHd refere-se aos hemisférios R0610 e R0703, sendo que esses dois casos apresentaram uma diferença considerável com relação à marcação do tecido (ver Tabela 1) (Figura 9). Além disso, a avaliação qualitativa da distribuição e morfologia de células e neurópila foi realizada a partir de todos os animais que foram processados, incluindo os hemisférios que foram seccionados no plano parassagital e tangencial (total: 5 animais), e os que foram seccionados no plano coronal (total: 7 animais).

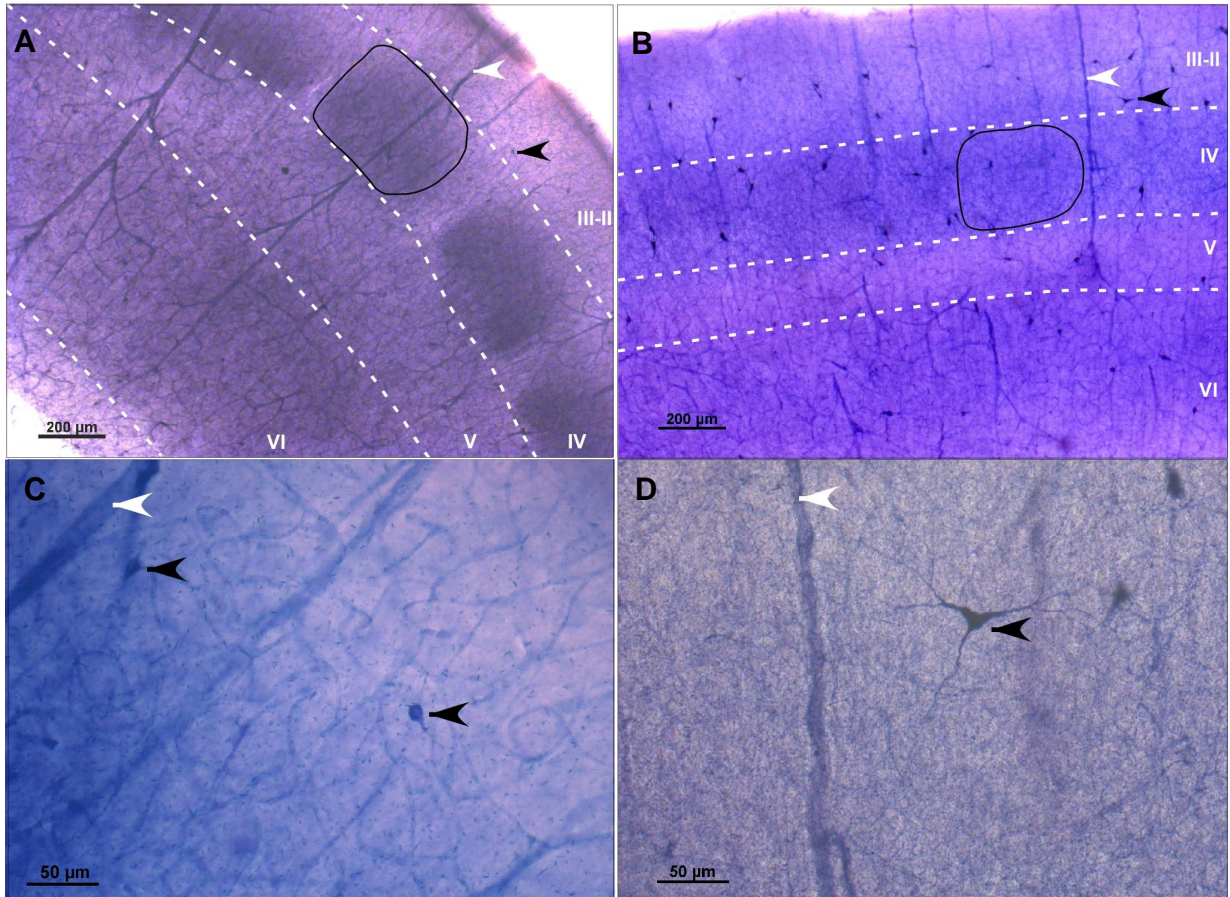


Figura 9. Fotomicrografias de cortes coronais ao nível da área S1 do rato, processados para NADPHd. A e C caso R0610 e B e D R0703. O caso R0610 apresentou uma atividade de fundo (*background*) mais alta do que o R0703, facilitando a delimitação de barris e camadas corticais, mas dificultando a visualização dos nNADPHd+. II-VI: camadas corticais. Linha contínua preta: contorno de um barril. Linhas pontilhadas brancas: contorno das camadas corticais. Cabeça de seta preta: nNADPHd+. Cabeça de seta branca: vasos sanguíneos. Aumento: 5x em A e B. Aumento: 20x em C e D.

4.2 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DOS NEURÔNIOS E NEURÓPILA NADPH-DIAFORASE POSITIVOS

A histoquímica para NADPHd produziu uma marcação difusa da neurópila que permitiu a delimitação de barris e camadas corticais, bem como neurônios fortemente marcados (do tipo 1 – nNADPHd+). A reação difusa de neurópila e os nNADPHd+ eram encontrados em todas as camadas corticais (Figura 9), com as seguintes características gerais (Tabela 5):

- A camada I aparecia como uma faixa de reação moderada, com poucas células marcadas, cujos dendritos tinham uma orientação geralmente tangencial à superfície pial ou “horizontal”.

- Nas camadas II e III, a neurópila exibia uma reatividade moderada e uniforme para NADPHd, tornando difícil definir o limite entre essas duas camadas. Nelas, era possível encontrar células horizontais, multipolares e/ou verticais, ou seja, com dendritos de diversas orientações (Figura 10).

- A camada IV era bem delimitada e caracterizada, em cortes coronais, pela alternância de regiões ovóides ou retangulares altamente reativas para NADPHd (os barris), separadas por regiões menos reativas e mais estreitas (os septos). Nessa camada, era muito clara a presença de células com a árvore dendrítica verticalmente orientada em comparação às demais camadas (Figuras 11 e 12).

- A camada V era também bem definida e caracterizada como uma região de baixa reatividade da neurópila.

- Na camada VI havia um notável aumento da reatividade enzimática, quando comparada com a camada V.

- Nas camadas V e VI, os nNADPH-d+ apresentavam uma arborização dendrítica com diferentes orientações, sendo as células com orientação dendrítica vertical mais numerosas (Figuras 11 e 12).

Quanto à organização colunar dos nNADPHd+, observamos uma tendência das arborizações dendríticas serem mais elaboradas nas colunas septais (ver resultados quantitativos abaixo) em comparação às colunas de barris. No entanto, independente da posição laminar ou colunar do corpo celular, os dendritos dos nNADPHd+ encontrados ao longo de S1 não se restringiam aos limites arquitetônicos de barris e/ou camadas corticais (Figuras 10, 12 e 13).

Ao avaliar especificamente a distribuição espacial dos dendritos, notava-se que muitos neurônios apresentavam arborizações orientadas verticalmente. No entanto, as células horizontais e multipolares representavam a maioria nas camadas supragranulares (Figuras 14 e 15).

Outra característica notável desses neurônios é que os dendritos de células vizinhas pareciam freqüentemente fazer contatos uns com os outros. Isso foi observado muitas vezes, com uso de uma objetiva de grande aumento (x100) e ajuste fino do foco (Figura 13).

Os nNADPHd+ também apresentavam uma relação muito clara com os vasos sanguíneos, pois ao longo de toda a extensão do campo de barril era muito evidente a presença desses neurônios próximos a essas estruturas (Figura 16).

TABELA 5 - RESUMO DOS ACHADOS QUALITATIVOS

CAMADAS CORTICAIS	REATIVIDADE DA NEURÓPILA A NADPHd	nNADPHd+
I	Marcação moderada	Dendritos com orientação horizontal
II / III	Marcação moderada e uniforme	Células com diversas orientações, mas há predomínio de árvore dendrítica com orientação horizontal e multipolar
IV	Marcação alternada entre barris (regiões com alta reatividade), separadas pelos septos (regiões menos reativas)	Células com diversas orientações, mas há predomínio da árvore dendrítica verticalmente orientada
V	Baixa reatividade da neurópila	Células com diversas orientações, mas há predomínio da árvore dendrítica verticalmente orientada
VI	Reatividade enzimática mais alta, quando comparada com a camada V	Células com diversas orientações, mas há predomínio da árvore dendrítica verticalmente orientada

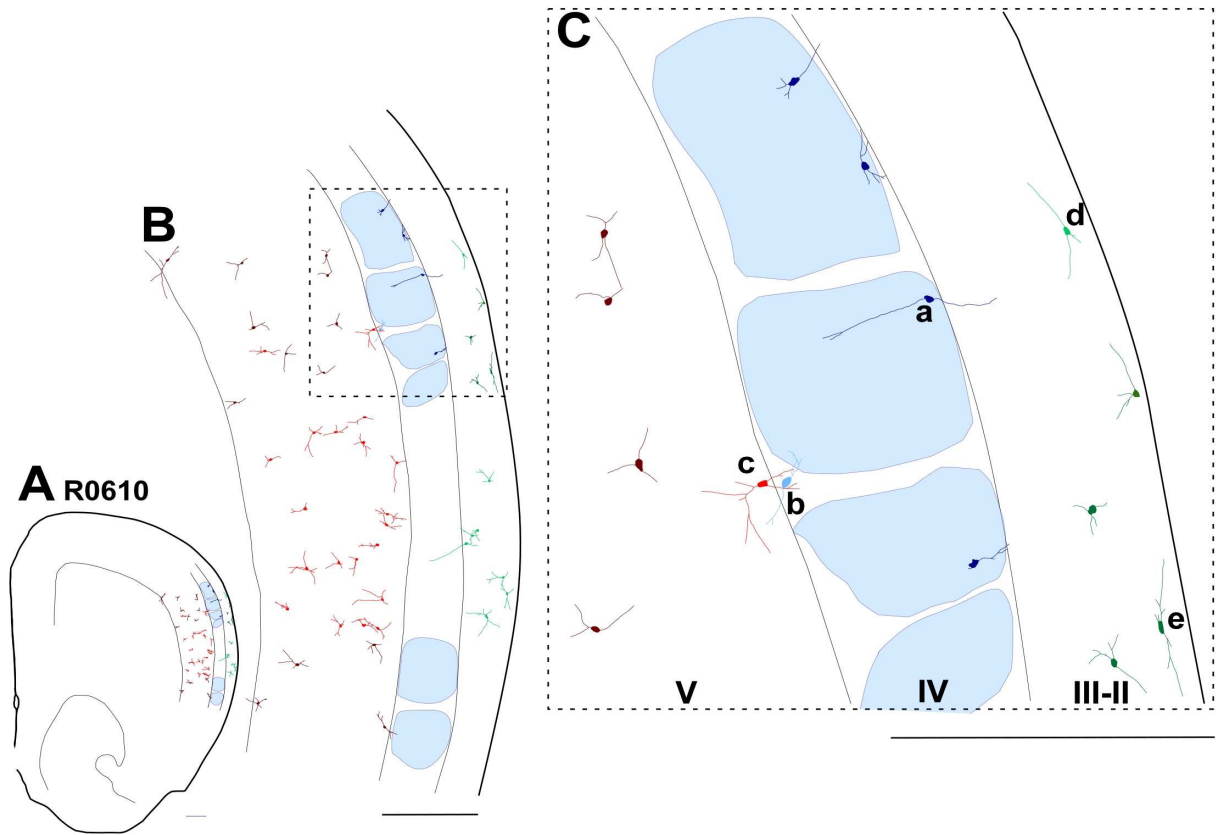


Figura 10. As árvores dendríticas estendem-se além do compartimento laminar e/ou tangencial do corpo celular de origem e as células supragranulares apresentam dendritos com orientação horizontal. Reconstrução de um corte coronal (caso R0610) ilustrando a distribuição dos nNADPHd+ em S1 em aumentos progressivos (A, B, C). II-VI: camadas corticais delimitadas pela diferença da intensidade de marcação. Azul: barris. O neurônio a (azul escuro) está localizado em um barril da camada IV, mas emite um dendrito para a camada III. Os corpos celulares dos neurônios “b” (azul claro) e “c” (vermelho claro) estão localizados em uma coluna septal, mas possuem ramificações dentro das colunas de barris adjacentes, além de estenderem seus dendritos nas camadas granular e infragranulares. Dois neurônios supragranulares localizados em uma coluna septal (“d”, verde claro) e em uma coluna de barril (“e”, verde escuro) possuem dendritos “horizontais” que se estendem tangencialmente além dos seus respectivos compartimentos. Barra de calibração = 500 μ m.

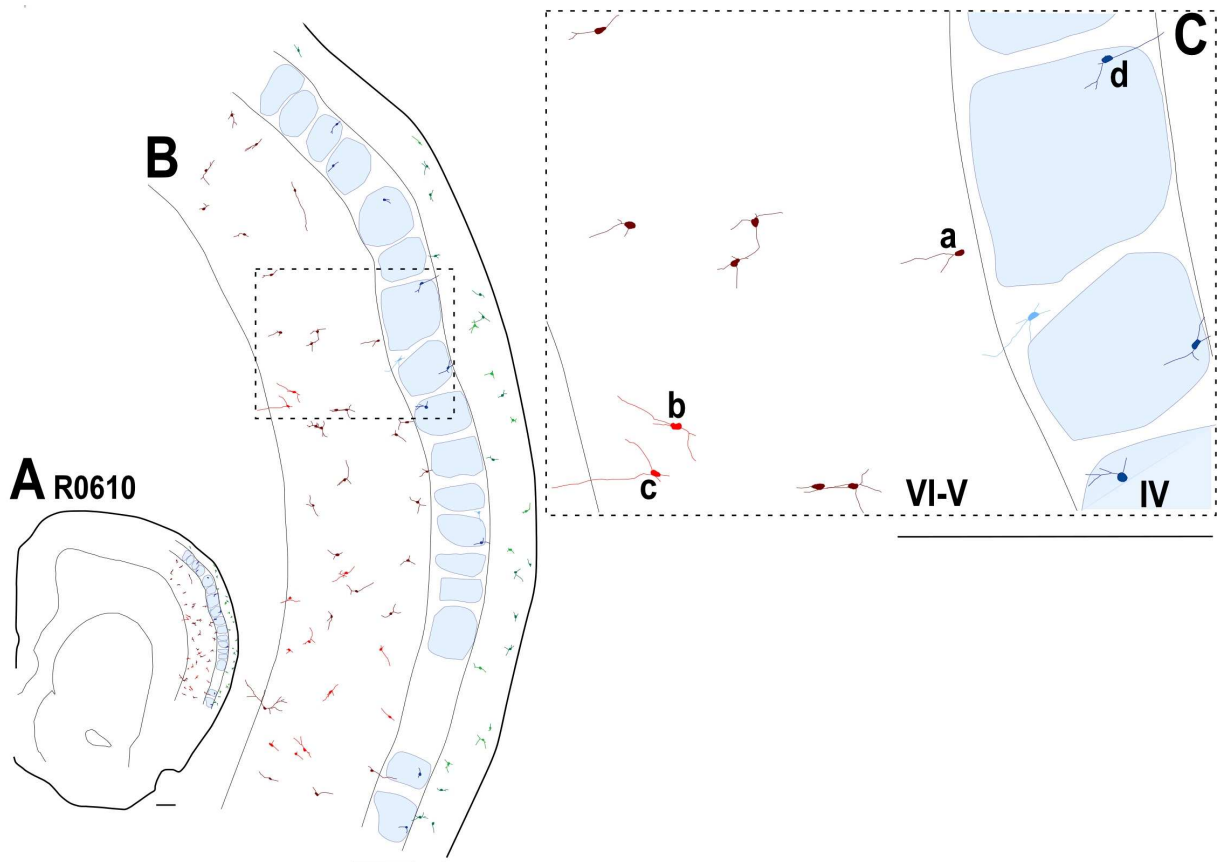


Figura 11. As células das camadas IV e infragranulares possuem orientação mais vertical. Reconstrução de um corte coronal (caso R0610) ilustrando a distribuição dos nNADPHd+ em S1 em aumentos progressivos (A, B, C). IV-VI: camadas corticais delimitadas pela diferença da intensidade de marcação. Azul: barris. O neurônio a (vermelho escuro) está localizado na camada V em uma coluna de barril e possui sua árvore dendrítica verticalmente orientada. As células “b” e “c” (vermelho claro) estão localizadas em uma coluna septal, com suas ramificações também verticalizadas. O neurônio “c” estende seu dendrito na substância branca. Os neurônios “d” e “e” localizam-se em barris da camada IV e também apresentam a arborização dendrítica verticalmente orientada. Barra de calibração = 500 μm .

