



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
MORFOLÓGICAS

Marissol dos Santos Freitas Themóteo Pereira

Isolamento e Caracterização de Células

Neocorticais por Citometria de Fluxo

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PRÉ-REQUISITO À
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS
MORFOLÓGICAS

Rio de Janeiro
Novembro
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Marissol dos Santos Freitas Themóteo Pereira

Isolamento e Caracterização de Células

Neocorticais por Citometria de Fluxo

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO COMO PRÉ-REQUISITO À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

Orientadora: Profa. Daniela Uziel Rozental

Rio de Janeiro
Novembro
2009

Pereira, Marissol dos Santos Freitas Themóteo
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS NEOCORTICAIS POR
CITOMETRIA / MARISSOL DOS SANTOS FREITAS THEMOTEO PEREIRA, RIO DE
JANEIRO, 2009.
120 f
XVII

Orientadora: Profa. Daniela Uziel Rozental

Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) – UFRJ – Instituto de
Ciências Biomédicas – Programa de Pós-Graduação em Ciências
Morfológicas, 2009.

1. Desenvolvimento 2. Córtex Cerebral 3. Citometria de Fluxo I. Uziel,
Daniela II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas. IV. Mestre.

Marissol dos Santos Freitas Themóteo Pereira

Isolamento e Caracterização de Células Neocorticais por Citometria de Fluxo

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Departamento de Anatomia, no Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfológicas.

Esta dissertação foi desenvolvida, no Laboratório de Ontogênese e Regeneração Neural, sob a orientação da Profa. Daniela Uziel Rozental e contou com o apoio financeiro das seguintes entidades: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico /Programa de Apoio aos Grupos de Excelência, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho, Fundação Universitária José Bonifácio.

Rio de Janeiro
2009

AGRADECIMENTOS

Não são poucas as pessoas que devo citar aqui. Tentarei não esquecer ninguém, mas já adianto minhas desculpas caso o faça porque minha memória é uma de minhas habilidades neurocognitivas menos desenvolvida. Quem me conhece, sabe.

Aos colaboradores de laboratório, vizinhos ou distantes, científicos ou nem tanto, meu humilde “obrigada”. Ao meu adorável revisor, prof. Marcelo Felipe Santiago pela PACIÊNCIA e pela enorme contribuição aos 45 min do 2º tempo, salvando-me da “prorrogação”; Alessandra Granato pela grande colaboração na citometria do trabalho; Loraine Campanati por 70% da bibliografia citada; Grasiela Ventura, Rafael Antão, Michele Lourenço, Tainá Maia, Laura de Menezes pelas “mãos” extras na bancada e pela companhia de trabalho; Professor João Ricardo Lacerda de Menezes pela inspiração e consultoria científicas; Carla Moreira Furtado pela consultoria técnica; Elizabeth Moraes pelos ensinamentos eternos; Priscila Morterá pela amizade tão leve e divertida; Flávio Brayner Ramalho, nosso Dr. Hollywood, pela amizade, pelas caronas e pelo precinho amigo na minha futura lipoescultura; Anna Lenice, Leo Morita e Zé, vizinhos tão divertidos; queridíssimo Hamilton da Silva Jr. que não consegue se libertar de mim nem quando entra sorrateiro no MSN às 24h na ilusão de trabalhar em paz; Sheine Schanuel pelos raros e breves, mas sempre muito agradáveis encontros no MSN; Luís Fernando Fragoso por estar sempre pronto a ajudar e trocar conhecimentos; tia Ana, Thiago de Almeida Pereira e tio Fernando por todo carinho que sempre me demonstraram; tia Jô, tio Araújo e Chaiene pelo “colinho” nos meus momentos mais divertidamente tristes; os novos e queridos amigos Sândalos, Simone e cia

pela tão difícil, sobrenatural e muito abençoada PAZ para voltar a escrever esse trabalho; tia Creusa e tia Lúgia pelo carinho e pela PAZ que tanto está me ajudando a esperar que tudo volte aos seus devidos lugares (sejam eles quais forem); Luiz Paulo Ribeiro e Frederico Gomes, meus instrutores de natação que tanto me incentivam e perturbam, sempre me exaurindo todas as energias; Adiel por aturar minha bagunça “cinematográfica” no biotério; Ludmila Ribeiro e Lena Dalva pela paciência e suporte técnico-administrativo; Professor Roberto Lent por aturar meus acessos de raiva, beber meu café e pela dedicação à ciência em todos os níveis.

Apesar do natural afastamento e dos tão diversos caminhos assumidos, jamais deixarei de agradecer àqueles que pelos 4 anos da graduação tanto contribuíram de uma maneira ou de outra para minhas conquistas: Luiz Fernando Quintanilha, Arthur Ribeiro, Alexandre Figueiredo, Luize Lima, Ana Paula Rangel e Bruno Paredes, os melhores companheiros de curso que alguém pode ter.

Para alguém carente e carinhosa como eu, nada machuca mais do que a distância. Não poder dar um abraço apertado, um beijo melado ou simplesmente ter uma pessoa amada do lado. Por isso, muitas vezes me doeu bastante a saudade de algumas pessoas. Mas a verdadeira amizade, como a forma mais pura e forte de amor, supera tudo e se sacrifica para ver o sucesso daqueles que tanto admira. Liuca Yonaha, Bruna de Andrade, Eduardo Carange, Renata Garcia, Danilo Furtado, Mauren Carvalho, Sabrina Gonçalves, Fabiana Bandeira, Patrícia Pestana e Suzana Kahn, dói muito ficar longe de vocês, mas me orgulha infinitas vezes mais saber que faço parte de suas vidas e vocês da minha. Márcio André Guimarães, o mais ausente de todos, mas o que merece, além de

agradecimentos, Parabéns especiais pela conquista tão almejada. Parabéns, meu amigo-amor diplomata.

Professor Renato Rozental, apesar do tão recente convívio, já o admiro imensamente e agradeço a confiança e o respeito depositados em mim. Desejo imensamente que sua chegada seja apenas o início de uma frutífera colaboração profissional. Renato Rozental, agora sem títulos porque já te considero um amigo, não posso deixar de agradecer o carinho e a paciência com os quais me ajudou a superar os momentos finais do meu mestrado. Arrisco dizer que ganhei um Amigo, sinto-me honrada pela sua amizade e pretendo retribuir à altura.

À minha orientadora Daniela Uziel Rozental devo muito além do que o respeito e a admiração que fazem do meu trabalho minha maior alegria. Um carinho inabalável me faz querer caminhar a seu lado para aprender ciência da maneira mais prazerosa possível. E é com imensa alegria que parabenizo você e o Renato pela nova componente do “clã” e desejo que Deus abençoe muito a chegada de Sophie em suas vidas. Vocês merecem toda essa felicidade.

Bom, para uma geminiana típica como eu, nada pior do que escolher. Por isso, entre todos os citados acima, sou incapaz de dizer quem é mais importante. Todos são pedacinhos das minhas conquistas. Mas não posso negar que os próximos merecem o título de “os mais importantes”.

Fernando de Almeida Pereira por simplesmente existir e ser o amor da minha vida. Obrigada por absolutamente tudo e, principalmente, por me fazer a pessoa mais FELIZ do mundo sob qualquer circunstância. Você é único e eterno.

Às próximas três pessoas, dedico essa dissertação. Quando minha vida virou de pernas para o ar e quase coloquei tudo a perder, a vida abençoou-me com

esses três Amigos especiais. Luciana Pantoja, não pensei que sua dedicação e carinho fossem tão grandes. Obrigada por ficar tão incondicionalmente a meu lado e chorar junto comigo. Desejo que Deus te faça infinitas vezes mais feliz do que me faz. Carla Moreira Furtado, minha querida “pequetinha”, mal chegou e já causou quizumba! Foi afinidade à 1ª vista! E tão logo pôde, não perdeu a chance de me ensinar o valor da verdadeira Amizade. Você foi a pessoa que mais me ajudou a transformar a tristeza em esperança e até alegria. Você é sinônimo de lealdade. Jean Pierre Mendes Lima, meu “anjo-da-guarda filho de Oxossi irmão gêmeo geminiano”. Definitivamente a mais reveladora de todas as afinidades. Gêmeos sobrenaturalmente quase idênticos, dividimos orientadores, segredos, pensamentos, opiniões, sonhos, farras, gargalhadas, patadas... e muito carinho. A esse negrinho insolente devo a conclusão do meu mestrado porque foi o 1º a me estender as mãos e apontar o caminho mais curto e “louco” para o fim do meu sofrimento. Sem jamais mentir, fingir e me fazendo rir SEMPRE. Eu não terminaria sem vocês.

Por fim, os Essenciais: Deus e minha família. Um é tão importante quanto o outro porque um é o outro. Eu jamais chegaria aqui sem o Amor deles. Deus, obrigada: por se manifestar em minha vida nos mínimos detalhes a cada segundo e pela família onde me “desovou” há 26 anos atrás. Pai e Mãe, obrigada pelos ensinamentos e exemplos tão importantes em todas as escolhas que fiz, sem exceção. Mesmo naquelas em que decidi “contrariá-los”. Obrigada por sempre nos incentivarem a ir além, abrindo mão, muitas vezes, das próprias satisfações e por sempre nos colocarem em primeiro lugar. Irmã Lua, amo você apesar de todas as brigas. Nunca vou esquecer das suas tentativas de fazer meu pai me convencer a

parar de estudar porque eu estava à beira da loucura. Obrigada por ser tão doida, companheira e amiga, mas, principalmente, por ser tão forte e estar conosco, VIVA e PERFEITA, depois de tudo. Tia Risete, tia Ruth, tia Maria Ducarmo, tio Jurandir, Mirella e Ighor, obrigada pelo apoio e carinho sempre. Vovó Maria, obrigada por todo seu amor, pelas suas preces tão poderosas, por ser a índia mais linda e inteligente por manter nossa família unida com tanta doçura e força. Vovô Moacyr e vovó Catarina, obrigada por seu amor e dedicação que superaram a mais dura das barreiras. Diante dos últimos tristes eventos da minha vida, vocês foram a minha Estrutura, a minha Luz e fizeram valer a máxima: “Família, uma idéia genial de Deus”.

Obrigada a todos com Amor.

“Você pode ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não se esqueça de que sua vida é a maior empresa do mundo. E você pode evitar que ela vá a falência. Há muitas pessoas que precisam, admiram e torcem por você. Gostaria que você sempre se lembrasse de que ser feliz não é ter um céu sem tempestade, caminhos sem acidentes, trabalhos sem fadigas, relacionamentos sem desilusões. Ser feliz é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros. Ser feliz não é apenas valorizar o sorriso, mas refletir sobre a tristeza. Não é apenas comemorar o sucesso, mas aprender lições nos fracassos. Não é apenas ter júbilo nos aplausos, mas encontrar alegria no anonimato. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “não”. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta. Ser feliz é deixar viver a criança livre, alegre e simples que mora dentro de cada um de nós. É ter maturidade para falar “eu errei”. É ter ousadia para dizer “me perdoe”. É ter sensibilidade para expressar “eu preciso de você”. É ter capacidade de dizer “eu te amo”. É ter humildade da receptividade. Desejo que a vida se torne um canteiro de oportunidades para você ser feliz...”

E, quando você errar o caminho, recomece.

Pois assim você descobrirá que ser feliz não é ter uma vida perfeita. Mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância. Usar as perdas para refinar a paciência. Usar as falhas para lapidar o prazer. Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência.

Jamais desista de si mesmo.

Jamais desista das pessoas que você ama.

Jamais desista de ser feliz, pois a vida é um obstáculo imperdível, ainda que se apresentem dezenas de fatores a demonstrarem o contrário.

“Pedras no caminho?”