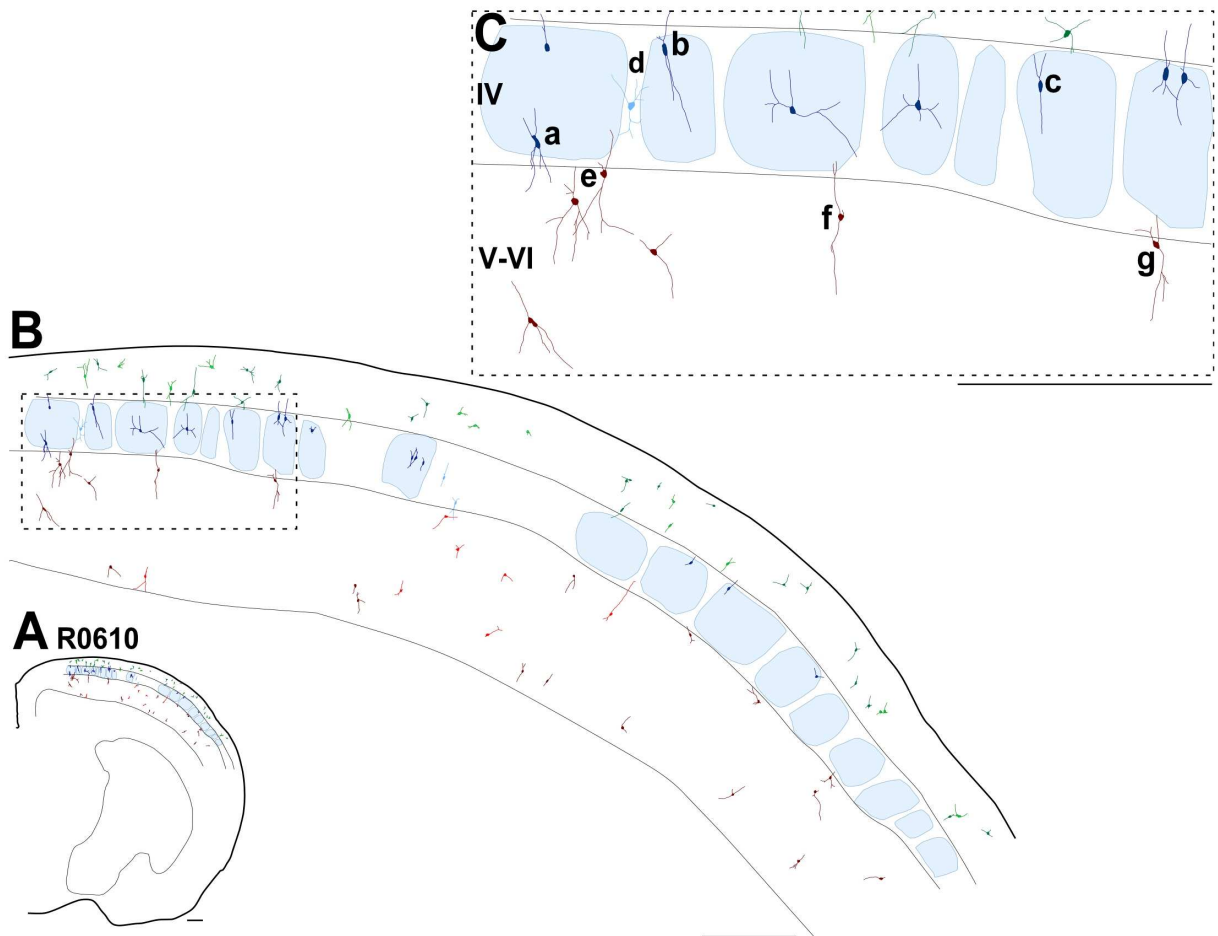


Figura 12. As células das camadas granular e infragranulares não respeitam os limites arquitetônicos de barris e/ou camadas e possuem arborização com orientação verticalizada. Reconstrução de um corte coronal (caso R0610) ilustrando a distribuição dos nNADPHd+ em S1 em aumentos progressivos (A, B, C). IV-VI: camadas corticais delimitadas pela diferença da intensidade de marcação. Azul: barris. O neurônio “a”, “b” e “c” (azul escuro) estão localizados na camada granular em barril distintos e possuem sua árvore dendrítica verticalmente orientada. A célula “a” tem alguns dendritos estendendo para a camada V, porém restringem-se na coluna de barril. A célula “b” apresenta extensões dendríticas para as camadas supragranulares, também restritas a coluna de barril. O nNADPHd+ “d”(azul claro) está localizado na camada IV em uma coluna de barril. Apresenta ramificações dendríticas também verticalizadas e que estendem aos barris adjacentes. Os neurônios “e”, “f” e “g” (vermelho escuro) localizam-se nas camadas infragranulares, na coluna de barril, e, estendem seus dendritos para a camada IV. Barra de calibração = 500 μm .

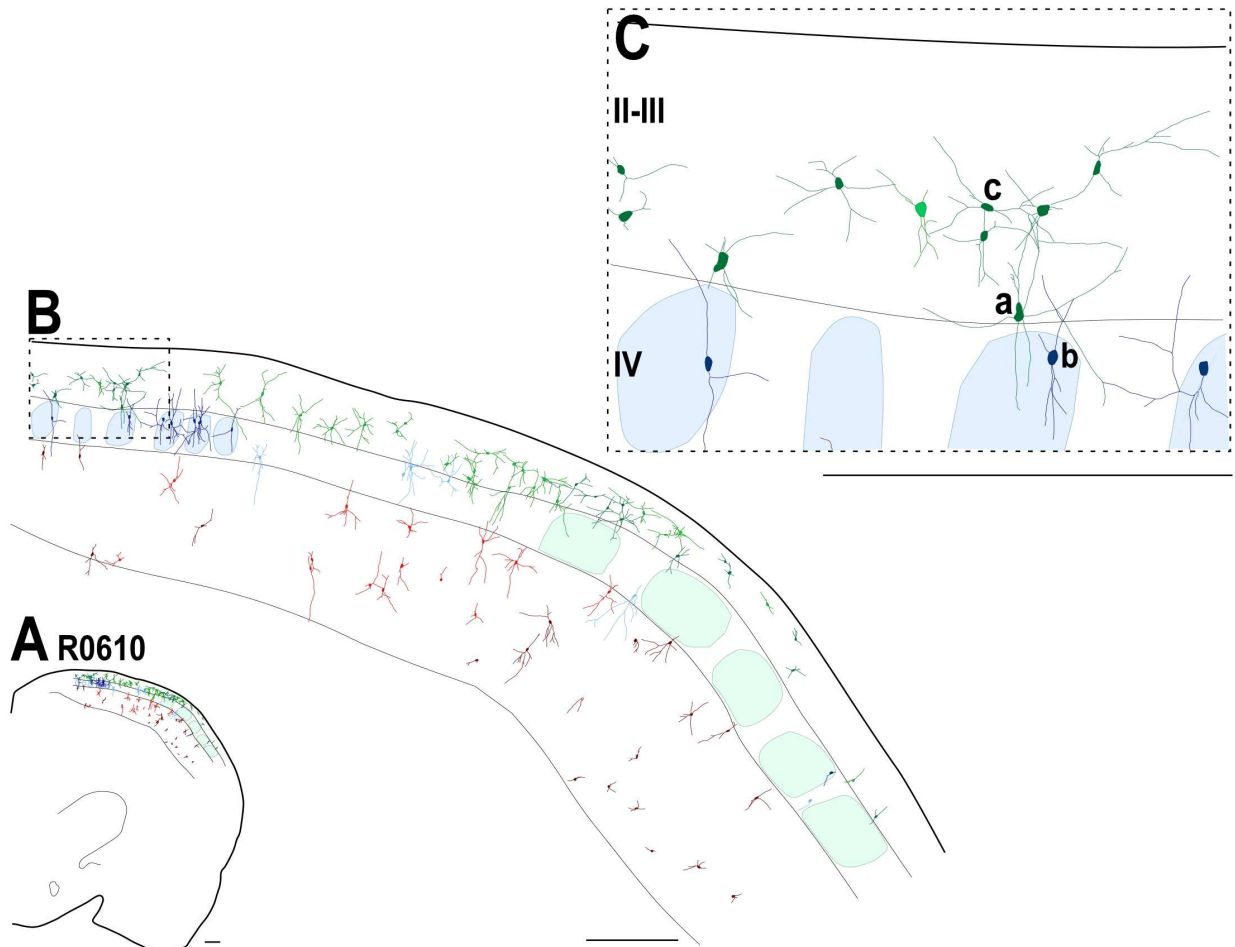


Figura 13. Os nNADPHd+ parecem apresentar contatos dendríticos. Reconstrução de um corte coronal (caso R0610) ilustrando a distribuição dos nNADPHd+ em S1 em aumentos progressivos (A, B, C). II-IV: camadas corticais delimitadas pela diferença da intensidade de marcação. Barris verdes: PMBSF. Barris azuis: demais subcampos de barris. As células localizadas nas camadas supragranulares, assim como as células da camada IV apresentam dendritos que possuem contatos ao longo de sua árvore. Isso ocorre entre os neurônios de todas as camadas e não se restringem ao limites de camadas e/ou colunas corticais, como observado na célula “a” (verde escuro - camada III) e célula “b” (azul escuro - camada IV). O neurônio “c” (verde escuro) está localizado na camada supragranular e coluna barril; apresenta uma arborização dendrítica mais “horizontalizada” que não se restringe a coluna de barril. Barra de calibração = 500 μ m.

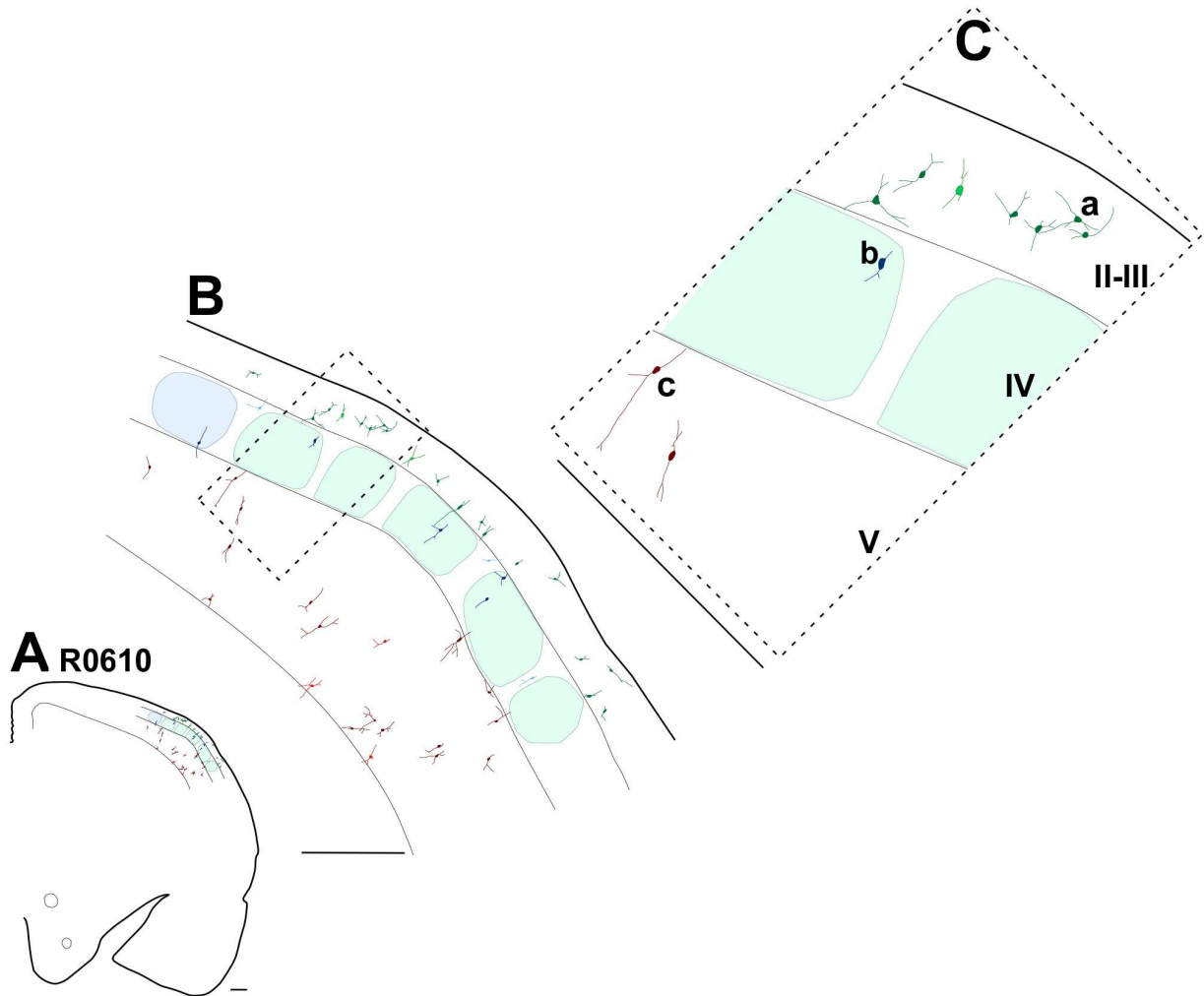


Figura 14. A arborização dendrítica dos neurônios das camadas supragranulares é mais horizontal do que os neurônios das demais camadas. Reconstrução de um corte coronal (caso R0610) ilustrando a distribuição dos nNADPHd+ em S1 em aumentos progressivos (A, B, C). II-V: camadas corticais delimitadas pela diferença da intensidade de marcação. Barris verdes: PMBSF. Barris azuis: demais subcampos de barris. Neurônio “a” (verde escuro) é um supragranular barril e possui os dendritos com uma orientação mais horizontal, enquanto o neurônio “b” (azul escuro), localizado na camada IV, e, o neurônio “c” (vermelho escuro) da camada V, também localizados na coluna de barris, como o neurônio “a”, apresentam a árvore dendrítica verticalmente orientada. Barris verdes são da porção do PMBSF e azuis os barris dos demais subcampos. Barra de calibração = 500 μm .

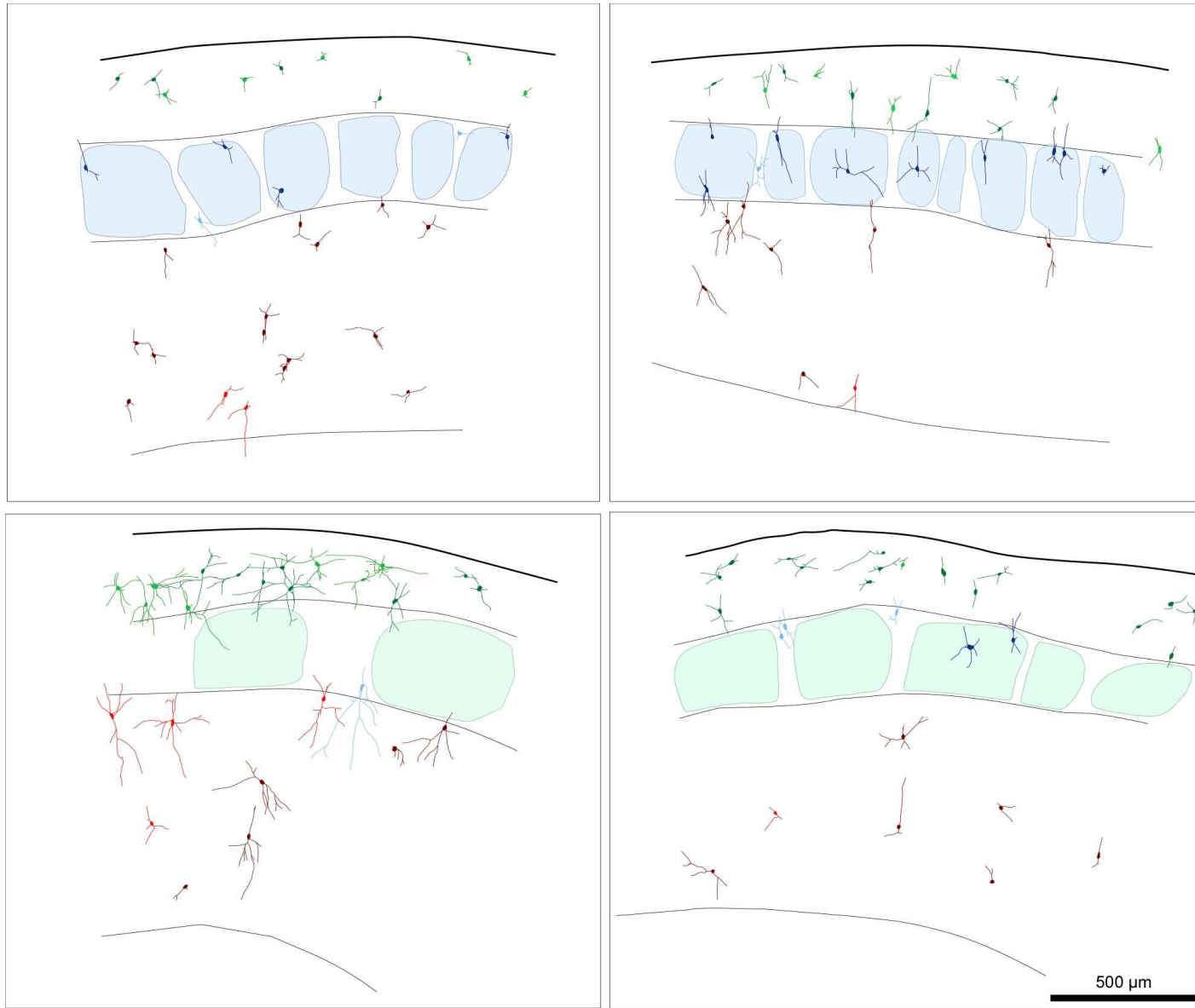


Figura 15. Representação dos nNADPHd+ ao longo de S1. Recortes de algumas secções mostrando as diferentes características dos nNADPHd+, ou seja, as células não respeitam os limites dos barris e camadas. As células localizadas nas camadas granular e infragranulares possuem árvores dendríticas verticalizadas. Barris azuis: todos os subcampos, com exceção do PMBSF (barris verdes).