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

RESUMO

O presente estudo comparou dois métodos de isolamento de neurônios corticais viáveis para estudos *in vitro* de direcionamento axonal. Inicialmente procuramos isolar células de projeção calosa utilizando injeções intrauterinas de microesferas fluorescentes por pressão em córtices E17 e P3. Após uma sobrevivência de 24h, a região cortical homotópica contralateral à injeção era dissecada, dissociada, e as células marcadas separadas por citometria de fluxo (FACS) pelo seu perfil de tamanho, granulosidade e marcação. Para identificar quais populações celulares estavam presentes entre as células isoladas por FACS, usamos marcadores para: neurônios (NeuN), glias (GFAP), interneurônios (GABA) e neurônios calosos (Calretinina). A técnica apresentou dificuldades técnicas para injeção, as células não eram viáveis após separação, e a imunofenotipagem foi inconclusiva. Assim, tentamos isolar a subpopulação celular da camada 5 dando um pulso de BrdU intraperitoneal na grávida em E14. Córtices cerebrais E18 foram dissociados e incubados com o ligante de DNA Hoechst. As células marcadas fracamente pelo Hoechst foram separadas por FACS e cultivadas. Nessa etapa, definimos as condições do isolamento por citometria para sobrevivência das células em cultura pois as células emitiram neuritos de diferentes tamanhos e complexidade em menos de 24 h. Confirmamos a presença de BrdU no DNA das células isoladas por imunomarcação. Aproveitando-se das características citoarquitetônicas corticais e das estratégias ontogênicas nesses mamíferos, propomos um método simples de isolamento de neurônios viáveis para aplicação nos estudos *in vitro* de etapas do desenvolvimento neocortical como o direcionamento axonal.

ABSTRACT

This study compared two methods of isolation of viable cortical neurons for *in vitro* studies of axon guidance. Initially we isolated callousal cells through intrauterine pressure injections of fluorescent microspheres in E17 and P3 cortices. After a 24-hour survival, the cortical region Homotopic contralateral injection was dissected, dissociated, and labeled cells separated by flow cytometry (FACS) and its size, granularity and fluorescence profiles. To identify which cell populations were present in the cells isolated by FACS, we used markers for: neurons (NeuN), glia (GFAP), interneurons (GABA) and callousal neurons (Calretinin). The technique presented technical difficulties for injection, the cells were not viable after separation, and immunophenotyping was inconclusive. So, we try to isolate the subpopulation of layer 5 cells by giving a pulse of BrdU intraperitoneally in pregnant mice in E14. E18 cerebral cortices were dissociated and incubated with the DNA ligand Hoechst. Cells weakly stained by Hoechst were separated by FACS and cultured. At this stage, we defined the conditions of isolation by flow cytometry for cell survival in culture since we observed cells sending neurites of different sizes and complexity in less than 24 h. We confirmed the presence of BrdU in the DNA of isolated cells by immunostaining. Taking advantage of the cytoarchitectonic features and cortical ontogenetic strategies of those mammals, we propose a simple method of isolation of viable neurons for use in *in vitro* studies of neocortical development stages as the axonal targeting.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACSF – fluido cérebro-espinhal artificial (do inglês *artificial cerebral-spinal fluid*)

ATB – antibiótico

BMP – proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês *bone morphogenetic protein*)

BP - banda estreita (do inglês *bandpass*)

BP – progenitor basal (do inglês *basal progenitor*)

BrdU – 5'-bromo-2'-deoxiuridina

CC – cortico-cortical

CGE – eminência ganglionar caudal (do inglês *caudal ganglionic eminence*)

CH – bainha cortical (do inglês *cortical hem*)

CP – placa cortical (do inglês *cortical plate*)

Ctip – proteína que interage com COUP-TF (do inglês *COUP-TF interacting protein*)

CTX - córtex

Cy3 – cianina 3 (do inglês *cyanine 3*)

DAB – 3,3'-diaminobenzidina

DAPI – 4',6'-diamidino-2'-fenilindol (do inglês *4',6'-diamidino-2'-phenylindole*)

Dil – 1,1'- dioctadecil - 3,3,3',3'- tetrametilindocarbocianina perclorato (do inglês *1,1'-dioctadecyl - 3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate*)

DNA - ácido desoxiribonucleico (do inglês *deoxiribonucleic acid*)

E – dia embrionário

EG – eminência ganglionar

EGM - eminência ganglionar medial

FACS – seleção celular ativada por fluorescência (do inglês *Fluorescent-Activated Cell Sorting*)

Fezf – proteína de fasciculação e alongamento zeta (do inglês *fasciculation and elongation protein zeta*)

FITC – fluoresceína isotiocianato (do inglês *fluorescein isothiocyanate*)

FSS – espalhamento frontal (do inglês *forward scatter*)

GABA – ácido γ -aminobutírico (do inglês *γ -aminobutyric acid*)

GAD – ácido glutâmico descarboxilase (do inglês *glutamic acid decarboxylase*)

GFAP – proteína acídica fibrilar glial (do inglês *glial fibrillary acid protein*)

GFP – proteína fluorescente verde (do inglês *green fluorescent protein*)

HBSS – solução salina balanceada de Hank's (do inglês *Hank's balanced salt solution*)

HIP - hipocampo

HIS – hibridização *in situ*

HRP – peroxidase de raiz-forte (do inglês *horseradish peroxidase*)

H33342 – Hoechst 33342

HEK - célula de rim embrionário humano (do inglês *Human Embryonic Kidney cell*)

HGF/SF – fator de crescimento de hepatócito/fator dispersivo (do inglês *hepatocyte growth factor/scatter factor*)

i.p. – intraperitoneal

IPC – progenitor intermediário (do inglês *intermediate progenitor*)

IZ – zona intermediária (do inglês *intermediate zone*)

LASER – amplificação da luz por emissão de radiação estimulada (do inglês *light amplification by stimulated emission of radiation*)

Lmo – (do inglês *LIM domain only*)

MEC - matriz extracelular

MGE – eminência ganglionar medial (do inglês *medial ganglionic eminence*)

MZ – zona marginal (do inglês *marginal zone*)

NCAM – molécula de adesão celular neural (do inglês *neural cell adhesion molecule*)

Ncx - neocórtex

NE – células neuroepiteliais

NeuN – proteína de núcleo neuronal (do inglês *Neuronal Nuclei*)

OB – bulbo olfativo (do inglês *olfactory bulb*)

Otx – gene Otx (do inglês *orthodenticle homeobox*)

P - pós-nato

PB – tampão fosfato (do inglês *phosphate buffer*)

PBS – solução salina tamponada com fosfato (do inglês *phosphate buffered saline*)

PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

PFA – paraformaldeído

PP – pré-placa

RGC – célula de glia radial (do inglês *radial glial cell*)

ROR β - receptor órfão relacionado a retinóide β (do inglês *Retinoid-related orphan receptor β*)

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (do inglês *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*)

Satb2 – proteína especial ligante rica em AT 2 (do inglês *special AT-rich binding protein 2*)

SFB - soro fetal bovino

SG – granular subpial (do inglês *subpial granular*)

Sox5 – gene SRY-box 5 (do inglês *SRY-box 5*)

SP - subplaca

SRY – região Y determinante de sexo (do inglês *sex determining region Y*)

SSC - espalhamento lateral (do inglês *side scatter*)

SN - sistema nervoso

SNC - sistema nervoso central

SNP - sistema nervoso periférico

SVZ – zona subventricular

Tc - tempo de ciclo

UV – ultravioleta

VZ – zona ventricular (do inglês *ventricular zone*)

WM – substância branca (do inglês *white matter*)

ZP – zona proliferativa cortical

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Embriogênese do sistema nervoso central.....	18
1.2. Corticogênese	19
1.2.1. Proliferação e formação das camadas	20
1.2.2. Interneurônios.....	24
1.2.3. Neurônios corticais de projeção.....	25
1.2.3.1. Origem e diferenciação	28
1.2.3.2. Morfologia, função e conexões intralaminares	28
1.3. Neurônios de projeção de camada V	32
1.3.1. Projeções subcorticais de camada V.....	36
1.3.2. Projeções calosas de camada V.....	37
1.4. Citometria de fluxo e isolamento de neurônios	38
2. OBJETIVOS	44
2.1. Objetivo geral	44
2.2. Objetivos específicos	44
3. METODOLOGIA	45
3.1. Isolamento de células.....	45
3.1.1. Marcação retrógrada com microesferas fluorescentes	45
3.1.2. Marcação com BrdU.....	48
3.2. Dissociação de células.....	51
3.3. Citometria de fluxo e cultura de células.....	51
3.4. Imunocitoquímica	53
3.5. Processamento histológico	55
3.5.1. Encéfalos retrogradamente marcados com microesferas.....	55
3.5.2. Encéfalos de animais marcados com BrdU.....	56
3.6. Imunohistoquímica	56

3.7. Captura e documentação de imagens	57
3.8. Análises estatísticas	58
4. RESULTADOS	59
4.1. Marcação retrógrada <i>in vivo</i>	59
4.1.1. <i>In situ</i>	59
4.1.2. <i>In vitro</i>	61
4.2. Marcação com BrdU.....	68
4.2.1. Citometria de fluxo	69
4.2.2. Imunocitoquímica	70
4.2.3. <i>In vitro</i>	72
4.2.4. <i>In situ</i>	74
5. DISCUSSÃO	77
5.1. Purificação de neurônios por citometria de fluxo.....	78
5.2. Rastreamento neuronal.....	81
5.3. Marcação com BrdU.....	87
5.3.1. BrdU e Hoechst	89
5.4. Ciclo celular e neurogênese cortical.....	93
5.5. Classificação dos neurônios corticais	96
6. CONCLUSÃO	102
7. PERSPECTIVAS.....	103
8. REFERÊNCIAS.....	105

1. INTRODUÇÃO

1.1 Embriogênese do sistema nervoso central

A origem embrionária do sistema nervoso (SN), ectodérmica, constitui uma evidência evolutiva da sua função de relacionar o organismo com o meio que o cerca. Mas esse folheto também dá origem à pele, o que requer um comprometimento com o destino neural por parte das células ectodérmicas que formarão a placa neural. Proteínas BMPs (que determinam o destino ectodérmico) são bloqueadas por uma região organizadora que produz fatores indutores – folistatina, noguina e cordina, por exemplo – que se ligam a elas no ectoderma neural (Tiedemann *et al.*, 1998; Lent, 2001). Da placa neural origina-se o tubo neural - de onde surge o sistema nervoso central (SNC) - e, onde este se fecha, lateralmente, surgem estruturas longitudinais, as cristas neurais – origem do sistema nervoso periférico (SNP). Quando o tubo neural completa seu fechamento, ele se dilata rostralmente e notam-se as vesículas encefálicas primárias: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo.

No prosencéfalo, as próximas estruturas a surgirem são as vesículas ópticas e telencefálicas, em pares, e o diencéfalo. O par de vesículas telencefálicas cresce lateral e posteriormente, passando a se localizar ao lado e acima do diencéfalo, e das porções ventrais dos hemisférios telencefálicos surgem os bulbos olfativos. A intensa proliferação neuronal nas paredes das vesículas telencefálicas dão origem à substância cinzenta do córtex cerebral e do telencéfalo basal. Após a proliferação e migração, os neurônios começam a emitir axônios que se alongam para estabelecer a “comunicação” entre as diferentes regiões do SN. As fibras axônicas vão compor a

substância branca subcortical, o corpo caloso e a cápsula interna, entre outros feixes de fibras (Bear *et al.*, 2002a).

A nível celular, o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) pode ser didaticamente dividido em seis etapas: **(1)** proliferação; **(2)** migração; **(3)** diferenciação bioquímica e morfológica; **(4)** crescimento neurítico e sinaptogênese; **(5)** fenômenos regressivos (regressão axonal, eliminação de sinapses e morte celular); **(6)** e mielinização. É importante lembrar que essas etapas, apesar de constituírem mecanismos celulares distintos, acabam por se sobrepor temporalmente.

1.2. Corticogênese

A origem embrionária do córtex cerebral é a vesícula prosencefálica, inicialmente formada por uma camada de células precursoras situadas na luz do tubo neural. Após a proliferação, os neurônios migram para os sítios finais que ocuparão durante toda a vida adulta do animal (Angevine & Sidman, 1961). Quatro regiões iniciais - zonas ventricular (VZ), subventricular (SVZ), intermediária (IZ) e marginal (MZ) - do SNC embrionário dão origem ao padrão histológico do encéfalo maduro (Figura 1). A zona ventricular é composta por células proliferantes que assumem morfologia alongada e estendem seu citoplasma na direção da superfície telencefálica dorsal, prendendo as regiões citoplasmáticas mais externas à membrana interna da pia. Os primeiros neurônios imaturos que deixam a VZ formam a pré-placa (PP) e os seguintes dividem esta em subplaca (SP) e MZ. Os próximos se interpõem entre elas para formar a placa cortical (CP) e entre a VZ e a IZ originando a SVZ (Bystron *et al.*, 2008).

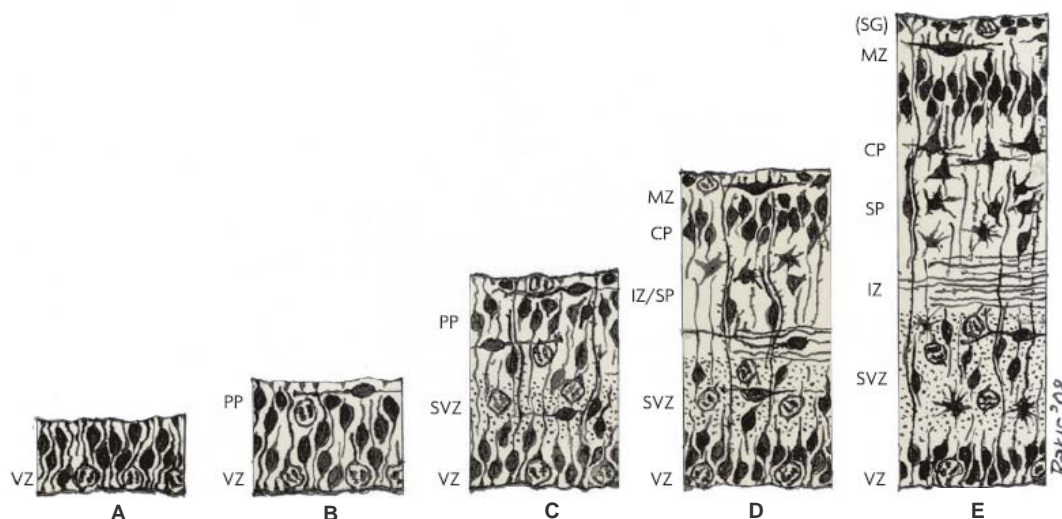


Figura 1: Esquema dos compartimentos transitórios do córtex ao longo da corticogênese. **(A)** Inicialmente, só há a VZ composta por progenitores ainda com morfologia arredondada; **(B)** Células ventriculares assumem morfologia alongada e prendem seus processos radiais à superfície interna da pia, e seus núcleos movimentam-se no eixo dorso-ventral durante as mitoses formando a PP; **(C)** novos precursores posicionam-se entre a VZ e a PP dando origem à SVZ; **(D)** surgem, ainda sobrepostas, a SP - formada por neurônios imaturos que se estabeleceram no meio da PP - e a IZ - formada por neurópila e neurônios que estão migrando para a CP - e a CP - composta pelos neurônios que se interpuseram entre a MZ e a SP; **(E)** no fim da corticogênese, VZ e SVZ constituem os compartimentos proliferativos; a IZ é o primórdio da substância branca cortical; a SP contém neurônios recém gerados; a CP é a precursora das camadas II - VI; e a MZ, contendo a camada SG, formará a camada I. Abreviaturas: CP: placa cortical; IZ: zona intermediária; MZ: zona marginal; PP: pré-placa; SG: granular subpial; SP: subplaca; SVZ: zona subventricular; VZ: zona ventricular (Adaptado de Bystron *et al.*, 2008).

1.2.1. Proliferação celular e formação das camadas

Em mamíferos, o córtex maduro é organizado em seis camadas de células (Jacobson, 1991). No começo da década de 60, duas características muito importantes da corticogênese foram descritas: (1) a estratificação do córtex ocorre de maneira inversa, isto é, as camadas mais profundas nascem antes das superficiais, em um gradiente proliferativo “inside-out” e (2) as camadas formam-se pela migração neuronal de neurônios jovens provenientes das zonas proliferativas do telencéfalo (Angevine & Sidman, 1961).

Estudos posteriores mostraram haver uma relação entre o momento em que os neurônios são gerados e a camada que ocupam no córtex maduro: os primeiros progenitores a deixarem o ciclo celular assumindo um fenótipo neuronal ocupam as

camadas profundas do córtex e são ultrapassados pelas células originadas das próximas ondas neurogênicas que migram em direção à superfície pial formando as camadas superiores (Caviness, 1982). Em camundongos, a primeira onda neurogênica ocorre em E11 (E0 = dia da concepção) (Caviness, 1982), e novos neurônios nascem e deixam as zonas proliferativas pelos seis dias seguintes (Figura 2).

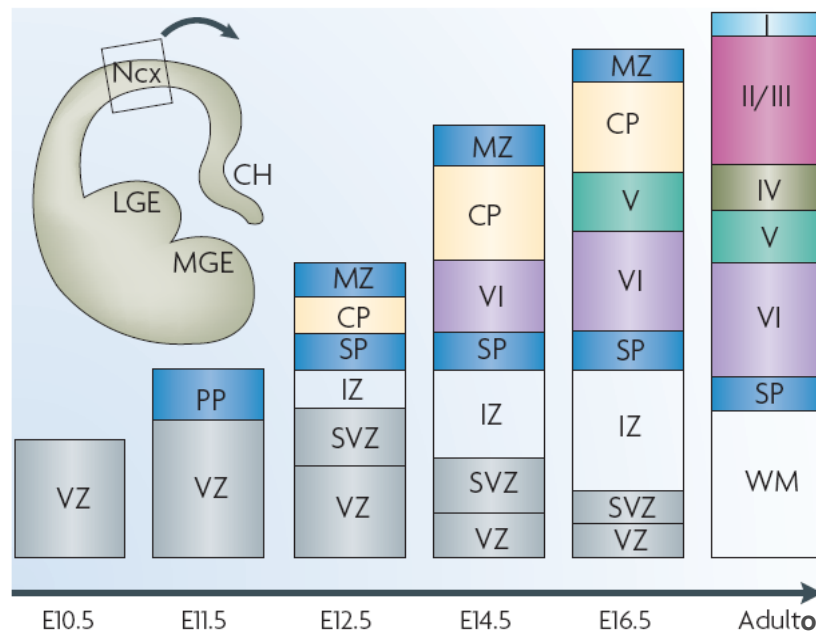
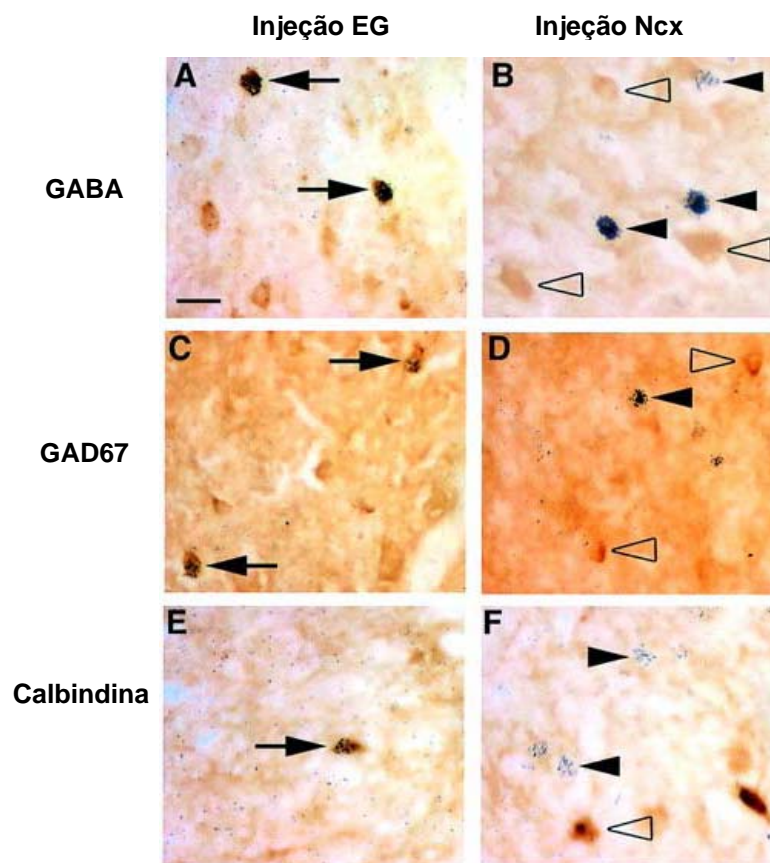


Figura 2: Cronologia da formação das camadas neocorticais em camundongos. Abaixo da seta, as datas do período gestacional em que se iniciam as ondas proliferativas que formam a estrutura esquematizada acima da mesma. Assim, a neurogênese começa em 10.5 (considerando o dia da verificação do tampão vaginal como E0.5) na VZ; em E11.5, forma-se a PP; em E12.5, nasce a CP, no meio da PP, que dará origem às camadas II-VI; em E14.5 é gerada a primeira camada do gradiente neurogênico invertido (VI); em E16.5, nasce a camada V; e no últimos dias nascem as camadas IV-II que completam o padrão hexalaminado do córtex do animal adulto. Abreviaturas: CH: bainha cortical; CP: placa cortical; E: embrionário; IZ: zona intermediária; LGE: eminência ganglionar lateral; MGE: eminência ganglionar medial; MZ: zona marginal; Ncx: neocórtex; PP: pré-placa; SP: subplaca; SVZ: zona subventricular; VZ: zona ventricular; WM: substância branca (modificado de Molyneaux *et al.*, 2007).

No neocórtex, há duas grandes classes neuronais: os interneurônios – inibitórios e de circuitaria local - e os neurônios de projeção - excitatórios e que projetam para alvos corticais, subcorticais e subcerebrais - compostas por uma grande diversidade de subtipos neuronais, com morfologia e propriedades eletrofisiológicas distintas, o

que contribui para a complexidade da circuitaria cortical (Larkman & Mason, 1990; Mason & Larkman, 1990; Kawaguchi & Kubota, 1997; Markham *et al.*, 2004). Elas também podem ser distinguidas pelo aspecto bioquímico, sendo a maioria dos interneurônios GABAérgicos e dos neurônios de projeção, glutamatérgicos (Lavdas *et al.*, 1996). Injeções localizadas de [³H]-timidina nas zonas proliferativas neocortical ou das eminências ganglionares durante a neuronogênese do furão e imunohistoquímica mostraram que cada uma dessas regiões origina uma das grandes classes neuronais citadas acima: os interneurônios nascem nas eminências e os neurônios de projeção são de origem neocortical (Anderson *et al.*, 2002) (Figura 3). Além disso, o destino laminar dos dois tipos neuronais em questão depende da data em que deixam a zona proliferativa e não do sítio de onde se originam (Tan *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2002).