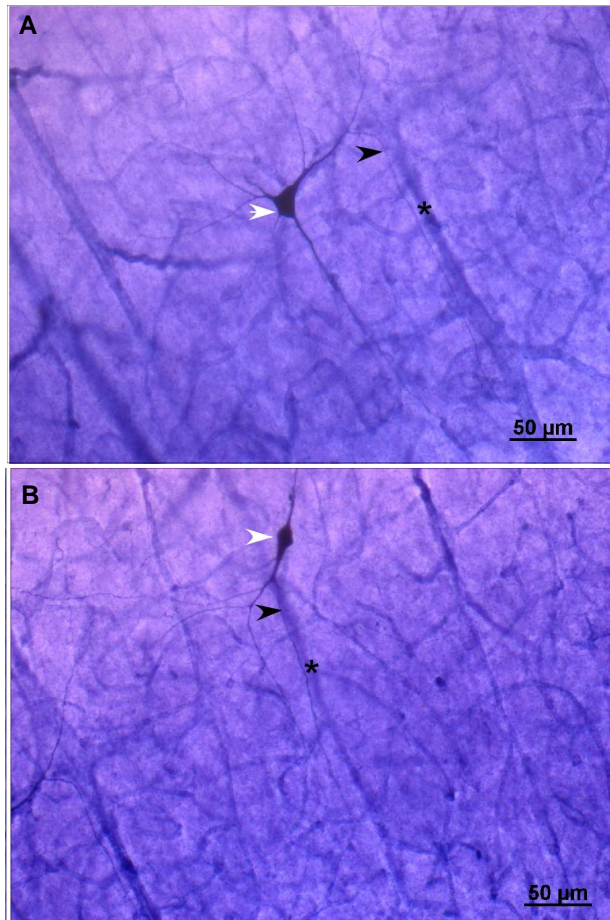


Figura 16. Fotomicrografia de nNADPHd+ na área S1 do caso R0703. A e B: Observa-se a proximidade dessas células com o vaso sanguíneo. Cabeça de seta branca: nNADPHd+. Cabeça de seta preta: ramificação dendrítica. Asterisco: vaso. Aumento: 20x.

4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DA MORFOLOGIA DOS NEURÔNIOS NADPH-DIAFORASE-POSITIVOS

Inicialmente, verificamos se haveria, na área S1, morfotipos de neurônios nitridérgicos que pudessem ser distinguidos com base em suas características morfológicas. Uma análise discriminante efetuada com nove parâmetros morfométricos (área de corpo celular, *form factor*, análise fractal, comprimento e volume dendrítico, número de dendritos de primeira ordem, de nodos e segmentos dendríticos totais), não separou grupos específicos nas 1360 células no caso R0610 (Figura 17).

Realizamos a análise estatística dos parâmetros morfométricos separando os nNADPHd em seis diferentes grupos, de acordo com o compartimento cortical ocupado pelo corpo celular: supra-granular do barril (SB), supragranular do septo (SS), granular do barril (GB), granular do septo (GS), infragranular do barril (IB) e infragranular do septo (IS) (ver item 3.5 em Materiais e Métodos). Nos casos R0703 e R0704, avaliou-se também a distribuição quantitativa dos neurônios com relação a estes compartimentos, mas nesses casos o número total de secções preservadas não engloba todo o campo de barris (Tabela 6).

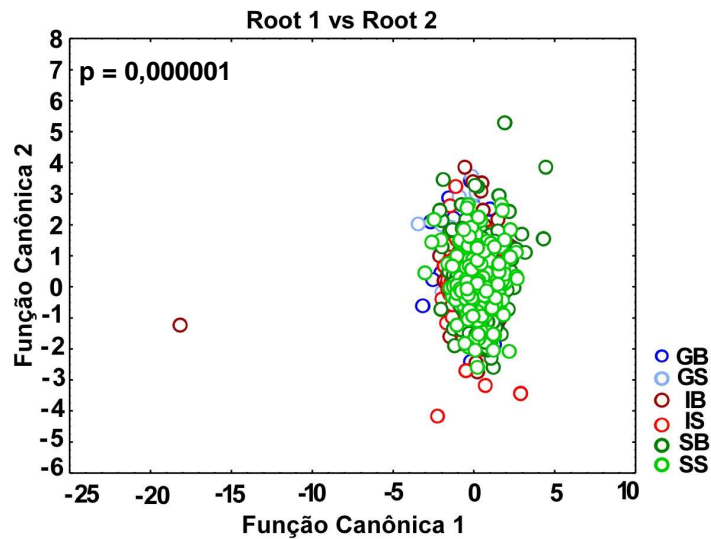


Figura 17. Gráfico de dispersão resultante da análise da função discriminante dos 1360 nNADPHd+ do caso R0610. Essa análise foi feita usando nove variáveis morfológicas (área de corpo celular, *form factor*, análise fractal, comprimento e volume dendrítico, número de dendritos de primeira ordem, de nodos e segmentos dendríticos totais). Não foi possível separar os seis grupos de células classificados com base nos critérios citoarquitetônicos.

4.3.1 Medidas de área dos compartimentos de S1 e distribuição dos nNADPHd+ no campo de barris

A área total de cada compartimento laminar e colunar de S1 foi medida, e a densidade dos neurônios NADPHd+ nesses compartimentos foi calculada (Figura 18 e 19).

TABELA 6 - QUANTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS NADPHd POSITIVOS POR COMPARTIMENTO

CASO	R0610			R0703			R0704		
COMPARTIMENTOS	BARRIL	SEPTO	TOTAL LAMINAR	BARRIL	SEPTO	TOTAL LAMINAR	BARRIL	SEPTO	TOTAL LAMINAR
SUPRAGRANULAR – SG	331	165	496 (37 %)	103	107	210 (37 %)	115	71	186 (32 %)
GRANULAR – GR	164	69	233 (17 %)	57	86	143 (25 %)	95	56	151 (26 %)
INFRAGRANULAR – IG	430	201	631 (46 %)	115	104	219 (38 %)	167	81	248 (42 %)
TOTAL COLUNAR	925 (68 %)	435 (32 %)	1360 (100 %)	275 (48 %)	297 (52 %)	572 (100 %)	377 (64 %)	208 (36 %)	585 (100 %)

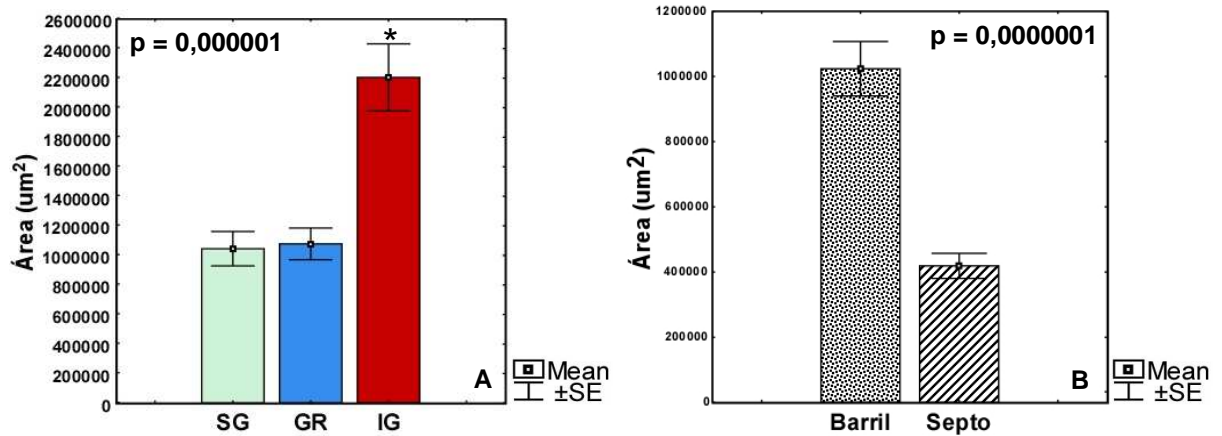


Figura 18. Área cortical média ocupada pelos compartimentos laminares (A) e colunares (B) na área S1 do **caso R0610**. As camadas infragranulares (IG) e o compartimento formado pela coluna dos barris representam as maiores frações. SG: compartimento supragranular; GR: compartimento granular e IG: compartimento infragranular.

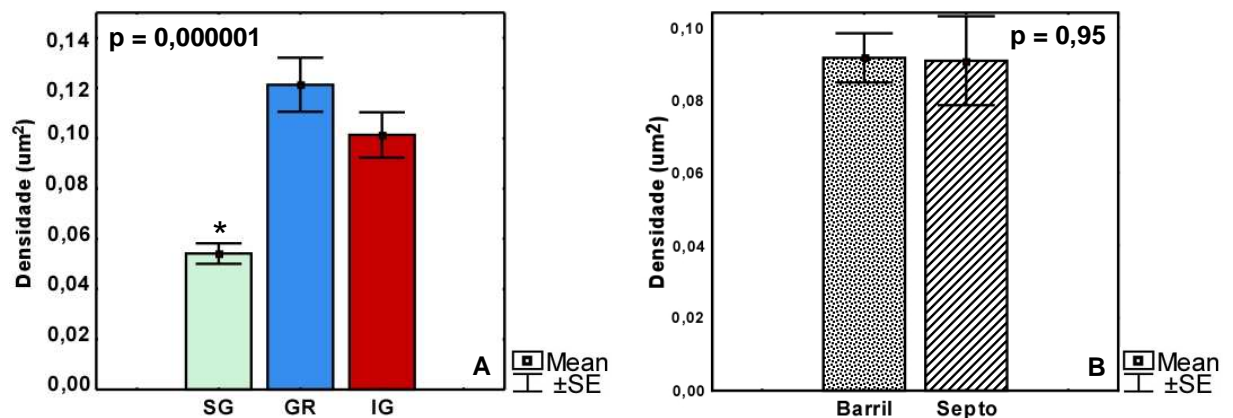


Figura 19. Densidade (em células por μm²) laminar (A) e colunar (B) dos nNADPHd+ em 24 secções do hemisfério direito do **caso R0610**. As camadas supragranulares apresentaram a menor densidade celular, mas não há diferença significativa entre as camadas granulares e infragranulares. Da mesma forma, a distribuição de neurônios marcados nas colunas de barril e septo não é diferente.

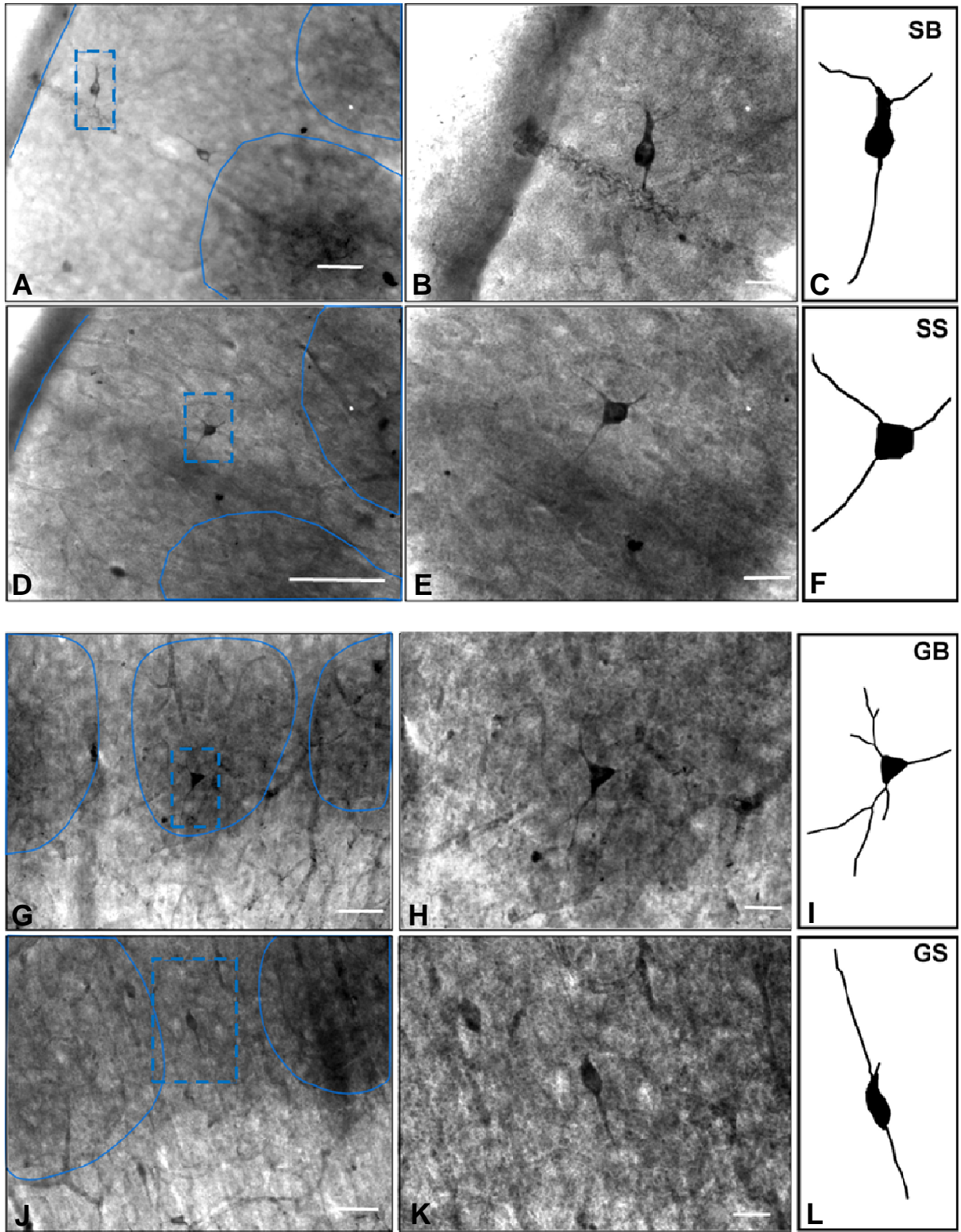
4.3.2 Avaliação da integralidade dos neurônios NADPHd+ reconstruídos

Durante o processo de desenho da árvore dendrítica no sistema *Neurolúcida*, realizamos uma observação cuidadosa do calibre e do percurso dos dendritos marcados ao longo da profundidade (eixo z). Uma ramificação dendrítica que termina no mesmo corte histológico (que está completa) caracteriza-se por um adelgaçamento gradual e pelo desaparecimento em níveis de profundidade distantes das extremidades da secção histológica. Prolongamentos dendríticos cortados, ao contrário, desaparecem subitamente (ainda espessos) na extremidade da secção histológica, indicando que ele se continua em outra secção adjacente. O sistema *Neurolúcida* permite caracterizar o final de cada dendrito, permitindo avaliar quão completos se encontravam os neurônios desenhados.

Com o auxílio de rotinas desenvolvidas no programa *MATLAB*, quantificamos, no caso R0610 (N = 1360 nNADPHd reconstruídos), a porcentagem de células com arborização dendrítica reconstruída na sua integralidade. Devido à falência do sistema *Neurolúcida* antes da análise final de nossos dados, a marcação da integralidade dos prolongamentos dendríticos só foi possível para cerca de 834 células. Destas, apenas 17 % foram consideradas incompletas.

4.3.3 Análise estatística dos parâmetros morfométricos

Para avaliar se a morfologia celular dos nNADPHd+ reflete a organização modular anátomo-funcional característica da área S1, comparamos estatisticamente os diferentes parâmetros morfométricos. A Figura 20 ilustra exemplos representativos dos nNADPHd+ localizados nos compartimentos laminares e colunares.