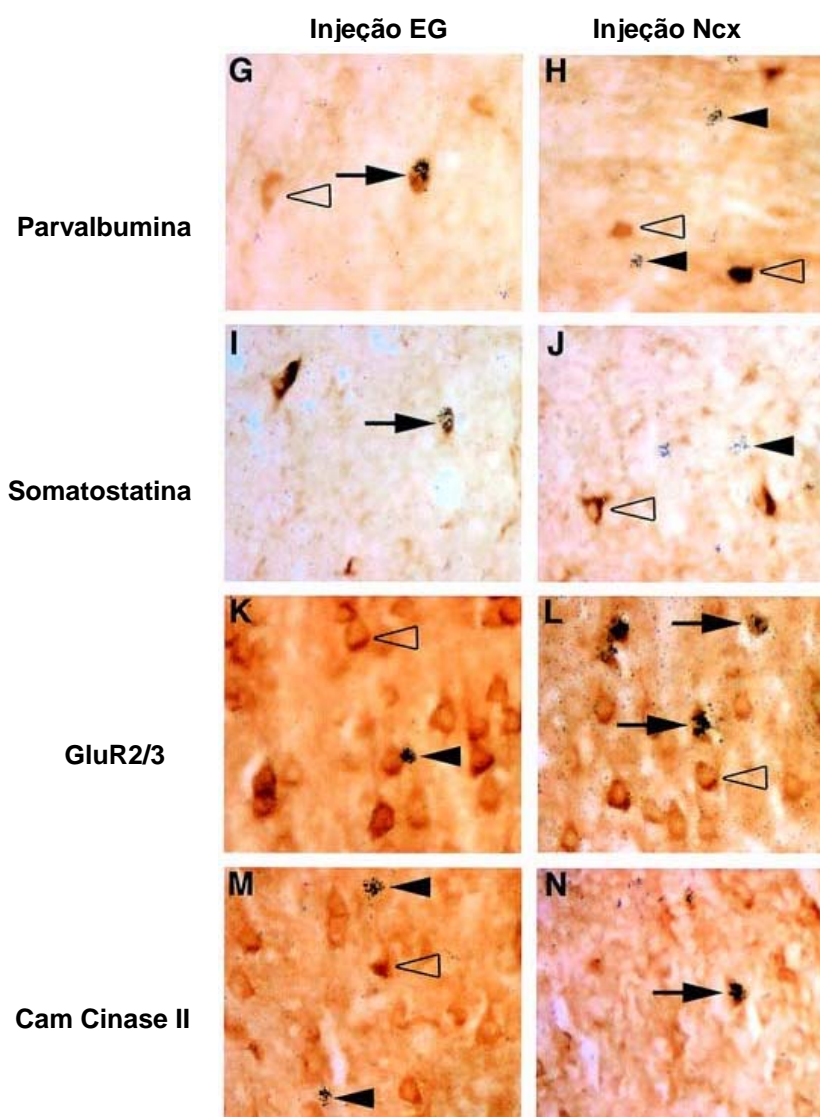


Figura 3: Identificação imunohistoquímica de células marcadas em P1 com timidina tritiada (pontos pretos sobrepostos às células nas autoradiografias de campo claro) no Ncx de furão de 6 semanas. Cabeças de seta cheias indicam células $[^3\text{H}]$ -timidina positivas, cabeças de seta vazias indicam células imunopositivas (marcação marrom) e setas cheias apontam células duplamente marcadas. A timidina foi injetada na EG - coluna da esquerda - e no Ncx - coluna da direita. Marcadores de interneurônios (A-J) marcam células da EG (A, C, E, G, I), mas raramente neurônios provenientes da ZP (B, D, F, H, J), enquanto marcadores de neurônios de projeção cortical (K-N) marcam células provenientes da ZP (L, N), mas raramente as da EG (K, M). Abreviaturas: EG: eminência ganglionar; GABA: ácido γ -aminobutírico; GAD: ácido glutâmico descarboxilase; ZP: zona proliferativa cortical. Barra de escala = 200 μm (adaptado de Anderson *et al.*, 2002).

1.2.2. Interneurônios

Essa classe de neurônios corresponde à cerca de 20-30% dos neurônios neocorticais (Xu *et al.*, 2003; 2004; Markram *et al.*, 2004). São gabaérgicos inibitórios, com exceção de alguns subtipos, e, morfologicamente, caracterizam-se por: soma sem um formato típico e tamanho variando entre 10-30 μm (Ascoli *et al.*,

2008); axônios curtos ramificando dentro de uma mesma coluna cortical e projetando lateralmente para várias (Wonders & Anderson, 2006; Markram *et al.*, 2004 para referência); e uma arborização dendrítica esparsa e com poucos espinhos dendríticos. Sua função de modular a atividade local é exercida por uma diversidade de subtipos que variam em morfologia e aspectos eletrofisiológicos e moleculares.

Quanto à sua origem, sabe-se que eles são gerados principalmente na zona ventricular ventral (*pallium*) no mesmo momento que os neurônios de projeção (Miller, 1985; Anderson, 2002) e, sobre seu destino, que migram tangencialmente (DeDiego *et al.*, 1994; O'Rourke *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1998; Parnavelas *et al.*, 2000; Corbin *et al.*, 2001; Marín & Rubenstein, 2001) (Figura 4) e distribuem-se nas camadas conforme a data em que deixam a zona proliferativa e o subtipo gerado (Anderson *et al.*, 2002; Valcanis & Tan, 2003; Butt *et al.*, 2005; Rymar & Sadikot, 2007).

A pluralidade de subtipos dessa classe tem sido intensamente investigada, e a principal pergunta é se ela depende do sítio de origem, da carga genética dos progenitores, dos perfis molecular e celular da região onde se estabelecem definitivamente ou da combinação de todos esses fatores. Em camundongo, os interneurônios GABAérgicos que nascem em domínios *Nkx2.1*-positivos da eminência ganglionar medial (MGE) migram para o neocórtex e expressam parvalbumina ou somatostatina (Wichterle *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2004) indicando que essas células já apresentam um comprometimento fenotípico no início de suas vidas antes mesmo de chegarem ao seu destino laminar. Outro trabalho recente reforçou essa hipótese ao identificar grupos de interneurônios migrantes expressando marcadores tardios de subtipos já nas idades embrionárias precoces pela triagem de precursores em embriões E13.5 e E15.5 de camundongos transgênicos para

expressão de *Dlx* - um fator de transcrição de interneurônios (Stühmer *et al.*, 2002) - (Batista-Brito *et al.*, 2008).

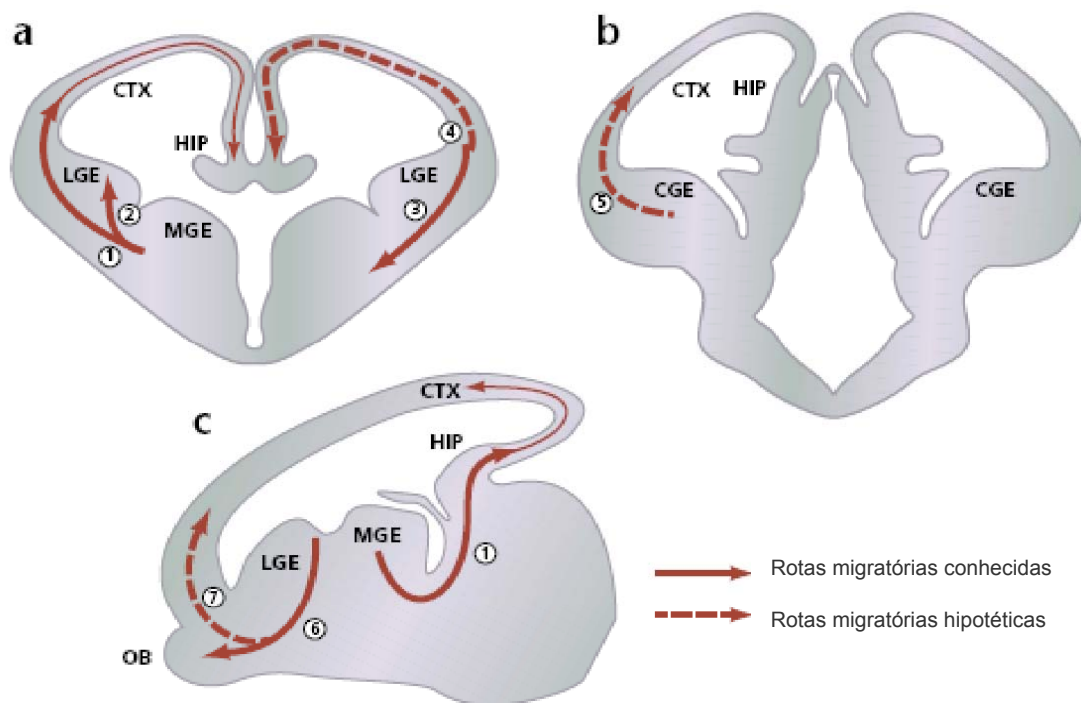


Figura 4: Panorama de rotas de migração tangencial conhecidas e hipotetizadas. Seções coronais (a e b) e sagital (c) mostrando as rotas já bem (setas cheias) e pouco (setas tracejadas) descritas. Rotas: (1) MGE para o CTX; (2) MGE para LGE; (3) fronteira cortiço-estriatal para telencéfalo ventrolateral; (4) EGL para CTX e HIP; (5) CGE para telencéfalo dorsal; (6) EGL para OB (cadeia migratória rostral); (7) região retrobulbar para MZ. Abreviações: CGE: eminência ganglionar caudal; CTX: córtex; HIP: hipocampo; LGE: eminência ganglionar lateral; MGE: eminência ganglionar medial; MZ: zona marginal; OB: bulbo olfativo (modificado de Corbin *et al.*, 2001).

1.2.3. Neurônios corticais de projeção

1.2.3.1. Origem e diferenciação

Esta classe é constituída por células que projetam para regiões intra e extracorticais distantes, glutamatérgicas excitatórias em sua maioria, apresentam um corpo celular grande e arborização dendrítica densa (Conti *et al.*, 1987; Larkman & Mason, 1990; De Felipe & Farinas, 1992; Hevner *et al.*, 2003). Com relação às conexões que estabelecem, esses neurônios são agrupados em 3 subclasses: **(1)** corticofugais, células que projetam para o tálamo, tronco encefálico e medula espinhal; **(2)** associativos, com projeções intracorticais ipsilaterais; **(3)** comissurais,

quando seus axônios cruzam as comissuras telencefálicas (Molyneaux *et al.*, 2007). Apesar dessas características gerais, essa é uma classe bem heterogênea com relação a vários aspectos, o que dificulta o isolamento dos diversos subtipos que a compõem. Por exemplo, os primeiros dados hodológicos descreveram uma especificidade entre as camadas de origem e os alvos de projeção dos neurônios piramidais do córtex (Gilbert & Kelly, 1975; Innocenti *et al.*, 1985), mas posteriormente descobriu-se que há mais de um subtipo co-habitando uma mesma camada (Peters & Kara, 1985; Larkman & Mason, 1990; Koester & O'Leary, 1993) e que uma mesma célula pode projetar simultaneamente para alvos distintos (McGeorge & Faull, 1987; Hedin-Pereira *et al.*, 1999; Lent, 1988; Thomson & Bannister, 2003).

A origem dessas células é a VZ cortical (*pallium*) (Anderson *et al.*, 2002) a partir de E11 em camundongos (Nowakowski *et al.*, 1975; Caviness, 1982), seus precursores migram radialmente (Tan *et al.*, 1998) para se estabelecer definitivamente nas suas camadas de destino, e o comprometimento de seus progenitores com os subtipos a serem gerados ocorre desde o início da neurogênese - antes de deixarem o ciclo celular - como demonstrou o transplante heterocrônico de precursores gerados tardiamente para tecidos mais precoces que não foram capazes de produzir os subtipos do estágio do explante receptor enquanto progenitores mais jovens que o tecido hospedeiro sobre o qual foram cultivados geraram os neurônios correspondentes ao estágio do explante (McConnell & Kaznowski, 1991) e de maneira progressiva (Desai & McConnell, 2000). Em cultura, progenitores de células-tronco embrionárias produziram os neurônios de cada camada na ordem temporal observada *in vivo* (Shen *et al.*, 2006; Gaspard *et al.*, 2008). E assim como cada área e camada corticais são geradas em

ondas neurogênicas distintas ou a partir de um determinado ciclo celular (Polleux *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1999), cada classe dentro de um mesmo estrato cortical também apresenta um momento de nascimento específico (Polleux *et al.*, 2001; Arimatsu e Ishida, 2002). Mecanismos extrínsecos como pistas moleculares no meio e contatos celulares (Bohner *et al.*, 1997) também são importantes para essa determinação da identidade laminar dos neurônios de projeção em amadurecimento.

Porque são geradas na zona proliferativa do neocórtex, esses precursores não precisam navegar por longas distâncias para atingir a placa cortical como ocorre com os interneurônios gerados nas EG's, realizando um trajeto radial em direção à pia para compor os estratos corticais (Tan *et al.*, 1998). Os progenitores podem assumir uma morfologia bipolar com um prolongamento líder espesso e outro seguidor mais fino e se deslocarem apoiados em fibras de glia radial que vão da parede ventricular à superfície pial (Rakic, 1972) ou se manterem unipolares, estenderem um prolongamento até a superfície pial e deslocarem seu soma para cima encurtando o prolongamento líder (Miyata *et al.*, 2001; Nadarajah *et al.*, 2001; Tamamaki *et al.*, 2001). Um terceiro tipo de migração neuronal no córtex é realizado por progenitores da IZ e da SVZ que ramificam, apresentando uma morfologia multipolar, e saltam de uma fibra de glia radial para outra (Tabata & Nakajima, 2003) (Figura 5). Alguns neurônios de projeção *Satb2*-positivos, no entanto, nascem no córtex dorsal e migram para o subicular tangencialmente (Britanova *et al.*, 2006). Mas diferente das subclasses de células de circuitaria local que se originam de domínios molecularmente distintos da zona proliferativa das EG's (Wonders & Anderson, 2006; Fogarty *et al.*, 2007; Hardt *et al.*, 2008), as populações de neurônios de projeção diferenciam-se durante seu amadurecimento, não pelo seu

sítio de origem, mas pelo perfil de expressão gênica característico de cada subtipo (Hevner *et al.*, 2003; Gal *et al.*, 2006; Hevner *et al.*, 2006).

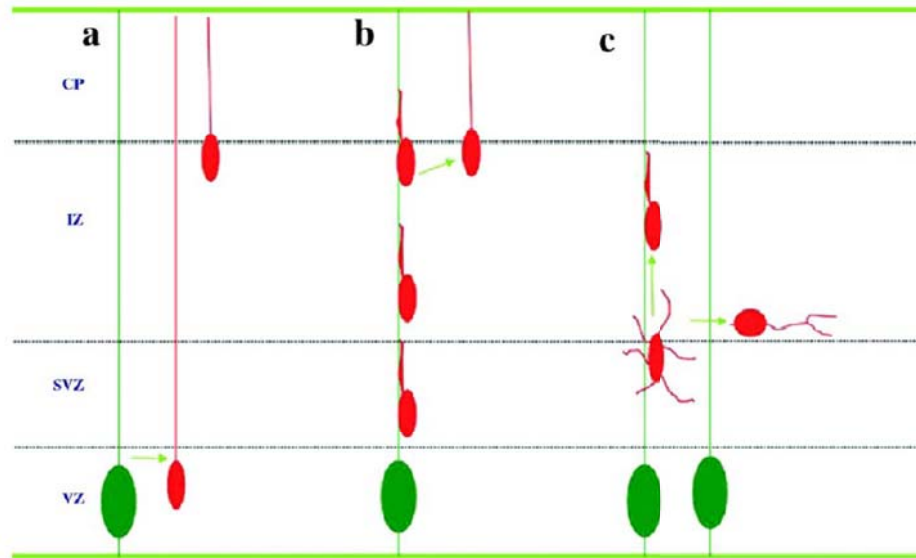


Figura 5: Mecanismos de migração radial no neocórtex ao longo do desenvolvimento. **(a)** No início da corticogênese, neurônios migram por translocação somal; **(b)** mais tarde, a maioria dos neurônios corticais de projeção prende-se à fibras de glia radial, deslocam-se em direção à CP, desprendem-se e se translocam para a superfície; **(c)** na SVZ, neurônios ramificam e “saltam” de uma fibra de glia radial para outra, mecanismo descrito como migração multipolar ou ramificada. Abreviaturas: CP: placa cortical; IZ: zona intermediária; SVZ: zona subventricular; VZ: zona ventricular (modificado de Britanova *et al.*, 2006).

1.2.3.2. Morfologia, função e conexões intralaminares

As camadas II/III enviam eferências para a medula espinhal (Cho *et al.*, 2004) e áreas intracorticais ipsi (Callaway & Katz, 1990; Durack & Katz, 1996; Petersen *et al.*, 2003; Tanigawa *et al.*, 2005) e contralaterais, estas concentradas na porção inferior da camada III e aquelas na II (Meissirel *et al.*, 1991). Dois subtipos de células excitatórias piramidais típicas as compõem: um com neurônios de somas cônicos médios que emitem um dendrito apical espesso com uma porção inicial não espinhosa, uma distal com espinhos muito ramificados e um tufo apical na camada I e dendritos basais densamente ramificados que correm lateralmente ou descem para a camada IV; e outro com neurônios de somas ovais um pouco menores

emitindo dendritos apicais e basais mais finos e menos densos (Peters & Kara, 1985). Os axônios das células piramidais da camada II projetam sem ramificações para as camadas IV-VI, fazem muitas conexões com outras piramidais intralaminares e deixam o córtex pela substância branca, enquanto, na III, elas ramificam muito nas camadas II/III e V e conectam células espinhosas naquelas (Thomson *et al.*, 2002). No aspecto funcional, neurônios corticoespinhais piramidais disparam PA's regulares de adaptação lenta e rápida (Cho *et al.*, 2004). Como marcadores moleculares, estas camadas expressam os genes *Cux1* e *Cux2* (Nieto *et al.*, 2004; Zimmer *et al.*, 2004; Ferrere *et al.*, 2006) e *Svet1* (Tarabykin *et al.*, 2001).

Na camada IV, as células de projeção são associativas, em sua maioria (Bannister, 2005), calosas (Voigt *et al.*, 1988) e corticoespinhais (Cho *et al.*, 2004). Elas se dividem em 3 subclasses morfológicas: piramidais espinhosas com dendrito apical robusto e soma cônico; não-piramidais classe I com dendritos espinhosos, soma esférico pequeno e um dendrito apical (piramidais estreladas) ou dendritos de comprimentos semelhantes (células espinhosas estreladas ou multipolares); e não-piramidais classe II com dendritos "lisos" e soma grande elíptico bi ou multipolares (Simons & Woolsey, 1984; Elston *et al.*, 1997). Nos córtices sensoriais, as células não-piramidais classe I são a primeira estação das aferências talâmicas nesta camada e, juntamente com as células piramidais, emitem projeções densamente arborizadas intralaminarmente para as camadas III e com uma arborização menos expressiva para a V e a VI (Lübke *et al.*, 2000; Bannister, 2005). No córtex somatosensorial de roedores, a organização colunar cortical para processamento de informações periféricas é evidenciada por módulos funcionais que representam as vibrissas do focinho e formam os campos dos "barris", cuja principal característica é

a relação topográfica de 1:1 entre cada vibrissa e sua representação cortical, isto é, cada barril representa uma única vibrissa. As regiões entre os barris são denominadas septos e apresentam uma baixa celularidade (para referências, Lübke *et al.*, 2000). Nessa região, os neurônios espinhosos multipolares têm uma arborização dendrítica restrita aos barris em que seus somas se encontram, evitando as áreas de septo, as células piramidais estreladas têm uma árvore dendrítica com campos maiores, que invadem barris vizinhos, mas ambos os subtipos possuem grande assimetria dendrítica (Elston *et al.*, 1997; Lübke *et al.*, 2000). Os principais alvos dos neurônios espinhosos desta camada são outros neurônios excitatórios espinhosos no mesmo barril e piramidais das camadas II/III na mesma coluna cortical (Lübke *et al.*, 2000). Em relação às propriedades funcionais, as células piramidais da camada IV de rato têm dois padrões de disparo: as de disparo regular produzem potenciais de ação (PA) prolongados com frequência de adaptação lenta; e as de disparo fásico, mais numerosas, com seqüências de PA's curtas, frequência de adaptação rápida e um longo período refratário (Bannister, 2005). Em roedores e primatas, incluindo humanos, o gene do receptor nuclear ROR β é utilizado como marcador desta camada (Nakagawa & O'Leary, 2003; Hevner, 2007; Watakabe, 2007; Moroni *et al.*, 2009; Watakabe, 2009), bem como os genes *Cux1* (Nieto *et al.*, 2004; Zimmer *et al.*, 2004; Ferrere *et al.*, 2006) e *Svet1* em camundongo (Tarabykin *et al.*, 2001).

Na camada VI, encontra-se a maioria dos neurônios corticotalâmicos. As células desse subtipo de neurônios corticofugais têm somas piramidais pequenos que projetam organizadamente para diferentes núcleos do tálamo de acordo com sua posição dentro da camada: os axônios que partem da parte mais profunda inervam núcleos específicos, possuem uma árvore dendrítica colateral restrita a uma única

coluna cortical e chegam até a camada IV; os originados da porção superior inervam mais de um núcleo talâmico, têm uma arborização colateral mais ampla penetrando em até três colunas corticais adjacentes e terminando na porção superior da camada V (Va). As células que projetam intracorticalmente, ou células cortico-corticais (CC's), se concentram na região superior da camada (VIa) e incluem 3 subtipos: as que apresentam soma piramidal típico, dendrito apical curto e um axônio descendente ramificado que penetra áreas somatosensoriais secundárias, áreas motoras ou o corpo caloso; as de soma piramidal invertido têm uma arborização dendrítica densa nas camadas IV, V e VI e também penetram os córtices motor e somatosensorial secundário; e as bipolares ou fusiformes, que emitem dois dendritos basais opostos longos, espinhosos e verticalmente orientados e um dendrito apical com uma complexa arborização colateral cujos ramos tangenciam a borda inferior da camada e a substância branca cortical e inervam as mesmas áreas do primeiro subtipo (Zhang & Deschênes, 1997; Deschênes *et al.*, 1998). No córtex lateral de ratos adultos, as subpopulações córtico-talâmica e córtico-corticais diferenciam-se pela expressão de latexina (negativa e positiva, respectivamente) (Arimatsu & Ishida, 1999), e estes são gerados depois daqueles durante o desenvolvimento (Arimatsu & Ishida, 2002). Entre as CC's, as bipolares ipsilaterais expressam Nurr1 e as contralaterais não (Arimatsu *et al.*, 2003). Funcionalmente, os neurônios CC's piramidais disparam em fase com picos únicos seguidos de um período refratário (Mercer *et al.*, 2005); CC's bipolares apresentam os perfis de disparo tônico ou fásico-tônico (para referência, Andjelic *et al.*, 2009), com frequência de adaptação e amplitude de acomodação moderadas, e esses dois padrões não estão relacionados às suas características somatodendríticas nem aos alvos ipsi ou contralaterais

(Andjelic *et al.*, 2009); e as piramidais CT's disparam tonicamente com uma discreta frequência de adaptação (Mercer *et al.*, 2005).

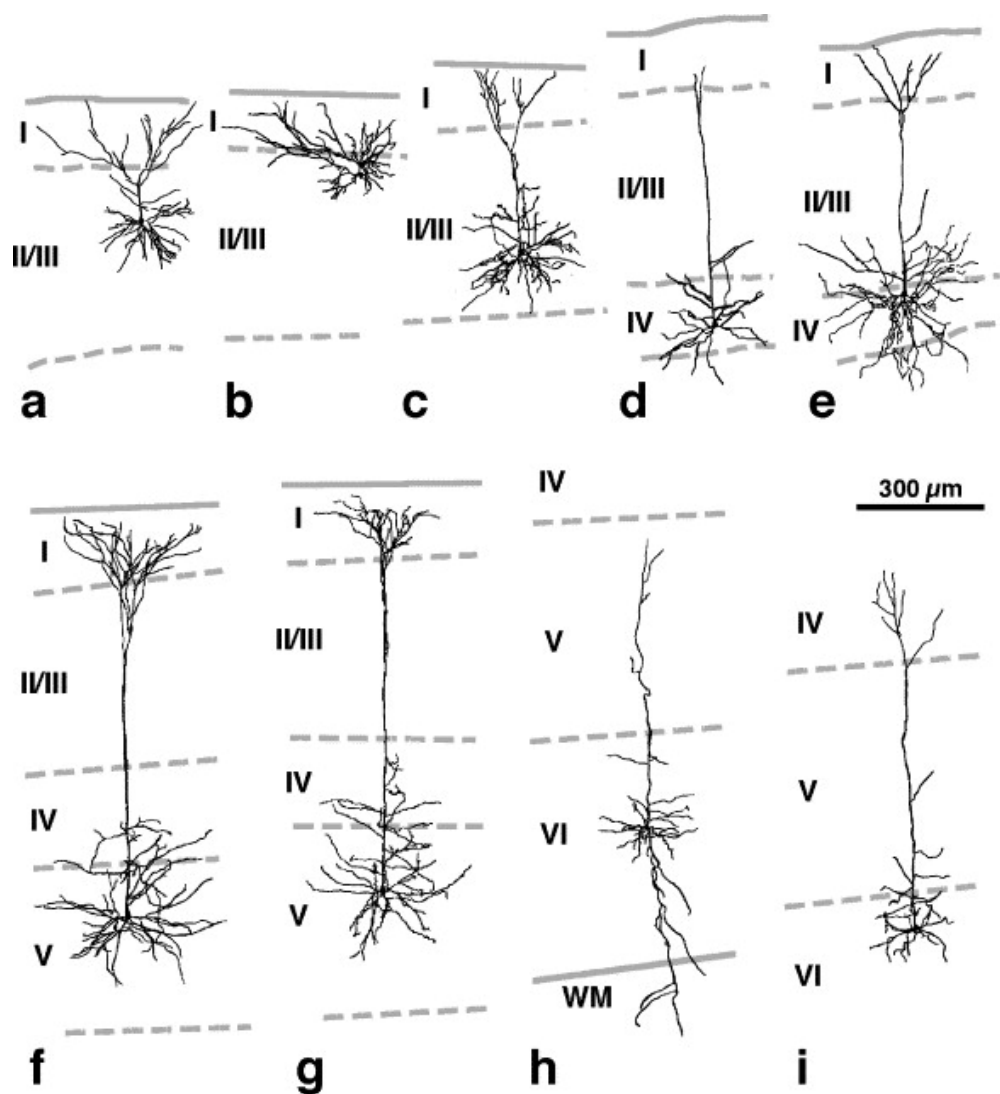


Figura 6: Reconstruções de camera lucida de somas e dendritos de neurônios piramidais marcados com biocitina das áreas FL/HL (a–d, f and i) and M1 (e, g and h). (a, c, e–g, i) Neurônios piramidais clássicos. (b) Neurônio pyramidal de O’Leary. (d) Neurônio pyramidal estrela de Lorente de Nó. (h) Neurônio pyramidal fusiforme. Espinhas dendríticas não estão ilustradas. Neurônios (b), (f) and (h) correspondem a fotografias de (a), (c) and (d), respectivamente. (modificado de Cho *et al.*, 2004b)