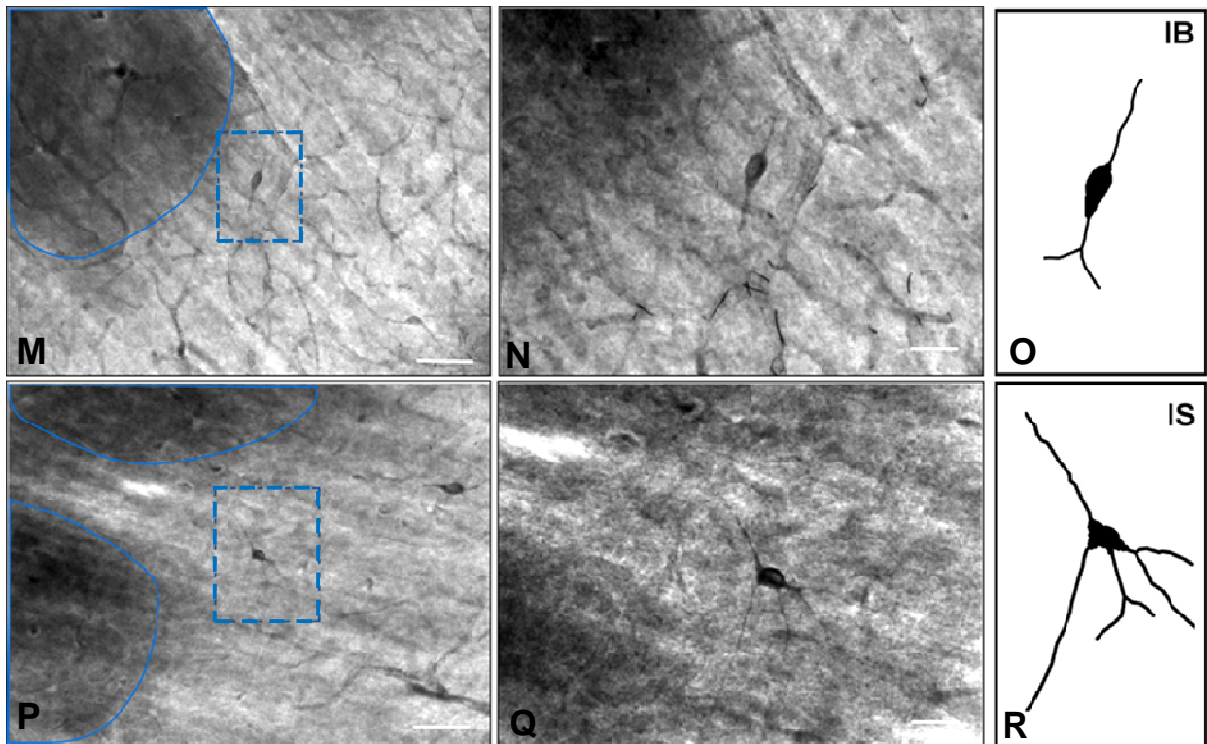


Figura 20. Representação de nNADPHd+ característicos nos diversos compartimentos laminares e colunares de S1 do rato. **A-F)** nNADPHd+ supragranulares, sendo A e D: aumento de 10x; E e F: aumento de 40x. **I-L)** nNADPHd+ granulares, sendo G e J: aumento de 10x; H e K: aumento de 40x. **O-R)** nNADPHd+ infragranulares, sendo M e P: aumento de 10x; N e Q: aumento de 40x. **C, F, I, L, O e R** Reconstruções dos diferentes nNADPHd+ no sistema *Neurolúcida*. SB: supragranular barril; SS: supragranular septo; GB: granular barril; GS: granular septo; IB: infragranular barril; IS: infragranular septo. Barras de calibração: 100 μ m em D; 50 μ m em A, E, G, J, M e P; 20 μ m em B, H, K, N e Q. Linha contínua azul: contorno dos barris e da pia-máter. Quadro pontilhado azul: região correspondente às reconstruções C, F, I, L, O e R.

O caso R0610 foi avaliado quantitativamente por meio de comparações estatísticas entre os seis grupos (SB, SS, GB, GS, IB e IS), entre os compartimentos laminares e colunares que foram definidos com base nos limites citoarquitetônicos revelados pela marcação ao longo de S1. (ver Materiais e Métodos: itens 3.3.3 e 3.5; Figura 20).

As Tabelas 7, 8 e 9 recapitulam essas comparações.

TABELA 7 - CASO R0610: COMPARAÇÃO ENTRE OS SEIS GRUPOS

Parâmetro Morfométrico	ANOVA Valor de P	Pos-Hoc - Tukey HSD Test
Dimensão fractal	N.S.	---
Área de corpo celular	P = 0,000001	GR >
Campo dendrítico	P = 0,00006	GS >
Comprimento dendrítico	P = 0,00002	SB <
Número de dendritos primários	P = 0,05	SS >
Form factor	P = 0,003	SB = SS > IS
Índice de verticalidade	P = 0,0000001	GB, GS, IB, IS = verticais
Número de nodos	P = 0,0006	IS > SS > SB
Número de segmentos	N.S.	---
Volume dendrítico	P = 0,00001	SB e SS <

Abreviações: N.S.: não significativo; GR: granular; SB: supragranular barril; SS: supragranular septo; GB: granular barril; GS: granular septo; IB: infragranular barril; IS: infragranular septo.

TABELA 8 - CASO R0610: COMPARAÇÃO ENTRE AS CAMADAS CORTICAIS

Parâmetro Morfométrico	ANOVA Valor de P	Pos-Hoc - Tukey HSD Test
Dimensão fractal	N.S.	---
Área de corpo celular	P = 0,000001	GR >
Campo dendrítico	N.S.	---
Comprimento dendrítico	P = 0,022	SG > IG
Núm. de dendritos primários	P = 0,04	N.S.
Form factor	P = 0,005	GR < SG
Índice de verticalidade	P = 0,000001	GR > IG > SG
Número de nodos	P = 0,05	N.S.
Número de segmentos	N.S.	---
Volume dendrítico	P < 0,00001	GR = IG > SG
Volume do campo dendrítico	N.S.	---
<i>(Hull analysis)</i>		

Abreviações: N.S.: não signitativo; SG: compartimento supragranular; GR: compartimento supragranular; IG: compartimento supragranular.

TABELA 9 - CASO R0610: COMPARAÇÃO ENTRE COLUNAS DE SEPTO E BARRIL

Parâmetro Morfométrico	ANOVA Valor de P	Pos-Hoc - Tukey HSD Test
Dimensão fractal	N.S.	---
Área de corpo celular	N.S.	---
Campo dendrítico	P = 0,00008	Septo > barril
Comprimento dendrítico	P = 0,00004	Septo > barril
Dendrito primário	N.S.	---
Form factor	P = 0,05	Barril > Septo
Índice de verticalidade	N.S.	---
Número de nodos	P = 0,00025	Septo > Barril
Número de segmentos	P = 0,04	Septo > Barril
Volume dendrítico	N.S.	---
Volume do campo dendrítico (<i>Hull analysis</i>)	P = 0,00008	Septo > Barril

Abreviação: N.S.: não signitativo.

No caso R0703, comparamos apenas os compartimentos laminares e colunares para 48 nNADPHd+ reconstruídos.

As Tabelas 10 e 11 recapitulam essas comparações.

TABELA 10 - CASO R0703: COMPARAÇÃO ENTRE AS CAMADAS CORTICAIS

Parâmetro Morfométrico	ANOVA Valor de P	Pos-Hoc - Tukey HSD Test
Dimensão fractal	N.S.	---
Área de corpo celular	P = 0,0001	GR >
Campo dendrítico	N.S.	---
Comprimento dendrítico	N.S.	---
Dendrito primário	N.S.	---
Form factor	P = 0,01	GR > IG
Índice de verticalidade	P = 0,0008	GR > IG > SG
Número de nodos	P = 0,0009	SG >
Número de segmentos	P = 0,001	SG >
Volume dendrítico	P = 0,06	GR = IG > SG
Volume do campo dendrítico	N.S.	---

(Hull analysis)

Abreviação: N.S.: não signitativo.

TABELA 11 - CASO R0703: COMPARAÇÃO ENTRE COLUNAS DE BARRIL E SEPTO

Parâmetro Morfométrico	ANOVA Valor de P	Pos-Hoc - Tukey HSD Test
Dimensão fractal	N.S.	---
Área de corpo celular	N.S.	---
Campo dendrítico	N.S.	---
Comprimento dendrítico	N.S.	---
Dendrito primário	N.S.	---
Form factor	N.S.	---
Índice de verticalidade	N.S.	---
Número de nodos	N.S.	---
Número de segmentos	N.S.	---
Volume dendrítico	N.S.	---
Volume do campo dendrítico (<i>Hull analysis</i>)	N.S.	---

Abreviação: N.S.: não signitativo.

Nos itens seguintes, descreveremos as diferenças observadas nas comparações dos principais parâmetros entre os diversos grupos.

4.3.3.1 Morfologia do corpo celular dos neurônios NADPH-diaforase positivos

Os nNADPHd+ localizados na camada IV apresentaram a maior área de corpo celular, sendo esta diferença evidente tanto na comparação entre os seis grupos quanto na comparação laminar (Figura 21). Ou seja, até ao analisar apenas as células localizadas nos barris, os da camada IV (grupo “granular barril”, GB) apresentam a

maior área. No caso R0703, os neurônios da camada granular também apresentaram o maior tamanho de corpo celular (Figura 22).

Não houve diferença significativa nas demais comparações realizadas no caso R0610.

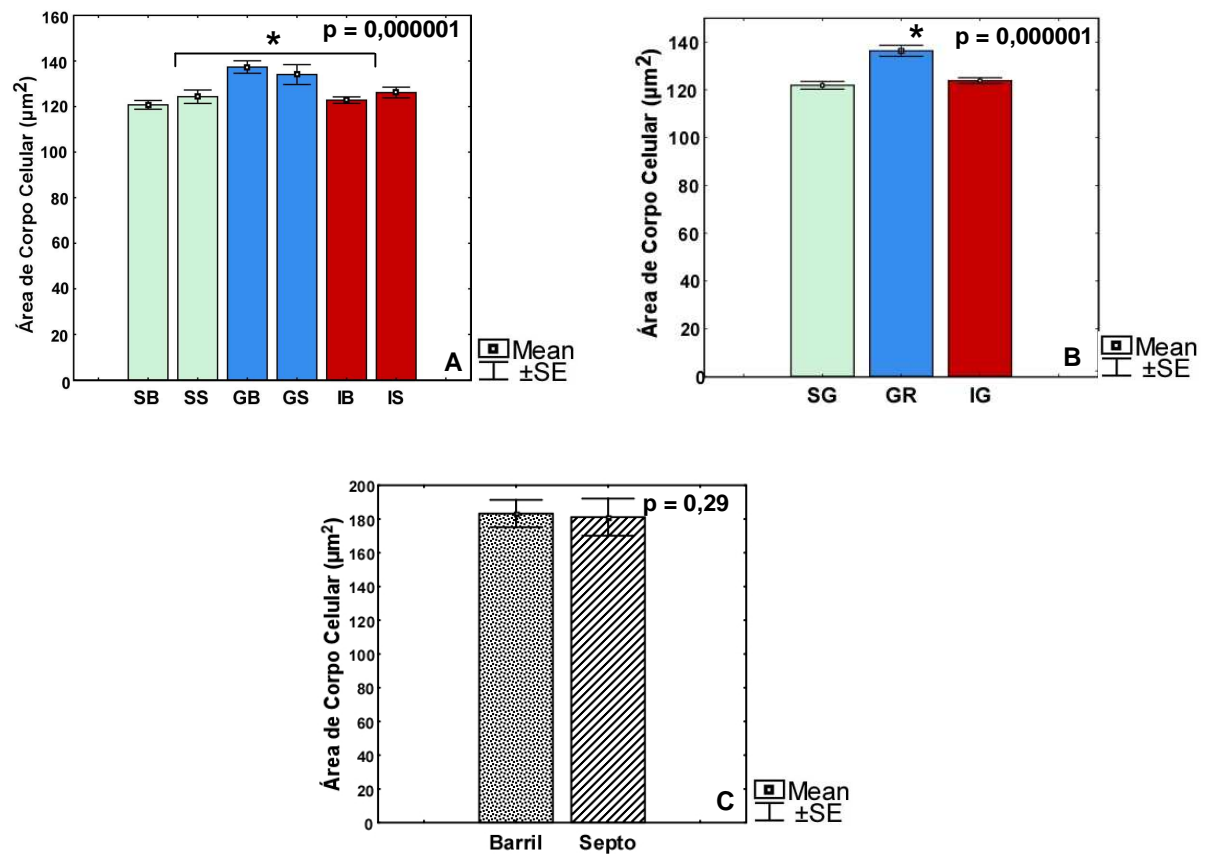


Figura 21. Comparação entre os seis grupos (SB, SS, GB, GS, IB e IS) (A), inter-laminar (B) e inter-colunar da área do corpo celular dos neurônios nitridérgicos no **caso R0610**.

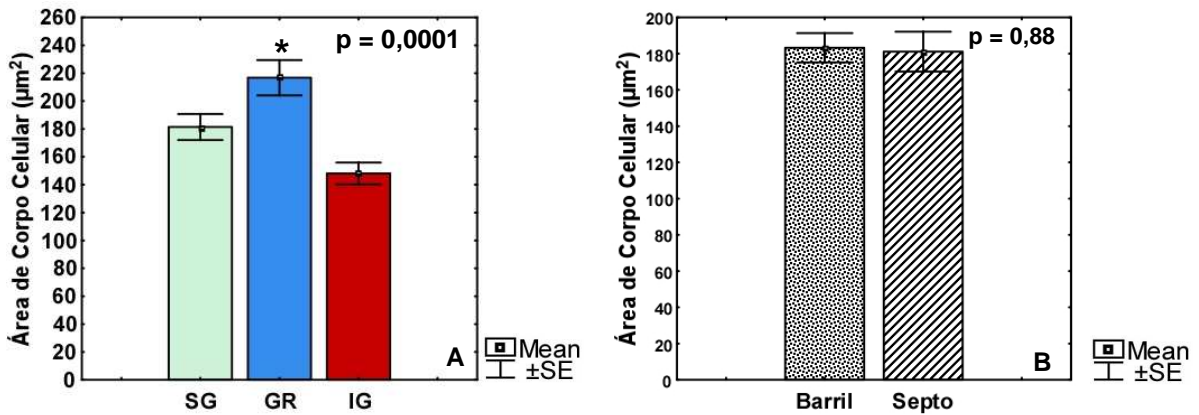


Figura 22. Comparação inter-laminar (A) e inter-colunar (B) da área do corpo celular dos neurônios nitridérgicos no **caso R0703**.

Na sua grande maioria, as células NADPHd+ tinham um formato praticamente esférico, como indicado pelo valor elevado do “*form factor*”. No entanto, as células supragranulares e as da coluna de barris apresentaram um *form factor* levemente mais elevado, e, portanto são ainda mais esféricas, do que os neurônios localizados nos demais compartimentos laminares ou colunares, respectivamente, do animal R0610 (Figura 23).

No caso R0703, os neurônios infragranulares apresentaram o menor valor de *form factor*, e verificamos uma tendência - embora não significativa, devido ao número reduzido de células -, dos neurônios da coluna de barris também serem mais esféricos (Figura 24).

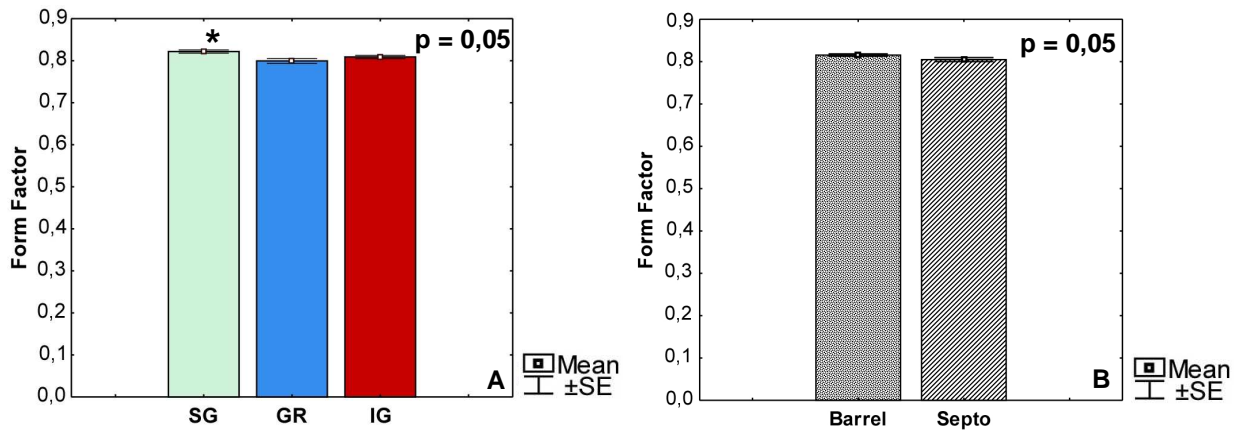


Figura 23. Comparação inter-laminar (A) e inter-colunar (B) da forma do corpo celular dos nNADPHd+ no caso R0 610.

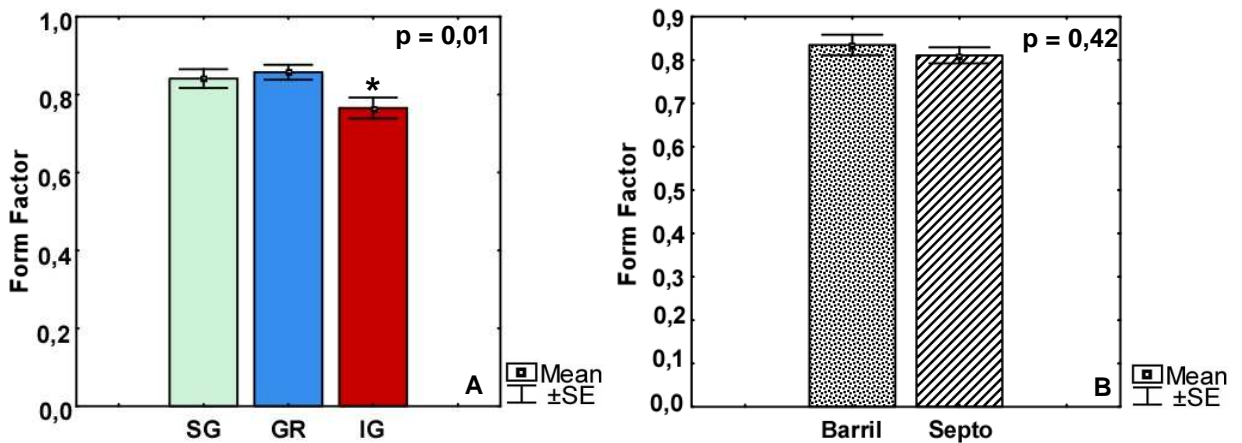


Figura 24. Comparação inter-laminar (A) e inter-colunar (B) da forma do corpo celular dos nNADPHd+ no caso R0703.

4.3.3.2 Morfologia da árvore dendrítica dos neurônios NADPH-diaforase positivos

As diferenças encontradas no que se refere ao tamanho e grau de ramificação das arborizações dendríticas foram bem mais claras, pois os neurônios septais tinham

maiores valores de comprimento, campo dendrítico, número de nodos e de segmentos (Figura 25).

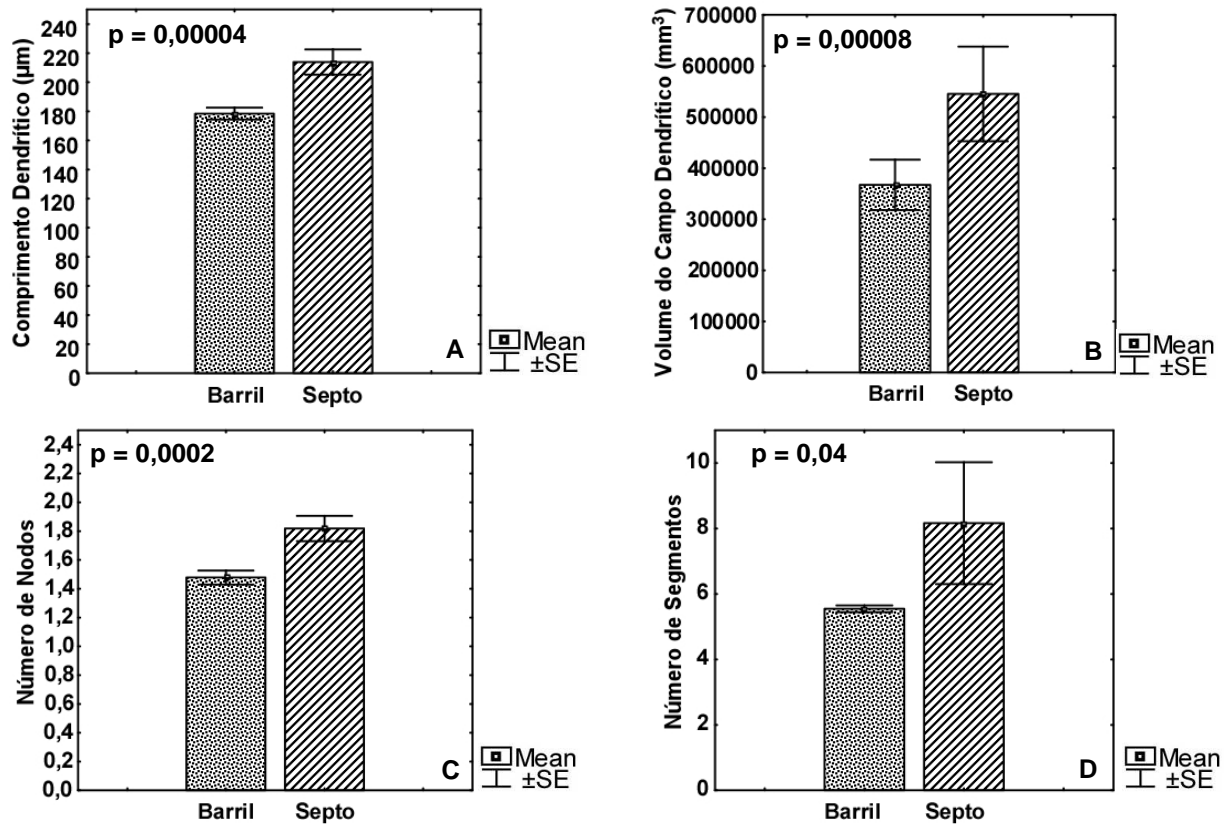


Figura 25. Análise das árvores dendríticas dos nNADPHd+ no caso R0610. A) Comprimento dendrítico. B) Volume do campo dendrítico. C) Número de nodos. D) Número de segmentos.

No caso R0703 não encontramos diferenças significativas entre os parâmetros morfométricos relacionados com a arborização dendrítica, mas verificamos uma tendência dos neurônios septais serem maiores (Figura 26).

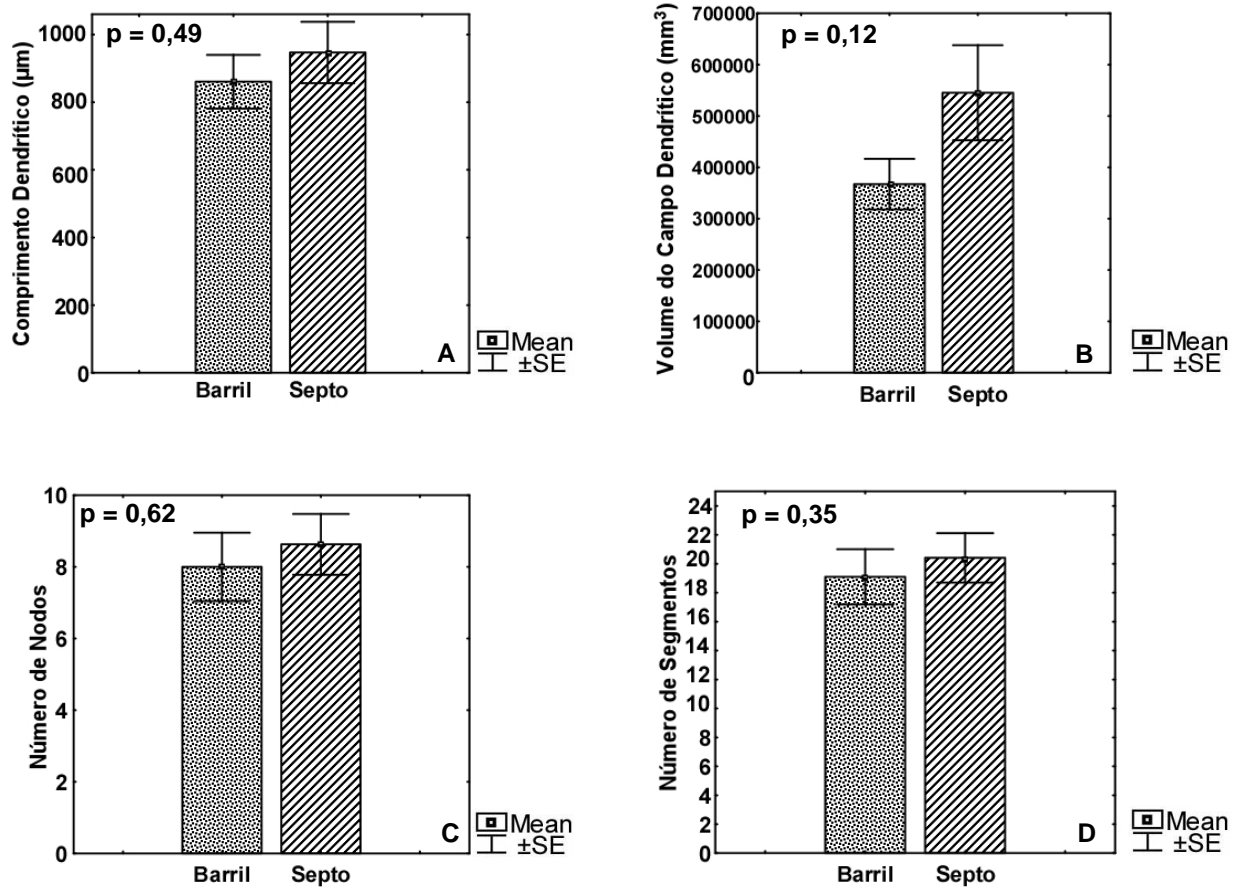


Figura 26. Análise das árvores dendríticas dos nNADPHd+ no caso R0703. A) Comprimento dendrítico. B) Volume do campo dendrítico. C) Número de nós. D) Número de segmentos.

4.3.3.3 Orientação da árvore dendrítica dos neurônios NADPH-diaforase positivos

A maioria dos nNADPHd+ da área S1 do animal R0610 apresentou uma árvore dendrítica verticalmente orientada, ou seja, com índice de verticalidade entre 0,66 e 1 (ver Tabela 2, item 3.4.c). A população restante englobou neurônios multipolares e horizontalizados (Figura 27). Além disso, ao analisar a ocorrência desses subtipos celulares nos diferentes compartimentos laminares foi observado que:

a) nas camadas supragranulares (SG), encontram-se os três subtipos de nNADPHd+ em proporções quase iguais, sendo 33 % horizontais, 30 % multipolares e 38 % verticais;

b) na camada IV (GR) e nas camadas infragranulares (IG), há uma prevalência de células com a arborização dendrítica verticalizada. No compartimento GR, 12 % das células são horizontais, 18 % multipolares e 70 % verticais. No compartimento IG, 15 % das células são horizontais, 24 % multipolares e 61 % de neurônios são verticalizados (Figura 28).

Na avaliação do caso R0703, onde apenas 48 células foram reconstruídas, verificou-se que a maior parte dessas células (44 %) também apresentou a árvore dendrítica verticalmente orientada. As células multipolares correspondem a 33 % e as horizontais 23 % dessa população celular. Ou seja, mesmo com um número limitado de células, o padrão de orientação da arborização dendrítica se manteve (Figura 29).

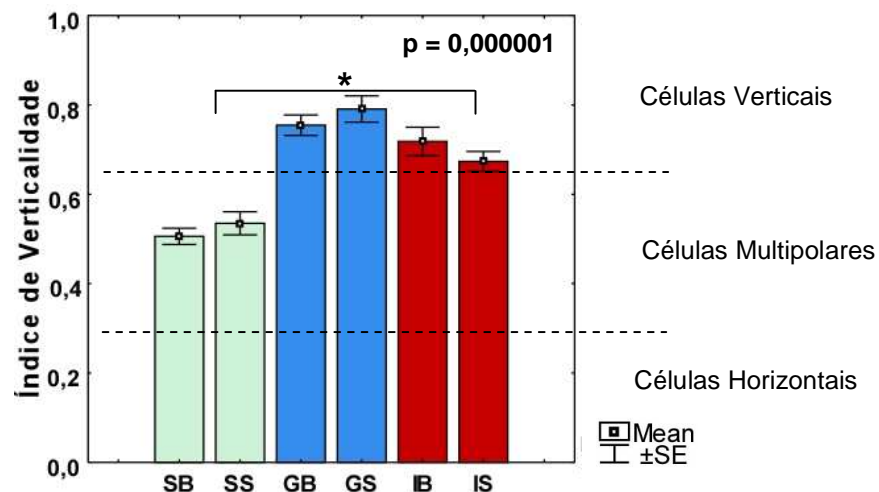


Figura 27. Análise da orientação da arborização dendrítica dos nNADPHd+ do **caso R0610**. O índice de verticalidade foi avaliado com relação aos seis grupos celulares (SB, SS, GB, GS, IB e IS) demonstrando com isso a prevalência das células verticais nas camadas granular e infragranulares. Linhas pontilhadas pretas: indicam o valor limítrofe que separa os grupos celulares, sendo verticais (acima de 0,66), multipolares (entre 0,33 e 0,65) e horizontais (abaixo de 0,32).

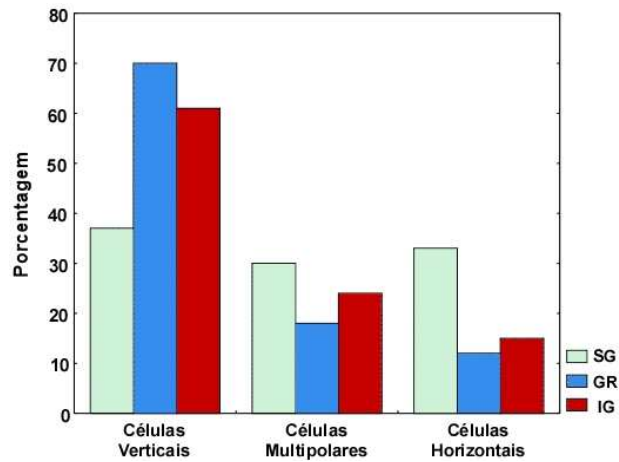


Figura 28. Distribuição dos subtipos de nNADPHd+, quanto à orientação dendrítica, no **caso R0610**. Nota-se que as células horizontais e multipolares são relativamente mais numerosas nas camadas supragranulares (SG) em comparação com os demais compartimentos laminares.

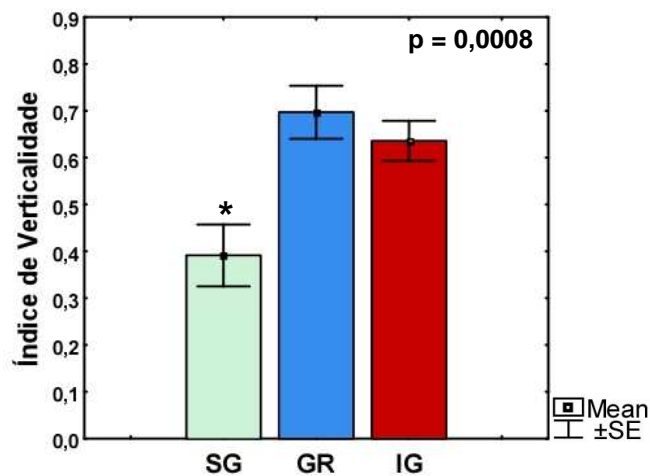


Figura 29. Análise laminar da orientação da arborização dendrítica (índice de verticalidade) dos nNADPHd+ no **caso R0703**.

Como encontramos uma grande maioria de neurônios verticais, avaliamos a seguir a direção das árvores dos nNADPHd+ verticais, através do cálculo do índice de direcionalidade (ver item 2.4 em Material e Métodos). Observamos que 68,4 % das

células verticalizadas do hemisfério R0610 eram do tipo duplo-tufo e/ou bipolar (ver item 1). Essas células predominavam nas camadas infragranulares (36 %), onde a maior parte das células era verticalizada. Nas camadas supragranulares, 16,5 % eram células em duplo-tufo e / ou bipolares e na camada IV essa população correspondeu a 15,7 %. As células que apresentavam a arborização dendrítica voltada para a substância branca corresponderam a 22,3 %, sendo que a maior parte destas distribuiu-se ao longo das camadas infragranulares (11,44 %). A outra parte encontrou-se em proporções quase iguais entre as camadas supragranulares (5,2 %) e granular (5,6 %). As células que apresentavam uma tendência da árvore dendrítica estar voltada para a pia-máter corresponderam a 9,3 % das células verticais. Essas eram menos freqüentes na camada IV (1,3 %) e distribuíram-se de forma quase igual entre as camadas supragranulares (3,6 %) e infragranulares (4,3 %) (Figura 30).

O mesmo padrão foi observado na análise das 48 células do caso R0703, no qual a maioria das células também era verticalmente orientada (44 %). Dentre as células verticalizadas desse caso, 52 % eram duplo-tufo e/ou bipolares; 43 % apresentavam a arborização dendrítica orientada para a substância branca e apenas 5 % das células verticais tinham seus dendritos voltados para a pia-máter.