1.3. Neurônios de projeção da camada V

Seus neurônios não constituem uma classe homogênea, como demonstrado por Kasper e colaboradores (1994) que identificaram dois subtipos distintos dessas células: neurônios que projetam para alvos subcerebrais emitem dendritos apicais

densamente ramificados com padrão de disparos em salvas quando despolarizados (Tipo I); e neurônios projetando contralateralmente ou para o estriado ipsilateral, com dendritos apicais pouco ramificados e padrão de disparos regular mediante estímulo despolarizante (Tipo II) (Figura 6). No aspecto morfológico, as células piramidais do tipo I têm somas grandes e estão esparsamente distribuídas na parte superior da camada (Va), e as do tipo II, somas menores e ocupam densamente a região mais inferior (Vb) (Koester & O'Leary, 1993; Kasper *et al.*, 1994).

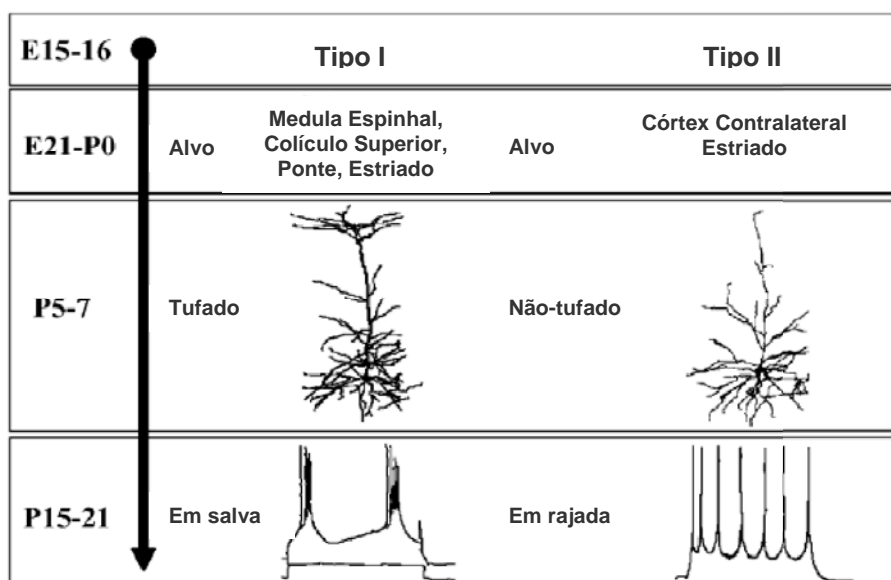


Figura 7: Neurônios piramidais da camada V são classificados em dois subtipos de acordo com seus sítios de projeção, e das características morfológicas e eletrofisiológicas no animal adulto. O diagrama resume o desenvolvimento ontogênico que leva à seleção do alvo, diferenciação somatodendrítica e emergência das propriedades eletrofisiológicas distintas. Abreviaturas: E: embrionário; P: pós-natal (modificado de Molnár & Cheung, 2006).

A descrição de duas classes distintas de neurônios piramidais nesta camada (Koester & O'Leary, 1993; Kasper *et al.*, 1994) iniciou a tentativa de se identificar marcadores moleculares e bioquímicos característicos de cada uma delas. Para distinção delas, imunocitoquímica, hibridização *in situ* (HIS), expressão da proteína fluorescente verde (*GFP*) em células de linhagens transgênicas para genes desta camada, separação de células ativada por fluorescência (FACS), *microarray*, *PCR* e

RT-PCR (Feng *et al.*, 2000; Arlotta *et al.*, 2005; Molyneaux *et al.*, 2005; Sugino *et al.*, 2006; Yoneshima *et al.*, 2006) têm sido combinadas com a clássica marcação retrógrada a partir dos alvos dessas subpopulações. Entre as moléculas identificadas, destacam-se: GAP-43, proteína pré-sináptica expressa em neurônios corticotálânicos (Feig, 2004); *Otx-1*, fator de transcrição expresso seletivamente em neurônios com eferências subcerebrais das camadas V e VI (Frantz *et al.*, 1994); *Er81*, fator de transcrição expresso em motoneurônios da medula espinhal, nas corticofugais da camada V emitindo eferentes para a medula espinhal e colículo superior e em algumas calosas (Xu *et al.*, 2000; Yoneshima *et al.*, 2006); *Ctip-2*, gene com expressão associada aos neurônios corticoespinhais e corticotectais da camada V e não expresso pelas calosas do mesmo estrato (Arlotta *et al.*, 2005); *Fezf1*, gene característico das células de projeção subcorticais (Hirata *et al.*, 2004; Arlotta *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Molyneaux *et al.*, 2005); proteína 36, expressa nas células cortifugais da camada V (Stanfield & Jacobowitz, 1990); *Lmo4*, fator de transcrição que identifica as piramidais do tipo II da camada V (Arlotta *et al.*, 2005; Azim *et al.*, 2009); Calretinina, proteína ligadora de Ca²⁺ de um subgrupo de neurônios calosos (Mitchell *et al.*, 2006); *Satb2*, uma proteína ligante do DNA de neurônios calosos (Britanova *et al.*, 2005; 2008; Szemes *et al.*, 2006; Alcamo *et al.*, 2008); *Sox5*, gene específico de neurônios subcorticais (Kwan *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2008). Diferentes estudos têm mostrado que essas expressões são temporalmente variáveis na embriogênese e no desenvolvimento pós-natal, dificultando o uso dessas moléculas como ferramentas de imunofenotipagem (Frantz *et al.*, 1994; Hevner *et al.*, 2003; Nieto *et al.*, 2004; Arlotta *et al.*, 2005; revisado por Mólnar & Cheung, 2006).

O pico neurogênico desta camada, no camundongo, ocorre de E14 – E15 (Angevine & Sidman, 1961; Caviness, 1982; Polleux *et al.*, 1998). Parte dos neurônios desta camada estende fibras para o hemisfério contralateral e forma o corpo caloso, principal comissura telencefálica dos mamíferos placentários, enquanto as fibras que se dirigem para as estruturas subcorticais formam, juntamente com aquelas que sobem para o córtex, as cápsulas interna, externa e extrema. Em estudos que determinaram a data de nascimento das células das camadas corticais observou-se que neurônios da camada V calosos ou córtico-fugais laterais são gerados no mesmo período da corticogênese, mas não há projeção simultânea para os dois alvos (Lent & Lacerda-de-Menezes, 1988; Lent *et al.*, 1990; Koester & O’Leary, 1993). O grupo de O’Leary sugere que desde a emissão do axônio – ou mesmo antes - as células que projetam pelo caloso e pela cápsula interna são populações celulares distintas que crescem em direção a alvos específicos e não sobrepostos. Há, porém, argumentos que desfavorecem essa hipótese. Koester e O’Leary (1993) fizeram injeções de rastreadores diferentes simultaneamente na ponte e em um dos hemisférios, e não observaram células duplamente marcadas no córtex, afirmando, em função disso, que desde períodos precoces do desenvolvimento haveria uma distinção das duas vias. Como não foi feita injeção na cápsula interna, ou próximo a ela, não se pode desconsiderar um possível crescimento das fibras calosas até alvos intermediários da via córtico-fugal lateral. Além disso, injeções de rastreadores anterógrados no córtex marcam axônios calosos que projetam para o estriado ipsolateral (McGeorge & Faull, 1987) e contralateral (Hedin-Pereira *et al.*, 1999), persistindo até a fase adulta (Dreher *et al.*, 1990; Lent *et al.*, 1990). Como a via de comunicação entre o córtex e o estriado é a cápsula interna, este achado desfavorece a hipótese de O’Leary.

A trajetória percorrida pelas fibras nervosas até seus alvos pode ser longa, o que dificulta a análise dos fatores que influenciam a via de crescimento axônico como um todo. É razoável supor que, ao longo de seu trajeto, um mesmo axônio encontre e responda a diferentes sinais capazes de influenciar suas opções de direção de crescimento. Estes sinais são gerados pelos chamados alvos intermediários, pontos de escolha essenciais da via de crescimento (Godement et al., 1994; Shirasaki et al., 1998; Stuermer & Bastmeyer, 2000; Garel & Rubenstein, 2004) (Figura 7).

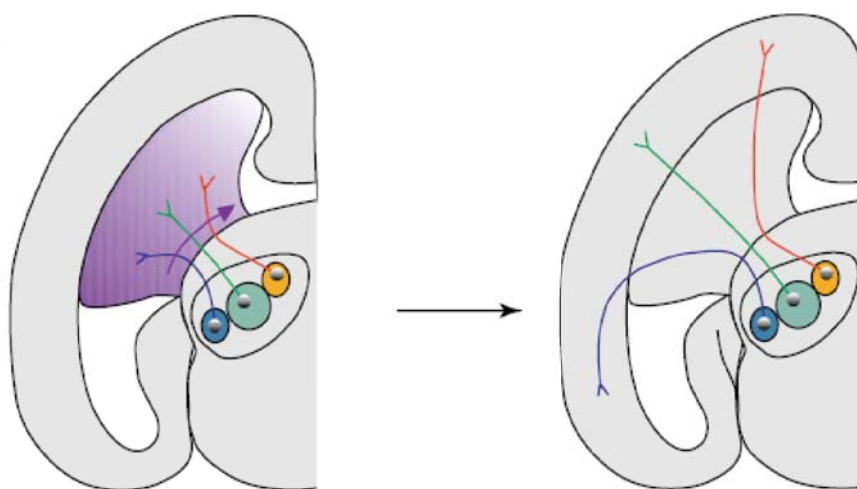


Figura 8: Esquema mostrando a formação da via tálamo-cortical com sinalização de um alvo intermediário. Axônios de diferentes neurônios tálamicos encontram um gradiente (região roxa) látero-medial decrescente de um sinalizador molecular quando chegam a um alvo intermediário e direcionam-se para regiões distintas no córtex (modificado de Garel & Rubenstein, 2004).

Hedin-Pereira e colaboradores (1999) mostraram que após a injeção cortical de biocitina, parte dos axônios corticais marcados se estende medial ou lateralmente dentro da substância cinzenta para formar conexões intracorticais (Hedin-Pereira *et al.*, 1999); outros alcançam a substância branca para então se segregarem em um estrato mais superficial, que compreende os axônios que se dirigem lateralmente, e outro, mais profundo, formado por fibras que se dirigem à linha média. Muitos dos

axônios em desenvolvimento bifurcam ainda na substância cinzenta, e outros já dentro da substância branca, emitindo um ramo medial e outro lateral (Koester & O'Leary 1993; Hedin-Pereira *et al.*, 1999; Garcez *et al.*, 2007). Foi demonstrado por nosso laboratório que fibras provenientes, principalmente, de neurônios da região dorsolateral do córtex bifurcam e emitem, simultaneamente, ramos para o corpo caloso e para a cápsula interna, em idades embrionárias tardias e pós-natais precoces do desenvolvimento (E18 e P1, respectivamente) (Garcez *et al.*, 2007).