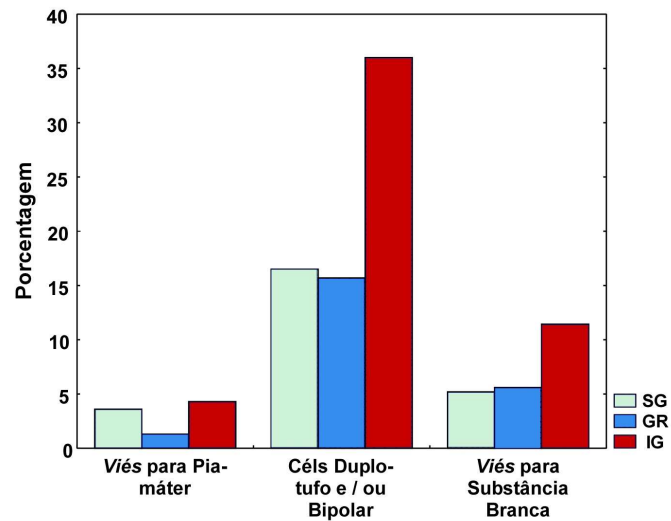


Figura 30. Índice de direcionalidade das árvores dendríticas dos (N = 743) nNADPHd+ verticais no **caso R0610**. De todas as células verticalizadas, a maioria são células em duplo-tufo e/ou bipolares. SG: compartimento supragranular; GR: compartimento granular; IG: compartimento infragranular.

Os neurônios nitridérgicos se diferenciam quanto à exuberância da sua arborização dendrítica, a qual não parece respeitar os limites de barris e camadas, e, independente da posição laminar, as células tendem a ser mais ramificadas nas colunas dos septos do que nas dos barris. Além disso, os nNADPHd+ apresentam sua arborização dendrítica verticalmente orientada, principalmente nas camadas granular e infragranulares, como observado no caso R0610, no qual todos os neurônios da área S1 foram reconstruídos, e no caso R0703, que mesmo com apenas 48 células reconstruídas esse padrão de orientação dendrítica foi observado.

5 DISCUSSÃO

5.1 Considerações metodológicas: avaliação dos casos R0610 e R0703

Esse trabalho englobou a avaliação quantitativa de S1 de dois hemisférios provenientes de dois ratos distintos (R0610 e R0703). No caso R0610, realizamos uma reconstrução completa de todos os “1360” neurônios NADPHd+ de S1. Já no caso R0703, apenas 48 células nitridérgicas puderam ser reconstruídas. Devido ao número reduzido de células analisadas no caso R0703 a comparação quantitativa com o caso R0610 ficou prejudicada.

A atividade de fundo do tecido (*background* da reação) apresentou certa variação entre os dois casos analisados. No caso R0610 a atividade de fundo foi bem mais alta do que no caso R0703 (cf Figura 9). Porém, após avaliação de todo o material, observamos que esse fator não afetou a caracterização morfológica dos nNADPHd+.

O sucesso do protocolo histoquímico em revelar a distribuição da ONS é devido à ação de fixadores, em especial o paraformaldeído, que inativam a grande maioria das diaforases presentes na célula nervosa, mantendo, contudo, a atividade diaforásica da ONS (MATSUMOTO *et al.*, 1993). Além da intensidade da fixação do tecido, outro fator que afeta a marcação histoquímica é o tempo de incubação na solução de reação. Em ambos os hemisférios quantificados, o fixador usado foi o paraformaldeído a 4 % e os cortes foram incubados na solução de revelação sob agitação suave numa estufa mantida a 37 °C. A monitorização da reação era feita a cada 20 minutos e o que determinava o fim da mesma era o aparecimento de neurônios com toda a árvore dendrítica marcada e uma marcação de neurópila intensa o suficiente para se discriminar os barris da camada IV. Logo, o tempo total de reação podia variar entre os casos. Devido ao grande número de variáveis envolvidas (intensidade da fixação,

tempo de reação, etc), é difícil determinar o real motivo da variação na atividade de fundo nos diferentes casos. Uma possibilidade seria diferenças na qualidade da perfusão, mas o volume das soluções utilizadas e o tempo de perfusão foram praticamente iguais.

No entanto, apesar dessa diferença na atividade de fundo do tecido, a avaliação quantitativa dos parâmetros morfométricos das 48 células do caso R0703 parece corroborar as observações realizadas no animal R0610.

5.2 Distribuição dos neurônios NADPH-diaforase positivos

Trabalhos realizados em diferentes espécies de mamíferos (FRANCA *et al.*, 2000, no marsupial, rato e primata; KUCHIWA *et al.*, 1994, no gato; WIENCKEN & CASAGRANDE, 2000; FRANCA *et al.*, 1997; DOMBROWSKI & BARBAS, 1996; SANDELL, 1986, no macaco; GARBOSSA *et al.* 2005; SMILEY *et al.*, 1998; LÜTH *et al.*, 1994, em humanos) revelam que, com relação a distribuição laminar, os neurônios nitridérgicos no córtex cerebral estão em maior número nas camadas infragranulares, quando comparados com as camadas supragranulares.

Na área S1 do rato, FRANCA *et al.* (2000) e FREIRE *et al.* (2004) reportaram que as camadas infragranulares apresentam o maior número de nNADPHd+, principalmente na borda entre a camada VI e a substância branca. Nas camadas supragranulares se encontra um número menor de células. Na análise laminar do nosso trabalho verificamos que o número de nNADPHd+ ao longo da área S1 do rato também é menor nas camadas supragranulares, mas tendem a se concentrar nas camadas granular e infragranulares, ao contrário dos estudos anteriores, onde o maior número de células está apenas nas camadas infragranulares (ver Figura 19). Apesar de não termos encontrado diferenças no número de células entre as camadas IV e V-VI, a metodologia usada nesse estudo é diferente da que foi aplicada nos trabalhos

anteriores, ou seja, nesse estudo a quantificação laminar foi realizada em toda a área S1 e no plano coronal, enquanto nos estudos anteriores, a análise foi feita no plano tangencial (ver a seguir).

No nosso estudo, embora também tenhamos examinado qualitativamente os nNADPHd de S1 em cortes tangenciais, nossa quantificação foi feita apenas em animais que tiveram seus hemisférios cerebrais processados no plano coronal. No plano coronal, a delimitação da borda dos barris é mais difícil, possivelmente devido à impossibilidade de se visualizar o padrão completo de distribuição espacial dos barris em fileiras que refletem as fileiras de vibrissas no focinho do animal. No entanto, optamos em fazer a quantificação no plano coronal, porque tínhamos interesse em avaliar a distribuição laminar, além da colunar. Isso permitiu, também, revelar uma organização “vertical” - ou colunar - dos dendritos dos nNADPHd+, cuja arborização poderia ter sido cortada no plano perpendicular.

VALTSCHANOFF *et al.* (1993), FRANCA & VOLCHAN (1995) e FREIRE *et al.* (2004) encontraram um predomínio de nNADPHd+ localizados nos septos, quando comparados com os barris ao avaliar a distribuição tangencial dos nNADPHd+ na camada IV do PMBSF do rato. Neste sentido, nossos dados são aparentemente divergentes (item 4.3.1), possivelmente devido ao fato de que esses estudos supracitados restringiram a avaliação à região do PMBSF, objetivando apenas uma comparação entre barril e septo. No nosso trabalho realizamos a avaliação quantitativa da distribuição e morfologia de todos os neurônios nitridérgicos ao longo de todos os subcampos de barris e das camadas corticais em toda a extensão da área somatossensorial primária (S1). Não encontramos diferenças com significância estatística com relação ao número de neurônios localizados nos barris e septos, considerando toda a coluna cortical, e não apenas a camada IV.

Além disso, como utilizamos secções espessas, é possível que, ao longo da espessura de uma dada secção, barris e septos se superponham, e que a reatividade

aumentada da região de barril nos tenha levado a classificar tal região como sendo “barril”. Assim, no caso dos cortes coronais espessos, uma célula septal pode parecer estar dentro do barril, devido à superposição do padrão de neurópila ao longo da espessura do corte. Ou seja, acreditamos na possibilidade de estar superestimando o número de células dos barris, o que explicaria o fato de não termos encontrado diferenças com relação ao número de células entre as colunas de barris e septo, ao contrário do que foi reportado para o rato, no plano tangencial, por VALTSCHANOFF *et al.* (1993), FRANCA & VOLCHAN (1995) e FREIRE *et al.* (2004). Tal possibilidade parece ser corroborada pelo fato de termos encontrado o tamanho da área do compartimento de barril significativamente maior do que o do septo (ver Figura 18). Trabalhos anteriores relatam não haver diferenças entre a área dos dois compartimentos (FRANCA, 1999; FREIRE *et al.*, 2004).

Realizamos também uma análise da distribuição dos nNADPHd+ restrita ao PMBSF, comparando a densidade entre barris e septo. Entretanto, continuamos não encontrando diferenças com significância estatística na densidade de nNADPH-d+ nos barris e nos septos. Contudo, para fazermos uma avaliação mais criteriosa, é imprescindível uma reconstrução tangencial dos cortes coronais no sistema *Neurolúcida*. No momento, estamos instalando um novo sistema que permitirá tal reconstrução em análises adicionais.

5.3 Análise da morfologia dos neurônios NADPH-diaforase positivos

5.3.1 Corpo celular

Os corpos celulares dos nNADPHd+ foram avaliados com relação à área e a forma (*form factor*).

FREIRE *et al.* (2005) reportaram a medida da área do corpo celular dos nNADPHd+ no córtex somatossensorial primário, em especial no PMBSF do camundongo. Nesse estudo, verificaram a área média desses neurônios nos barris ($103,2 \mu\text{m}^2$) e no septo ($105,3 \mu\text{m}^2$), afirmando não existir diferenças entre os nNADPHd+ desses dois compartimentos, com relação a esse parâmetro.

No presente trabalho, os nNADPHd+ localizados na camada granular apresentaram maior área de corpo celular do que as demais camadas, sendo que a média da área de corpo celular em todo o S1 foi de $125 \mu\text{m}^2$. Ao avaliar a coluna de barris e de septo separadamente, não encontramos diferenças com significância estatística (ver item 4.3.3.1)- Dessa forma, os neurônios nitridérgicos de S1 do rato também não apresentaram diferenças com relação aos neurônios da coluna de septo e barril, como observado no PMBSF do camundongo (FREIRE *et al.*, 2005), apesar da área do corpo celular ser, na média, um pouco maior que no camundongo. Com a implantação do novo sistema *NeuroLúcida* em nosso laboratório, poderemos realizar medidas tridimensionais, ou seja, volumétricas, dos corpos celulares. Essa medida é mais relevante e menos dependente do plano no qual é feita a análise.

A marcação obtida com a histoquímica para NADPHd corresponde à presença da enzima de síntese do ON (DAWSON, *et al.*, 1991) e os nNADPHd+ do tipo I podem ser considerados como fontes potenciais desse gás, inclusive os corpos celulares. Assim, as regiões que apresentassem nNADPHd+ com corpos celulares maiores, poderiam ser fontes de maior liberação de ON; o que, segundo nossos dados, corresponderia à camada IV de S1 como um todo, sendo as regiões de septo e barril semelhantes neste quesito.

No entanto, na camada IV, a neurópila reativa permite a delimitação dos dois domínios arquitetônicos, barris e os septos. Os barris apresentam maior intensidade de marcação, e a neurópila reativa também é considerada como uma possível fonte de ON. FREIRE *et al.* (2004 e 2005) sugeriram que o maior número de neurônios na

coluna de septo, como descrito por esse grupo e por VALTSCHANOFF *et al.* (1993) e FRANCA & VOLCHAN (1995), poderia funcionar como um sistema compensatório no fornecimento de ON. No nosso estudo, não encontramos diferenças significativas com relação ao número de neurônios (ver item 5.2), apesar de, no compartimento septal, apresentarem uma arborização dendrítica maior (a seguir item 5.3.2).

A forma do corpo celular é expressa por valores numéricos que variam de “0” a “1”, sendo que, quanto mais próximo de “0”, menos esférico é o corpo celular. A avaliação da forma do corpo celular realizada no caso R0610 revelou que as células das camadas supragranulares apresentaram o maior valor; enquanto que, no caso R0703, não houve diferenças entre as camadas supragranulares e granular, ou seja, as células mais esféricas não se restringiram às camadas supragranulares. Entretanto, em ambos os casos, considerando toda a população de nNADPHd+ reconstruídos o valor médio de *form factor* foi 0,81, revelando que, em geral os nNADPHd+ possuem corpos celulares esféricos.

5.3.2 Arborização dendrítica

Dentre os oito parâmetros morfométricos relacionados à arborização dendrítica, em ambos os casos analisados (R0610 e R0703), o comprimento, o número de nodos, o número de segmentos e o volume do campo dendrítico dos neurônios nitridérgicos apresentaram diferenças com significância estatística na comparação entre os compartimentos colunares (barril *versus* septo). Nesta avaliação, os neurônios localizados na coluna septal apresentaram maiores valores dos parâmetros morfométricos supracitados, do que os localizados nos barris. Esses dados corroboram os achados de FREIRE *et al.* (2005) que, utilizando medidas de campo dendrítico e de dimensão fractal, demonstraram que os nNADPHd+ da coluna do septo são realmente maiores no PMBSF; porém o modelo experimental usado foi o camundongo.

No entanto, no estudo de FREIRE *et al.* (2005) os nNADPHd+ foram escolhidos (N = 30 neurônios no barril e 30 no septo). Para isso, o principal critério para a escolha das células foi a apresentação de arborização dendrítica completa. No nosso estudo, a avaliação incluiu todos os nNADPHd+ do tipo 1 de S1.

No presente estudo, também fizemos a medida da dimensão fractal, mas por um método diferente do que foi usado por FREIRE *et al.* (2005). Esse parâmetro pode ser usado para quantificar a complexidade da árvore dendrítica e medir como as ramificações dendríticas preenchem a totalidade do campo dendrítico. Em geral, a dimensão fractal de uma estrutura biológica, aumenta em valor de acordo com o aumento da sua complexidade estrutural (FERNÁNDEZ & JELINEK, 2001).

O método fornecido pelo *Neuroexplorer* para calcular a dimensão fractal é o *box counting*, que pode ser usado em estruturas biológicas bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) (CASERTA *et al.* 1995). Diferente disso, FREIRE *et al.* (2005) usaram o método de dilatação para calcular a dimensão fractal 2D da árvore dendrítica dos nNADPHd. Segundo FERNÁNDEZ & JELINEK (2001), embora todos os métodos de análise fractal estejam verificando a relação da medida de um objeto com a sua distribuição espacial, nem sempre os resultados são os mesmos. Em função disso, a utilização de métodos diferentes limita a comparação dos valores obtidos pela análise fractal, mesmo que em uma população celular de classe similar.

Segundo FREIRE *et al.* (2005) os valores de dimensão fractal para o campo dendrítico dos nNADPHd+ no PMBSF do camundongo diferiram significativamente entre os neurônios septais (1,154) e intrabarris (1,096). No presente estudo, ao contrário do que foi descrito para o camundongo, não foi encontrado diferenças com significância estatística entre os neurônios nitridérgicos localizados na coluna de barris e de septo, com relação a esse parâmetro (ver item 4.3.3).

5.3.3 Orientação da árvore dendrítica dos nNADPHd+ e os circuitos corticais

A árvore dendrítica de boa parte dos nNADPHd+ apresentou uma orientação predominantemente vertical, sendo essa tendência mais clara nas camadas granular e infragranulares. Nas camadas supragranulares, 36% dos nNADPHd eram verticais, 31% multipolares e 33% horizontais. Em relação à orientação dendrítica, não encontramos diferenças significativas na comparação entre os nNADPHd+ localizados nas colunas de barril e de septos. A maioria das células com orientação dendrítica vertical era em duplo-tufo e/ou bipolar (ver ítem 1), ou seja, com arborização dendrítica se estendendo nas duas direções.

A correlação entre organização morfológica e funcional do córtex cerebral é de prima importância para entender a lógica dos circuitos corticais. Estudos pioneiros de CAMPBELL (1905) e BOLTON (1910) observaram, no encéfalo de pacientes ou de animais experimentais, que as camadas corticais superficiais possuem principalmente funções receptivas e associativas, enquanto as camadas mais profundas têm saídas corticofugais e comissurais. RAMÓN Y CAJAL (1911) por meio da técnica de Golgi sugeriu que as projeções dos neurônios corticais são específicas para cada lâmina.

GILBERT & WIESEL (1983) forneceram uma das primeiras interpretações funcionais com base na descrição de um circuito anatômico. Associando registro intracelular e reconstrução celular no córtex visual de gatos, eles sugeriram um circuito geral de processamento, que pode ser resumido assim: os *inputs* talâmicos chegam à camada IV, as células excitatórias dessa camada projetam para as camadas supragranulares, que então projetam para a camada V (infragranular), que depois projeta para a VI, que, por sua vez, fecha uma alça do circuito com as projeções recorrentes para a camada IV. As células lisas, presumivelmente inibitórias, não foram incluídas nessa descrição, mas esses autores reportaram que eram tipos celulares com arborização local, restrito as suas próprias camadas.

O circuito de processamento das células excitatórias no córtex de barris do rato foi assunto de abundantes estudos. Segundo SCHUBERT *et al.* (2001, 2003 e 2006) os tipos de células excitatórias e sua localização laminar são variáveis essenciais de um circuito canônico (DOUGLAS & MARTIN, 2004). Assim, as células estreladas espinhosas da camada IV apresentam um campo de conectividade amplo, porém restrito à própria camada e coluna de barril de origem. As células não-piramidais e as piramidais estreladas da camada IV recebem *inputs* intracorticais verticais de todas as camadas de uma mesma coluna (o barril de origem) e podem apresentar interação horizontal com os barris vizinhos. Nas camadas supragranulares, as células piramidais apresentam dendritos horizontais que recebem *inputs* inibitórios e excitatórios. FELDMEYER *et al.* (2002) reportaram que a fonte predominante de *inputs* excitatórios para todos os neurônios piramidais das camadas supragranulares é proveniente da camada IV do barril de origem e, segundo SCHUBERT *et al.* (2006), as células dessas camadas recebem também *inputs* da camada 5A, sendo que tanto do barril de origem quanto que dos barris vizinhos. Esses autores sugeriram que essas células se organizam segundo o microcircuito colunar canônico definido por DOUGLAS & MARTIN (2004) (ver a seguir); mas, dependendo do tipo e da localização celular, podem participar da integração transcolunar e translaminar da informação cortical.

DOUGLAS & MARTIN (2004) sugeriram um modelo para a via de processamento de sinal sensorial no córtex cerebral, a qual possui neurônios piramidais localizados nas camadas superficiais, que recebem *inputs* talâmicos, sendo alguns pré-processados na camada IV. Esses *inputs* são processados pelos dendritos dos neurônios piramidais, cujas propriedades podem ser ajustadas pelo padrão de *inputs* verticais dos neurônios lisos ou interneurônios. Os *outputs* das células piramidais são também influenciados pelas células lisas horizontais que formam uma rede seletiva. Assim, os neurônios piramidais das camadas superficiais atuam como integradores e participam de parte da seleção das informações descendentes. As células piramidais da camada V, por sua

vez, também atuam na parte seletiva do *output* dos circuitos corticais, e, no direcionamento da informação para as estruturas subcorticais.

Assim, com base na análise morfológica dos nNADPHd+ realizada por meio da descrição dos diferentes parâmetros morfométricos abordados nesse estudo, esse tipo celular parece apresentar características que se correlacionam com o circuito canônico proposto para o processamento cortical (DOUGLAS & MARTIN 2004). O padrão de distribuição da árvore dendrítica dos neurônios nitridérgicos parece refletir o circuito descrito para as células excitatórias do córtex de barril. A nossa avaliação laminar revelou que na camada I, as poucas células presentes tinham dendritos com uma orientação tangencial à superfície pial. Nas camadas II e III, as células eram horizontais, multipolares e/ou verticais na mesma proporção, ou seja, apresentavam dendritos em diversas orientações. Na camada IV, era muito clara a presença de células com a árvore dendrítica verticalmente orientada em comparação às demais camadas, assim como nas camadas V e VI.

Dessa forma, a distribuição da árvore dendrítica dos nNADPHd+ ao longo das camadas corticais poderia favorecer a interação dos mesmos com outros tipos celulares e, com isso contribuir para o processamento da informação sensorial relacionada com o tato em S1. Ao idealizarmos um “modelo” do circuito dos neurônios NADPH-d+ no córtex teríamos células distribuídas em todas as camadas, sendo que nas supragranulares, a maioria dos neurônios é multipolar ou horizontal. Na camada IV, região receptiva aonde a informação proveniente de outras regiões chega inicialmente, os neurônios são predominantemente verticais; em seguida essas informações são direcionadas para as camadas supragranulares. As camadas infragranulares remetem a informação processada no córtex para as regiões subcorticais. A maioria dos nNADPHd+ das camadas infragranulares, assim como os da camada IV, apresenta arborização dendrítica verticalizada. Além disso, independente da camada cortical, os nNADPHd+ são maiores nas colunas septais do que na coluna de barris (Figura 33).

Isso foi atribuído por FREIRE *et al.* (2004 e 2005), no PMBSF, como sendo um sistema compensatório de fornecimento de ON, associado com o maior número de células encontrado na região de septo, visto que na camada IV observa-se uma diferença clara com relação à atividade de fundo, ou seja, alta nos barris e baixa nos septos. No nosso estudo, isso não explicaria o fato de termos nNADPHd+ maiores em toda a coluna de septo, pois não temos diferença na atividade de fundo entre os compartimentos colunares, nas camadas supragranulares e infragranulares. Essa diferença observada com relação ao padrão de distribuição da árvore dendrítica pode ser correlacionada com a compartimentalização do processamento cortical. De fato, nossos dados sugerem que os microcircuitos corticais nitridérgicos adaptam sua organização espacial de acordo com a dinâmica do processamento realizado em cada região. Entretanto, esse modelo não é absoluto, visto que nNADPHd+ localizados nas camadas supragranulares também apresentam dendritos com orientação vertical, assim como os neurônios das camadas infragranulares apresentam orientação horizontal e multipolar.

Este é o primeiro trabalho quantitativo realizado com os nNADPHd+ no plano coronal, incluindo todos os subcampos de barris que compõem S1 do rato.

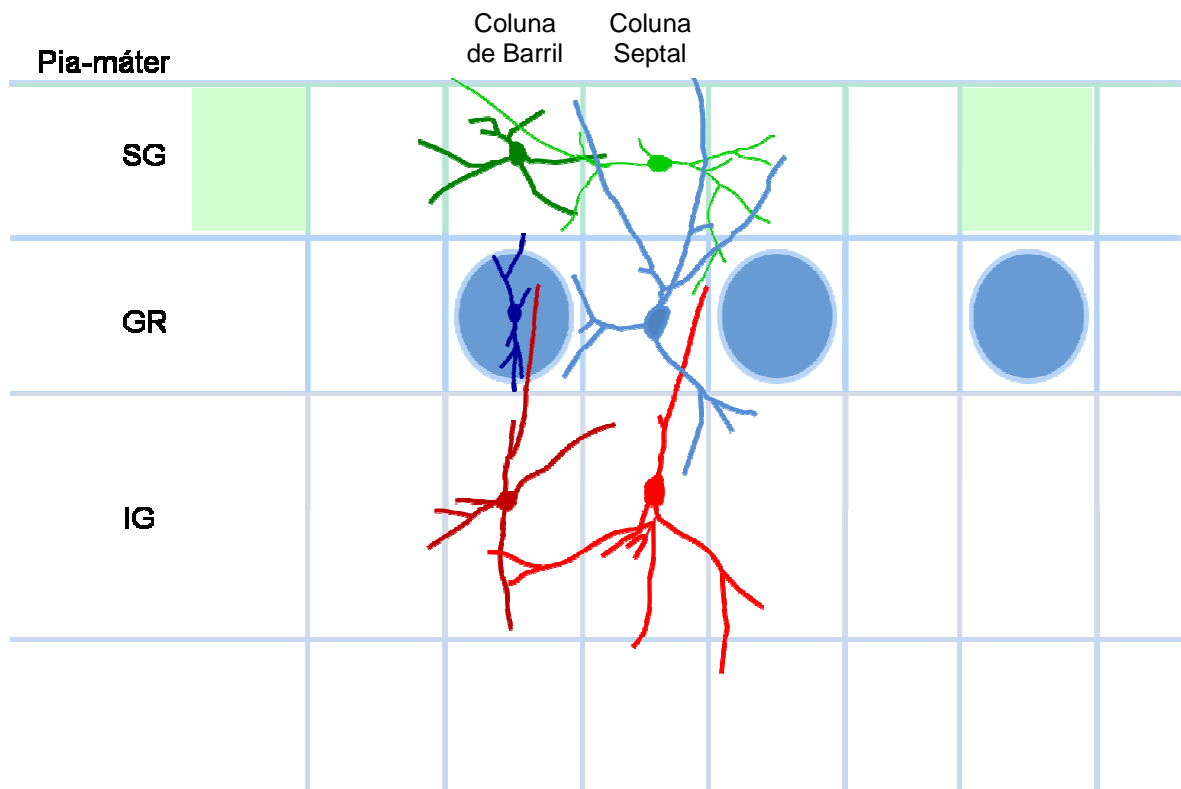


Figura 31. Modelo do circuito dos neurônios NADPHd+ observado neste estudo. O padrão de distribuição dos dendritos desses neurônios é diferente dependendo da localização laminar do corpo celular (supragranulares: multipolares e horizontais; granular e infragranulares: verticais). Os neurônios ao longo de toda a coluna septal são mais ramificados. Os nNADPHd+ representados nessa figura refere a neurônios reais do caso R0610. SG: compartimento supragranular; GR: compartimento granular; IG: compartimento infragranular.

5.4 Os neurônios NADPH-d+ e as possíveis implicações funcionais do ON

Existe evidência que o ON está envolvido na regulação do fluxo sanguíneo cortical. Segundo IADECOLA (1993), a difusão do ON sintetizado por neurônios nitridérgicos ativos pode levar à vasodilatação local, sugerindo que a liberação dessa molécula provoque o aumento do fluxo sanguíneo na microcirculação local durante a ativação neural. ESTRADA & DEFELIPE (1998) também sugerem que a produção local de ON pelos neurônios do tipo I causaria vasodilatação na região, enquanto, ao mesmo

tempo, os axônios dessas células restringiriam esse efeito provocando vasoconstrição à distância. Esses autores demonstraram uma colocalização da ONS com o neuropeptídeo Y, um neuromodulador com ação vasoconstritora.

Outra evidência de que o ON modula a microvasculatura cerebral provém do fato de que uma das isoformas da ONS está presente nas células endoteliais (BREDT *et al.*, 1991). No presente estudo, observamos, após histoquímica para NADPHd, um padrão de marcação característico ao longo da rede de vasos sanguíneos cerebrais que pode ser devido à atividade da ONS endotelial (ver Figura 16).

Durante o processo de reconstrução dos nNADPHd+, observamos com freqüência que essas células distribuam-se ao redor dos vasos ou apresentavam alguns dendritos próximos aos mesmos. Apesar disso, uma avaliação quantitativa desta relação espacial ainda não foi realizada, mas acreditamos ser esta de grande importância para entender o envolvimento dos neurônios nitridérgicos no circuito de processamento da informação sensorial no córtex e por isso constitui uma das perspectivas futuras desse estudo.

Na avaliação qualitativa da arborização dendrítica dos nNADPHd+ observamos também que prolongamentos de células vizinhas pareciam fazer contatos entre si. FUKUDA *et al.* (2006) reportaram que os neurônios GABAérgicos parvalbumina-positivos localizados nas camadas II/III do córtex visual do gato formam redes por meio de junções comunicantes do tipo *gap*, ao longo de seus dendritos. Ao comparar essas redes neuronais com as colunas de orientação nessa região do córtex, esses autores verificaram que as células parvalbumina-positivas distribuem-se aleatoriamente sobrepondo e/ou cobrindo diferentes colunas de orientação. As células nitridérgicas são inibitórias como as parvalbumina-positivas e parte delas também expressam outras proteínas ligadoras de Ca^{2+} (KUBOTA & KAWAGUCHI, 1994; YAN & GAREY, 1997). É possível que os contatos dendríticos correspondam a pontos de comunicação entre os

nNADPHd+, que estariam modulando o funcionamento dos neurônios no processamento da informação tátil ao longo de S1 e o aporte sanguíneo local.

6 CONCLUSÕES

Os neurônios nitridérgicos presentes no córtex somatossensorial primário do rato adulto se dispõem ao longo de todas as camadas e colunas, embora tendam a se concentrar nas camadas granular e infragranulares, sem apresentar preferência por um compartimento colunar.

Há um predomínio de nNADPHd+ com arborização dendrítica orientada verticalmente, principalmente nas camadas granular e infragranulares. A maioria desses nNADPHd+ são células bipolares e / ou em duplo-tufo.

Os nNADPHd+ localizados nas colunas septais são mais ramificados e possuem um campo dendrítico com maior extensão, quando comparados com os neurônios dos barris. Em ambos os casos, a arborização dendrítica não respeita os limites arquitetônicos de barris e/ou camadas corticais. Além disso, independente do compartimento em que esses neurônios se localizam, células vizinhas parecem fazer contatos entre si ao longo de suas ramificações dendríticas.

REFERÊNCIAS

AKTAN, F.. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Science**; v. 25;75(6), p. 639-53, 2004.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**; v. 1;357(Pt 3), p. 593-61, 2001.

ALLOWAY, K.D. Information processing streams in rodent barrel cortex: the differential functions of barrel and septal circuits. **Cereb Cortex.**; v. 18(5), p.979-89, 2008.

ANDREW, P.J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res.**; v. 15;43(3), p. 521-31, 1999.

AOKI, C.; FENSTEMAKER, S.; LUBIN, M.; GO, C.G. Nitric oxide synthase in the visual cortex of monocular monkeys as revealed by light and electron microscopic immunocytochemistry. **Brain Res.**; v. 620, p. 97-113, 1993.

BARONE, P.; KENNEDY, H. Non-uniformity of neocortex: areal heterogeneity of NADPH-diaphorase reactive neurons in adult macaque monkeys. **Cereb Cortex.**, v. 10(2), p.160-74, 2000.

BEN-ARI, Y.; ANIKSZTEJN, L.; BREGESTOVSKI, P. Protein kinase C modulation of NMDA currents: an important link for LTP induction. **Trends Neurosci.**; v. 15(9), p. 333-9, 1992.

BENNETT-CLARKE, C.A.; CHIAIA, NL; RHOADES, R.W. Contributions of raphe-cortical and thalamocortical axons to the transient somatotopic pattern of serotonin immunoreactivity in rat cortex. **Somatosens Mot Res.**; v. 14(1), p. 27-33, 1997.

BISHOP, A. & ANDERSON, J.E. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. **Toxicology**; v. 15;208(2), p. 193-205, 2005.

BOLTON J. A contribution to the localization of cerebral function, based on the clinico-pathological study of mental disease. **Brain**. 22:26–147, 1910.

BOULTON, C.L.; SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. **Neurosci.**; v. 69(3), p. 699-703, 1995.

BRENMAN, J.E.; BREDT, D.S. Synaptic signaling by nitric oxide. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 7, p. 374-378, 1997.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**; v. 8, p. 3-11, 1992.

BREDT, D.S.; GLATT, C.E.; HWANG, P.M.; FOTUHI, M.; DAWSON, T.M.; SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. **Neuron**; v. 7, p. 615-624, 1991.

BREDT DS, HWANG PM, SNYDER SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**; v. 25;347(6295), p. 768-770, 1990.

BRUNO, R.M. & SAKMANN, B. Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. **Science**; v. 16;312(5780), p. 1622-7, 2006.

BRUNO, R.M. & SIMONS, D.J. Feedforward mechanisms of excitatory and inhibitory cortical receptive fields. **J Neurosci.**; v. 15;22(24), p. 10966-10975, 2002.

BUZSÁKI, G.; GEISLER, C.; HENZE, D.A.; WANG, X.J. Interneuron Diversity series: Circuit complexity and axon wiring economy of cortical interneurons. **Trends Neurosci.**; v. 27(4), p. 186-93, 2004.

CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELLI, E.; BUTTERFIELD D.A.; STELLA, A.M. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nat Rev Neurosci.**; v. 8(10), p.766-75, 2007.

CAMPBELL A. *Histological Studies on the Localization of Cerebral Function.* Cambridge,UK: Cambridge Univ. Press. 1905.

CASERTA, F.; ELDRED, W.D.; FERNANDEZ, E.; HAUSMAN, R.E.; STANFORD, L.R.; BULDEREV, S.V.; SCHWARZER, S.; STANLEY, H.E. Determination of fractal dimension of physiologically characterized neurons in two and three dimensions. **J Neurosci Methods.**; v. 56(2), p.133-144, 1995.

CHIEN, W.L.; LIANG K.C.; TENG, C.M.; KUO, S.C.; LEE, F.Y.; FU, W.M. Enhancement of long-term potentiation by a potent nitric oxide-guanylyl cyclase activator, 3-(5-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl-indazole. **Mol Pharmacol.**; 63(6), p.1322-1328, 2003.

CHRISTOPHERSON, K.S.; BREDT, D.S. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. **J Clin Invest.**; v. 15;100(10), p. 2424-9, 1997.