1.3.1. Projeções subcorticais de neurônios de camada V

As células corticotálâmicas ocupam a parte inferior (Vb) da camada (Veinante *et al.*, 2000) e diferenciam-se das originadas da camada VI por serem colaterais das fibras subcerebrais, não ramificarem no complexo talâmico reticular, projetarem para núcleos associativos e intralaminares inespecíficos e apresentarem botões terminais densos (Deschênes *et al.*, 1994; Bourassa & Deschênes, 1995). Seus dendritos são relativamente pouco espinhosos comparados aos das fibras corticoespinhais (Gao & Zheng, 2004), mas são mais ramificados, e o dendrito apical desta classe, que emite mais dendritos apicais primários, é bem proeminente do que os das fibras calosas e corticoespinhais e chega bem próximo da superfície pial. No potencial de repouso, essas células não disparam espontaneamente e, quando estimuladas, geram PA's duplos seguidos de uma fase de adaptação com um período refratário longo e de grande amplitude e uma seqüência de PA's regulares sem ou com baixa freqüência de adaptação (Hattox & Nelson, 2007).

Neurônios corticoestriatais ocupam a subcamada Vb e também emitem axônios para o córtex e estriado contralaterais e para o trato piramidal ipsolateral e

apresentam padrões de disparo variado, a maioria com uma forte freqüência de adaptação e sem despolarização pós-potencial (Hattox & Nelson, 2007).

As projeções corticoespinhais dessa camada originam-se de uma classe heterogênea de células cujos perfis eletrofisiológicos formam 3 subclasses: neurônios com freqüências adaptativas baixa ou alta; neurônios que disparam regularmente depois de uma rápida fase adaptativa; neurônios de disparo regular com destacada despolarização pós-potencial e que podem gerar salvas repetidamente. A arborização colateral dos axônios descendentes é similar em todos os tipos e relativamente densa. As células adaptativas apresentam um dendrito apical bem espinhoso, mais fino e soma menor (Tseng & Prince, 1993; Hattox & Nelson, 2007).

1.3.2. Projeções calosas de neurônios de camada V

Localizadas principalmente na porção superior da camada, essas células têm somas esféricos menores, dendritos apicais mais curtos pouco ramificados e pouco espinhosos que chegam até as camadas II/III, dendritos basais mais longos, menos numerosos e menos ramificados que as células subcorticais. No aspecto funcional, são mais facilmente despolarizadas, apresentam um período de adaptação maior que das corticotálâmicas (Kasper *et al.*, 1994; Hattox & Nelson, 2007). Funcionalmente, elas não disparam salvas como as subcorticais, sendo consideradas de disparo regular, e o primeiro PA é intenso e rápido (Kasper *et al.*, 1994).

1.4. Citometria de Fluxo e Isolamento de Neurônios

A citometria de fluxo é uma técnica que mede características químicas e/ou físicas de células ou partículas da mesma ordem de grandeza quando estas passam por um sistema de medição - citômetro de fluxo - em um jato de fluido. Separador de fluxo ou celular é o citômetro de fluxo capaz de medir, desviar por métodos elétricos e/ou mecânicos e coletar células/partículas que apresentam as características que se encaixam dentro dos padrões determinados pelo usuário (Shapiro, 2003). As propriedades celulares medidas pela citometria incluem: diâmetros celular e nuclear, distribuição de marcador, estrutura interna, potencial de membrana, área de superfície e volume, e entre os componentes mensurados estão: núcleo e antígenos nucleares, enzimas, proteínas, RNA, hormônios e antígenos de superfície (Dean, 2003).

Essa técnica teve suas primeiras aplicações nas áreas de hematologia – para contagem de células sanguíneas em suspensões líquidas – e bacteriologia – para quantificação de bactérias em aerossóis através de medidas de espalhamento da luz ou impedância elétrica. Posteriormente, análises quantitativas de ácidos nucleicos e proteínas celulares eram realizadas a partir de medidas da absorção de luz. Atualmente, os citômetros modernos distinguem e contam eritrócitos, subtipos de leucócitos e trombócitos medindo impedância elétrica, espalhamento e absorção de luz (Shapiro, 2003) e a citometria tem ampliado sua participação em outras áreas clínicas e de pesquisas biomédicas. Entre as aplicações atuais pode-se citar: diagnóstico de doenças, cariotipagem cromossômica, acompanhamento de terapias contra câncer, citogenética, identificação de células tumorais e biologia celular básica (Dean, 2003).

As características das células avaliadas na citometria de fluxo são chamadas de *parâmetros* e eles são de natureza química ou física. Os parâmetros básicos são o tamanho e a granulosidade (ou granularidade) citoplasmática, ditos intrínsecos pois são de origem autonômica, e a fluorescência (emitida por marcadores fluorescentes), considerada um parâmetro extrínseco pois é conferida pelo usuário. No caso dos parâmetros intrínsecos, a medida é feita a partir do espalhamento da luz que incide sobre a célula individualmente. Quando uma célula passa pelo feixe de LASER, ocorre um espalhamento frontal (FSC) de amplitude proporcional ao tamanho (diâmetro) da célula e um espalhamento lateral (SSC) produzido pelo desvio do feixe quando este encontra as organelas (grânulos) celulares e representa a complexidade da célula. No caso do parâmetro extrínseco, ele é a medida da fluorescência emitida pelas células após marcação prévia com moléculas fluorescentes como, por exemplo, fluoróforos acoplados a anticorpos ou marcadores injetados nas células.

O princípio de operação do citômetro de fluxo é a sucção da amostra – células em suspensão líquida – para dentro de um tubo, chamado *câmara de fluxo*, no interior de um sistema fechado e preenchido por um tampão. O tampão dentro da câmara flui com uma determinada pressão superior à da amostra entrando no sistema de maneira a fazer esta correr pelo centro da câmara (entre dois “folhetos” de tampão) formando um feixe central. Esta compressão da amostra no centro da câmara pela diferença de pressão entre amostra e tampão é denominada *focalização hidrodinâmica*. Em um determinado ponto mais inferior desse sistema há duas aberturas diametralmente opostas no tubo para a entrada e saída de um feixe luminoso originado de um laser. Esse feixe intercepta as células na amostra e as alterações na forma e tamanho dele são medidas por sensores (Figura 8) e a

fluorescência extrínseca é captada e medida por filtros de fluorescência posicionados ortogonalmente ao feixe de luz que incide sobre as células (Figura 9). Todos esses sinais são coletados e processados por um sistema computacional e transformados em gráficos para análise dos diversos parâmetros avaliados (Dean, 2003).

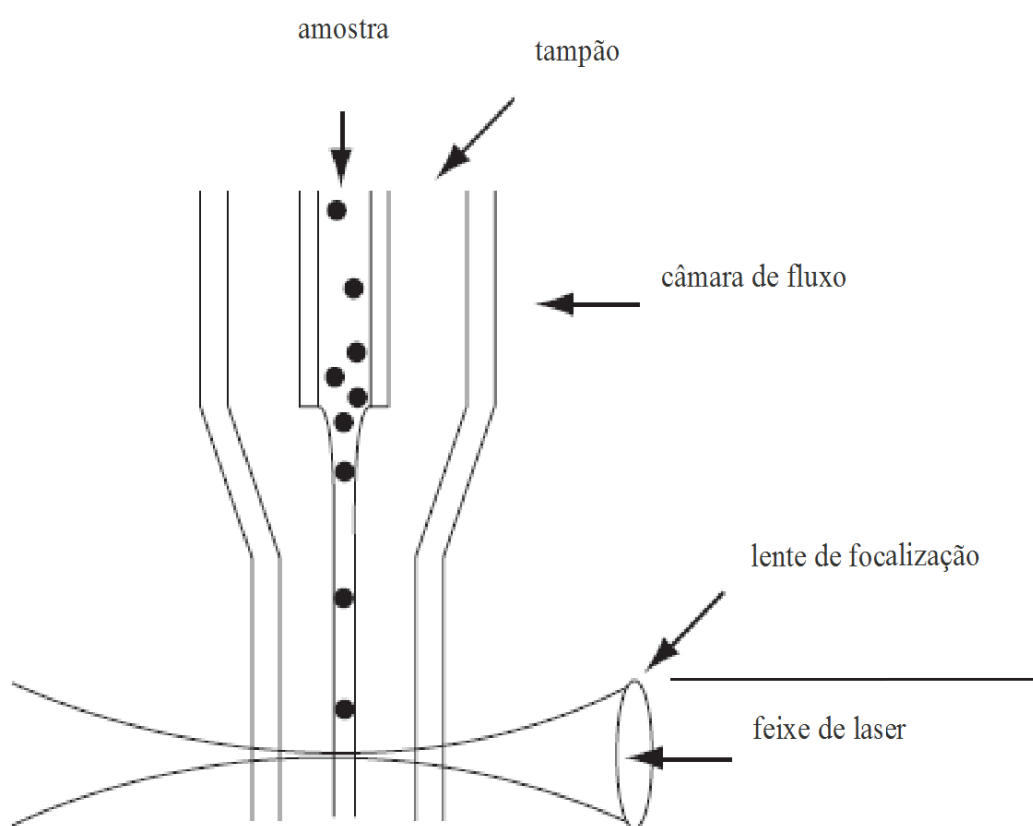


Figura 9: Esquema da câmara de fluxo de um citômetro de fluxo. O feixe da amostra é comprimido pelo do tampão, confinando as células (pontos pretos) ao centro da câmara. O feixe luminoso é focalizado sobre o de células (modificado de Dean, 2003).

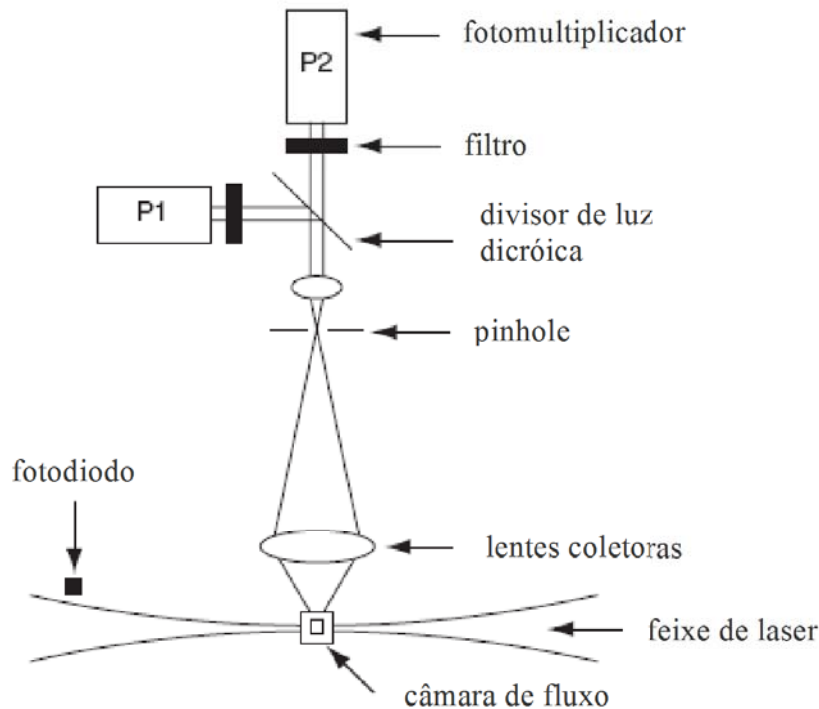


Figura 10: Esquema de um citômetro de fluxo com dois detectores de fluorescência e um detector de espalhamento. A luz emitida por dois marcadores fluorescentes é separada por espelhos dicrômicos e filtros ópticos. Com os filtros adequados, o fotomultiplicador P1 pode medir o espalhamento de luz ortogonal ao feixe luminoso incidente (modificado de Dean, 2003).