DAWSON, T.M.; BREDT, D.S.; FOTUHI, M.; HWANG, P.M.; SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A.**; v. 88, p. 7797-7801, 1991.

DAWSON, T.M.; SNYDER, S.H. Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J Neurosci.**, v. 14, p. 5147-5159, 1994.

DEFELIPE, J.; ALONSO-NANCLARES, L.; ARELLANO, J.I. Microstructure of the neocortex: comparative aspects. **J Neurocytol.**; v. 31(3-5), p.299-316, 2002.

DIAMOND, M.E.; HUANG, W.; EBNER, F.F. Laminar comparison of somatosensory cortical plasticity. **Science**; v. 265, p. 1885-1888, 1994.

DOMBROWSKI, S.M.; & BARBAS, H. Differential expression of NADPH diaphorase in functionally distinct prefrontal cortices in the Rhesus monkey. **Neurosci.**; v. 72, p. 49-62, 1996.

DOUGLAS, R.J, & MARTIN, K.A. Neuronal circuits of the neocortex. **Annu Rev Neurosci.**; v. 27, p. 419-51, 2004.

EDWARDS, T.M.,; RICKARD, N.S. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. **Neurosci Biobehav Rev.**; v. 31(3), p. 413-25, 2007.

EGBERONGBE, Y.I.; GENTLEMAN, S.M.; FALKAI, P.; BOGERTS, B.; POLAK, J.M.; ROBERTS, G.W. The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. **Neurosci.**; v. 59, p. 561-578, 1994.

ELFERING S.L., SARKELA T.M., GIULIVI, C. Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase. **J Biol Chem.**; v. 11, 277(41), p. 38079-38086, 2002.

ESTRADA, C.; DEFELIPE, J. Nitric oxide-neurons in the neocortex: Morphological and functional relationship with intraparenchymal microvasculature. **Cereb Cortex.**; v. 8, p. 193-203, 1998.

FELDMAN, D.E.; BRECHT, M. Map plasticity in somatosensory cortex. **Science**; v. 4;310(5749), p. 810-815, 2005.

FELDMAN ML, PETERS A. The forms of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat. **J Comp Neurol.**; v. 15;179(4), p. 761-793, 1978.

FELDMEYER, D.; LÜBKE, J.; SAKMANN, B. Efficacy and connectivity of intracolumnar pairs of layer 2/3 pyramidal cells in the barrel cortex of juvenile rats. **J Physiol.**; v. 1;575 (Pt 2), p. 583-602, 2006.

FELDMEYER, D.; ROTH, A.; SAKMANN, B. Monosynaptic connections between pairs of spiny stellate cells in layer 4 and pyramidal cells in layer 5A indicate that lemniscal and paralemniscal afferent pathways converge in the infragranular somatosensory cortex. **J Neurosci.**; v. 30;25(13), p. 3423-31, 2005.

FERNÁNDEZ, E.; JELINEK, H.F. Use of fractal theory in neuroscience: methods, advantages, and potential problems. **Methods.**; v. 24(4), p.309-21, 2001.

FÖRSTERMANN, U.; SCHMIDT, H.H.H.W.; POLLOCK, J.S.; SHENG, H.;MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D.; NAKANE, M.; MURAD, F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. **Biochem Pharmacol.**; v. 42, p. 1849-1857, 1991.

FLORENZANO, F.; VISCOMI, M.T.; AMADIO, S.; D'AMBROSI, N.; VOLONTÉ, C.; MOLINARI, M. Do ATP and NO interact in the CNS? **Prog Neurobiol.**; v. 84(1), p. 40-56, 2008.

FRANCA, J.G.; VOLCHAN, E. NADPH diaphorase histochemistry as a marker for barrels in rat somatosensory cortex. **Braz J Med Biol Res.**; v. 28, p. 787-790, 1995.

FRANCA, J.G.; DO-NASCIMENTO, J.L.M.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; QUARESMA, J.A.S.; SILVA, A.L.C. NADPH-diaphorase activity in area 17 of the squirrel monkey visual cortex: neuropil pattern, cell morphology and laminar distribution. **Braz J Med Biol Res.**; v. 30, p. 1093-1105, 1997.

FRANCA, J.G. NADPH-diaforase no isocórtex de mamíferos: Neurônios do tipo I e neurópila reativa no córtex visual e somatossensorial. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro: UFRJ, IBCCF, 1999.

FRANCA J.G.; VOLCHAN E.; JAIN, N.; CATANIA, K.C.; OLIVEIRA, R.L.; HESS, F.F.; JABLONKA, M.; ROCHA-MIRANDA, C.E.; KAAS, J.H. Distribution of NADPH-diaforase cells in visual and somatosensory cortex in four mammalian species. **Brain Res.**; v. 12;864(2), p. 163-75, 2000.

FREIRE, M.A.M.; FRANCA, J.G.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; PEREIRA JR., A. Neuropil reactivity, distribution and morphology of NADPH diaforase type I neurons in the barrel córtex of the adult mouse. **J Chem Neuroanat.**; v. 30(2-3), p.71-81, 2005.

FREIRE M.A.M.; GOMES-LEAL W.; CARVALHO, W.A.; GUIMARÃES, J.S.; FRANCA, J.G.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; PEREIRA, A. JR. A morphometric study of the progressive changes on NADPH diaforase activity in the developing rat's barrel field. **Neurosci Res.**; v. 50(1), p.55-66, 2004.

FRICK A, FELDMEYER D, SAKMANN B. Postnatal development of synaptic transmission in local networks of L5A pyramidal neurons in rat somatosensory cortex. **J Physiol.**; v. 15;585(Pt 1), p. 103-116, 2007.

FUKUDA, T., KOSAKA, T., SINGER, W., GALUSKE, R.A.W. Gap Junctions among Dendrites of Cortical GABAergic Neurons Establish a Dense and Widespread Intercolumnar Network. **J. Neurosci.**, v. 26, p. 3434-3443, 2006.

GABBOTT, P.L.A., BACON, S.J. Co-localisation of NADPH diaforase activity and GABA immunoreactivity in local circuit neurones in the medial prefrontal cortex (mPFC) of the rat. **Brain Research**, v. 699, p. 321-328, 1995.

GARBOSSA D, FONTANELLA M, TOMASI S, DUCATI A, VERCELLI A. Differential distribution of NADPH-diaforase histochemistry in human cerebral cortex. **Brain Research**; v. 9;1034(1-2), p. 1-10 , 2005.

GLASER, J.R.; AND GLASER, E.M. Neuron Imaging with Neurolucida – A PC-based System for Image Combining Microscopy. **Comput Med Imaging Graph.**; v.14, nº 5, p. 307-317, 1990.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends Neurosci.**; v. 14, p. 60-67, 1991.

GILBERT, C.D. & WIESEL, T.N. Functional organization of the visual cortex. **Prog. Brain Res.**; v. 58, p. 209-218, 1983.

GOLDSTEIN, L.A.; KURZ, E.M.; KALKBRENNER, A.; SENNELAUB, D.R. Changes in dendritic morphology of rat spinal motoneurons during development and after unilateral target deletion. **Dev. Br. Res.**; v. 73, p.151-163, 1993.

GUIX, F.X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUÑOZ, F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog Neurobiol.**; v. 76(2), p. 126-52, 2005.

HASHIKAWA, T.; LEGGIO, M.G.; HATTORI, R.; YUI, Y. Nitric oxide synthase immunoreactivity colocalized with NADPH - diaphorase histochemistry in monkey cerebral cortex. **Brain Res.**; v. 641, p. 341-349, 1994.

IADECOLA, C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? **Trends Neurosci.**; v. 16, p. 206-214, 1993.

JONES, E.G. Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. **J Comp Neurol.**; v. 160, p. 205-267, 1975.

JONES, E.G. & HENDRY, H.C. Co-localization of GABA and neuropeptides in neocortical neurons. **Trends Neurosci.**; p. 71-76, 1986.

JONES, E.G. & WISE, S.P. Size, laminar and columnar distribution of efferent cells in the sensory-motor cortex of monkeys. **J Comp Neurol.**; 175:391-438, 1977.

KIM, U. & EBNER, F.F. Barrels and septa: separate circuits in rat barrels field cortex. **J Comp Neurol.**; 408, pp. 489-505, 1999.

KUBOTA, Y. & KAWAGUCHI, Y. Three classes of GABAergic interneurons in neocortex and neostriatum. **Jpn J Physiol.**; v. 44, p. S 145-S 148, 1994.

KUCHIIWA, S.; KUCHIIWA, T.; MORI, S.; NAKAGAWA, S. NADPH diaphorase neurones are evenly distributed throughout cat neocortex irrespective of functional specialization of each region. **NeuroReport.**; v. 5, p. 1662-1664, 1994.

KRUMENACKER, J.S.; HANAFY, K.A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain Res Bull.**; v. 15;62(6), p. 505-15, 2004.

LAND, P.W.; SIMONS, D.J. Metabolic and structural correlates of the vibrissae representation in the thalamus of the adult rat. **Neurosci Lett.**; v. 10;60(3), p. 319-24, 1985.

LAND, P.M. & ERICKSON, S.L. Subbarrel domains in rat somatosensory (S1) cortex. **J Comp Neurol.**; v. 3;490(4), p. 414-26, 2005.

LI, H.; POULOS, T.L. Structure-function studies on nitric oxide synthases. **J Inorg Biochem.**; v. 99(1), p. 293-305, 2005.

LYONS, C.R; ORLOFF, G.J.; CUNNINGHAM, J.M. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. **J Biol Chem.**; v. 25;267(9):6370-4, 1992.

LÜBKE, J.; FELDMEYER, D. Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex. **Brain Struct Funct.**; v. 212(1), p. 3-17, 2007.

LÜBKE, J.; ROTH, A.; FELDMEYER, D.; SAKMANN, B. Morphometric analysis of the columnar innervation domain of neurons connecting layer 4 and layer 2/3 of juvenile rat barrel cortex. **Cer Cortex.**; v 13(10), p. 1051-63, 2003.

LÜTH, H.-J.; HEDLICH, A.; HEIDEGARD, H.; WINKELMANN, E.; MAYER, B. Morphological analyses of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase positive structures in human visual cortex. **J Neurocytol.**; v. 23, p. 770-782, 1994.

MATSUMOTO, T.; NAKANE, M.; POLLOCK, J.S.; KUK, J.E.; FÖRSTERMANN, U. A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. **Neurosci Lett.**; v. 155, p. 61-64, 1993.

MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? **J Clin Invest.**; v. 1;100(9), p. 2146-52, 1997.

MONYER H, MARKRAM H. Interneuron Diversity series: Molecular and genetic tools to study GABAergic interneuron diversity and function. **Trends Neurosci.**; v. 27(2), p. 90-97, 2004.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.**; v. 43, p. 109-142, 1991.

MOUNTCASTLE, V.B. The columnar organization of the neocortex. **Brain**, v. 120, p. 701-722, 1997.

NATHAN, C.; XIE, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**; v.23;78(6), p. 915-8, 1994.

NEUROLUCIDA - users guide, 2004.

PETERS, A.; JONES, E.G. Classification of cortical neurons. In: Peters, A. Jones, EG. Cellular components of the cerebral cortex. **Plenum Press**. New York, pp 107-121, 1984.

RAMÓN y CAJAL S. *Histologie* du SystemeNerveux de l'Homme et des Vertebres. Vol.2. Paris: Maloine, 1911.

RICE, F.L. Comparative aspects of barrel structure and development. In: Jones E.G., Peters, A. Cerebral Cortex: The Barrel Cortex of Rodents. New York: **Plenum Publishing Corporation**; v. 11, p. 1-75, 1995.

SANDELL, J.H. NADPH diaphorase histochemistry in the macaque striate cortex. **J Comp Neurol.**; v. 251, p. 388-397, 1986.

SARID L, BRUNO R, SAKMANN B, SEGEV I, FELDMEYER D. Modeling a layer 4-to-layer 2/3 module of a single column in rat neocortex: interweaving in vitro and in vivo experimental observations. **Proc Natl Acad Sci U S A.**; 104(41):16353-8., 2007.

SANTIAGO LF, ROCHA EG, FREIRE MA, DIAS IA, LENT R, HOUZEL JC, PIKANÇO-DINIZ CW, PEREIRA A JR, FRANCA JG. The organizational variability of the rodent somatosensory cortex. **Rev Neurosci.**; 18(3-4):283-94, 2007.

SCHERER-SINGLER, U.; VINCENT, S.R.; KIMURA, H.; MCGEER, E.G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **J Neurosci Methods.**; v. 9, p. 229-234, 1983.

SCHUBERT, D.; KÖTTER, R.; LUHMANN, H.J.; STAIGER, J.F. Morphology, electrophysiology and functional input connectivity of pyramidal neurons characterizes a genuine layer Va in the primary somatosensory cortex. **Cer Cortex**; v. 16(2), p. 223-36, 2006.

SCHUBERT, D.; KÖTTER, R.; ZILLES, K.; LUHMANN, H.J.; STAIGER, J.F. Cell type-specific circuits of cortical layer IV spiny neurons. **J Neurosci.**; v. 1;23(7), p. 2961-2670, 2003.

SCHUBERT D, STAIGER JF, CHO N, KÖTTER R, ZILLES K, LUHMANN HJ. Layer-specific intracolumnar and transcolumar functional connectivity of layer V pyramidal cells in rat barrel cortex. **J Neurosci.**; v. 15;21(10), p. 3580-3592, 2001.

SHEPHERD, G.M.; SVOBODA, K. Laminar and columnar organization of ascending excitatory projections to layer 2/3 pyramidal neurons in rat barrel cortex. **J Neurosci.**; v. 15;25(24), p.5670-5679, 2005.

SHIBUKI, K.; OKADA, D. Endogenous nitric oxide release is required for long-term synaptic depression in the cerebellum. **Nature**, v. 349, p. 326-328, 1991.

SIMONS, D.J.; WOOLSEY, T.A.; Morphology of Golgi-Cox-impregnated barrel neurons in rat Sml cortex. **J Comp Neurol.**; v. 20;230(1), p. 119-32, 1984.

SMILEY, J.F.; LEVEY, A.I.; MESULAM, M.-M. Infracortical intersitial cells concurrently expressing M2-muscarinic receptors, acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase in the human and monkey cerebral cortex. **Neurosci.**; v. 84, p. 755-769, 1998.

SON, H.; HAWKINS, R.D.; MARTIN, K.; KIEBLER, M.; HUANG, P.L.; FISHMAN M.C.; KANDEL, E.R. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. **Cell**; v. 13;87(6), p. 1015-23, 1996.

VAN DER LOOS, H.; WOOLSEY, T.A. Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs. **Science**; v. 26;179(71), p. 395-8, 1973.

VAN DER LOOS, H. Neuronal circuitry and its development. **Prog Brain Res.**; v. 45, p. 259-78, 1976.

VALTSCHANOFF, J.G.; WEINBERG, R.J.; KHARAZIA, V.N.; SCHMIDT, H.H.H.W.; NAKANE, M.; RUSTIONI, A. Neurons in rat cerebral cortex that synthesize nitric oxide: NADPH diaphorase histochemistry, NOS immunocytochemistry, and colocalization with GABA. **Neurosci Lett.**; v. 157, p. 157-161, 1993.

VEINANTE, P.; DESCHENES, M. Single- and multi-whisker channels in the ascending projections from the principal trigeminal nucleus in the rat. **J Neurosci.**; 19(12):5085-95, 1999.

VINCENT, S.R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neurosci.**; v. 46, p. 755-784, 1992.

VOLCHAN, E.; FRANCA, J.G. Distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons in the opossum neocortex. **Braz J Med Biol Res.**; v. 27, p. 2431-2435, 1994.

WELKER, C. Receptive fields of barrels in the somatosensory neocortex of the rat. **J Comp Neurol.**; v. 15;166(2), p. 173-89, 1976.

WIENCKEN AE, CASAGRANDE VA. The distribution of NADPH diaphorase and nitric oxide synthetase (NOS) in relation to the functional compartments of areas V1 and V2 of primate visual cortex. **Cer Cortex.**; v 100(5), p. 499-511, 2000.

WOOLSEY, T.A.; VAN DER LOOS, H. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S1) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. **Brain Res.**; v. 17, p. 205-242, 1970.

WOOD, J. & GARTHWAITE, J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: Implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. **Neuropharmacol.**; v. 33, p. 1235-1244, 1994.

WU, H.H.; WILLIAMS, C.V.; MCLOON, S.C. Involvement of nitric oxide in the elimination of a transient retinotectal projection in development. **Science**; v. 265, p. 1593-1595, 1994.

YAN, X.X.; GAREY, L.J. Morphological diversity of nitric oxide sythesising neurons in mammalian cerebral cortex. **J Hirnforsch.**; v. 38, p. 165-172, 1997.

ZILLES,K. A stereotaxic atlas in the córtex of The Rat. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York Tokyo, 1995.

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](#)