Alguns citômetros dispõem de um sistema adicional, além dos detectores descritos acima, que também permite ao usuário selecionar populações de células dentro da sua amostra que apresentem valores específicos para os parâmetros analisados e recuperá-las para estudos *in vitro*, são os separadores celulares. Depois de passar pelo feixe de laser, a amostra deixa a câmara de fluxo e passa por um orifício (*nozzle*) de cerca de 100 μm de diâmetro no ar. Simultaneamente, um dispositivo acoplado à câmara de fluxo faz esta vibrar regularmente em altas frequências perturbando o jato da amostra e quebrando-o em gotas de tamanho e intervalos uniformes de maneira que cada gota contenha uma única célula. A célula que exibir os valores característicos da população de interesse a ser isolada para os parâmetros analisados na câmara de fluxo é carregada eletricamente por um pulso de voltagem imediatamente antes da sua gota ser formada e separa-se do jato da

amostra ao passar por duas placas metálicas fortemente carregadas com cargas opostas e caem diretamente em tubos ou placas de microscopia (Figura 10). É possível isolar até duas populações distintas ao mesmo tempo simplesmente carregando-as com cargas opostas para que cada uma das placas metálicas as deflita para um lado (Dean, 2003).

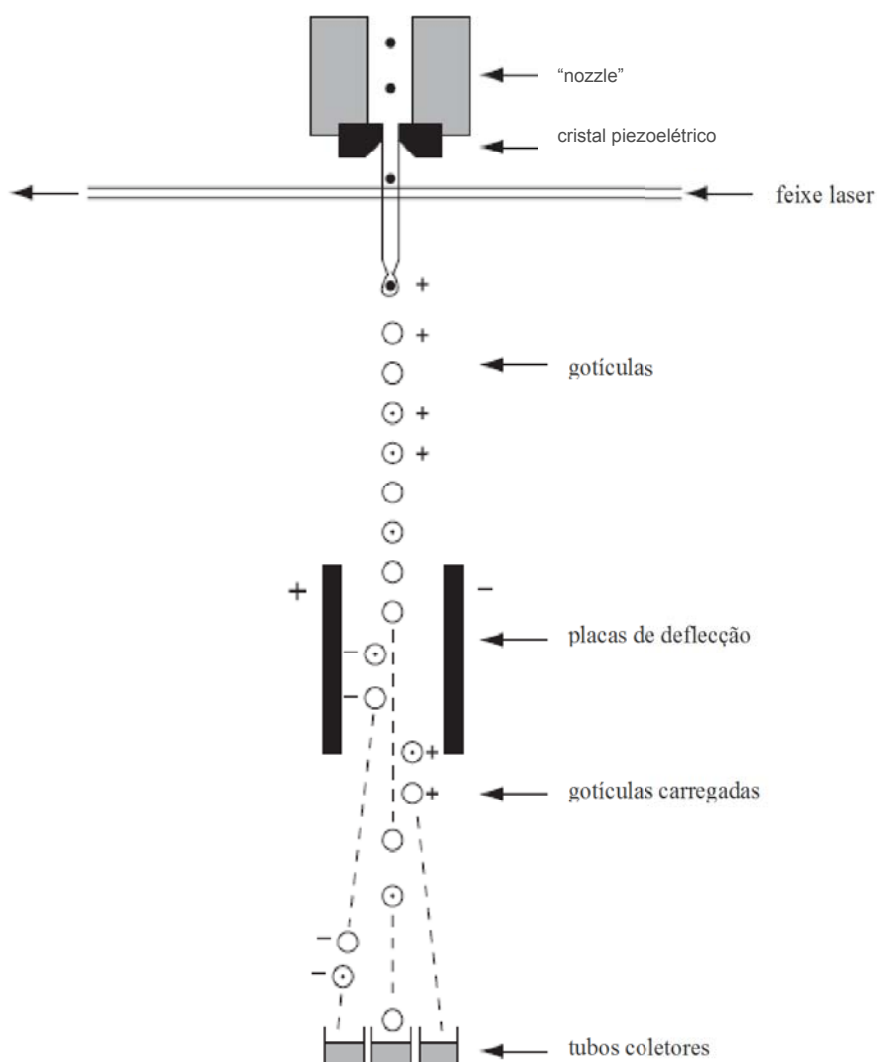


Figura 11: Esquema do princípio do sorting. À medida que células (pequenos pontos pretos) a serem isoladas se aproximam do final do jato recebem uma carga elétrica. Quando as gotas contendo uma célula cada passam entre as placas de alta voltagem, as células carregadas defletem para tubos separados. A deflecção pode ser para esquerda ou para direita, possibilitando a coleta simultânea de dois tipos celulares. No diagrama acima, duas gotas de cada tipo são separadas (modificado de Dean, 2003)

Estudar as diferentes populações de neurônios de projeção do córtex cerebral tem sido o foco de trabalho de alguns grupos de pesquisa. Mas a variedade de subtipos, a sobreposição citoarquitetônica dos mesmos e a reciprocidade das conexões corticais dificultam o isolamento e a caracterização de células piramidais de um único subtipo. As principais estratégias consistem no uso de moléculas rastreadoras que revelam a origem e/ou o destino de uma determinada via nervosa e se baseiam no fluxo de moléculas entre o soma e o axônio – *transporte axoplasmático*. Elas tiveram origem em métodos usados para estudar a degeneração axonal que ocorre após a separação de axônio e soma neuronal descrita pelo fisiologista inglês Augustus Waller - *degeneração walleriana* ou após a destruição do alvo de determinado neurônio (Bear *et al.*, 2002b; Vercelli *et al.*, 2000). No início desta década, Catapano e colabores (2001) aliaram o rastreamento retrógrado com microesferas fluorescentes (Katz *et al.*, 1984) à citometria de fluxo para isolar neurônios calosos de animais pós-natos. O emprego dessa técnica combinada a outras clássicas mostra-se uma estratégia valiosa para a compreensão do funcionamento do sistema nervoso a nível celular. Nosso grupo pretende explorar a potencial aplicação dela juntamente com as estratégias de formação do córtex cerebral de roedores no estudo do desenvolvimento do SNC.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho se propõe estabelecer uma nova metodologia para o isolamento de neurônios de uma subpopulação específica de neurônios de projeção do córtex cerebral durante o desenvolvimento.

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer as condições adequadas para o isolamento de células viáveis por citometria de fluxo para ensaios *in vitro* subsequentes;
- Comparar 2 técnicas de marcação de células corticais para isolamento por FACS;
- Identificar subtipos de neurônios corticais separados por citometria.

3. METODOLOGIA

Todos os procedimentos com animais estavam de acordo com as recomendações da Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa e foram aprovados pelo mesmo (Protocolo DAHEICB 034). Todos os esforços foram realizados de modo a minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

3.1. Isolamento das células

3.1.1. Marcação retrógrada com microesferas fluorescentes

Foram utilizados embriões de camundongos suíços (*Mus musculus*) - acasaladas por 12 horas - no 18^o dia gestacional (E18, considerando E1 o dia da verificação do tampão vaginal) e animais no 3^o dia pós-natal (P3, considerando P1 o dia do nascimento) para injeção de microesferas. As grávidas para injeção *in utero* foram anestesiadas com uma mistura de 200 mg/Kg de Cloridrato de Cetamina 5% (Ketalar[®]; Pfizer) e 10 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina 2% (Rompun[®]; Bayer Health Care) administrada por via intraperitoneal (i.p.) e receberam 0,64 mg/Kg de paracetamol 32 mg/mL (Tylenol[®]; Janssen-Cilag Farmacêutica) oralmente por gotejamento. Os animais neonatos para injeção *in vivo* de microesferas foram anestesiados por imersão em gelo durante 5 min.

Para identificação e isolamento dos neurônios calosos, injetamos microesferas de látex fluorescentes (LumaFluor RetrobeadsTM, LumaFluor Corp., EUA) bem próximo à linha média de encéfalos dos camundongos suíços embrionários e pós-natais (Figura 12). O marcador é transportado retrogradamente e atinge os corpos celulares no hemisfério contralateral. As injeções foram *in utero* nos embriões e *in vivo* em neonatos, e os animais foram sacrificados 24h depois para procedimentos

de dissociação de células ou seccionamento histológico, respectivamente. A Figura 13 representa a cronologia dos experimentos desta etapa.



Figura 12: Esquema da injeção de microesferas fluorescentes verdes. O marcador é injetado em um hemisfério e transportados retrogradamente pelas fibras calosas evidenciando os corpos celulares de origem no hemisfério contralateral (modificado de Koester & O'Leary, 1993).

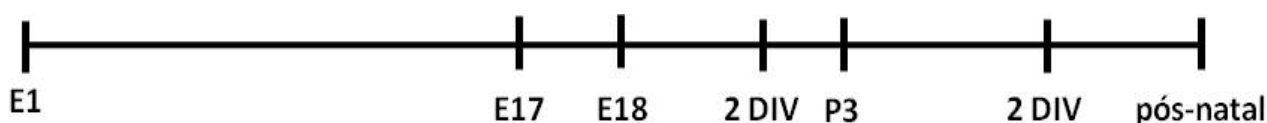


Figura 13: E1: verificação tampão vaginal; E17/P3: injeção beads *in utero/ in vivo*; E18: processamento histológico do Cx ou dissecação Cx → dissociação região homotópica CL → FACS → cultura; 2 DIV: fixação e imunocitoquímica; pós-natal: processamento histológico. Abreviaturas: Cx: córtex; CL: contralateral; E: dia embrionário.

Para estudar mecanismos celulares envolvidos na formação da comissura calosa durante o desenvolvimento embrionário, trabalhamos com embriões no 18º dia de gestação. Em experimentos-piloto de marcação retrógrada em encéfalos nesta idade, retirados previamente à injeção e mantidos em fluido cérebro-espinhal artificial (ACSF) borbulhados com O₂, conforme descrito por (Chang *et al.*, 2000), obteve-se um grande índice de morte celular que inviabilizava a etapa de experimentos *in vitro* subseqüentes. Para otimizar a sobrevivência das células e obter o maior número possível de células calosas isoladas para cultura celular,

optamos por injetar as microesferas *in utero* em embriões E18 para serem transportadas *in vivo* pelo tecido e separá-las por citometria de fluxo.

A cirurgia de injeção *in utero* consistia em: **(1)** anestesia da fêmea grávida (descrita no ítem **3.1.1**); **(2)** tricotomia e incisão cirúrgica de aproximadamente 4 cm na região abdominal, expondo o útero; **(3)** retirada da parede uterina e abertura do saco amniótico; **(4)** posicionamento dos embriões de forma a visualizar a região dorsal do córtex, expondo bem a linha média e os dois hemisférios corticais; **(5)** inserção da seringa Microliter™ (5 µl; Hamilton Company, EUA) no córtex e injeção das microesferas; **(6)** reposição dos embriões na cavidade uterina e uso de grampeador cirúrgico AutoClip 9 mm Applier (MikRon Precision Inc., EUA) para fechar a incisão. Durante todo o procedimento, os embriões eram mantidos úmidos aplicando-se PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4 a temperatura ambiente; **(7)** retirada dos grampos cirúrgicos e dos embriões 24h após a injeção para dissociação dos neurônios calosos.

Para as injeções *in vivo*, **(1)** o animal era anestesiado por 5 - 7 min em gelo até deixarem de responder a um estímulo doloroso leve; **(2)** sua caixa craniana aberta na linha média com o auxílio de um bisturi, cuidando para não atingir o tecido encefálico; **(3)** o marcador era injetado ortogonalmente à superfície cortical dorsal por um pequeno orifício feito previamente no crânio e localizado lateralmente a 3 mm da linha média e 3 mm anteriormente ao ponto Bregma. O marcador deve atingir a substância branca cortical uma vez que os axônios dos neurônios calosos ainda não atingiram a placa cortical nesse estágio do desenvolvimento; **(4)** o tecido cutâneo da região operada era reunido e suturado com gel cianoacrilato (LOCTITE®, Brasil); **(5)** e os animais eram reanimados mergulhando-os parcialmente em H₂O a 37 °C; **(6)**

quando voltavam a respirar, os filhotes eram mantidos sob uma fonte de calor por cerca de 5 min e devolvidos à mãe.

3.1.2. Marcação com BrdU

Foram utilizadas fêmeas de camundongos suíços (*Mus musculus*) no 14º dia gestacional (considerando E0 o momento da concepção) para a injeção do marcador de proliferação bromo-deoxiuridina (BrdU). Nessa etapa, os acasalamentos foram filmados para datação precisa dos embriões. As filmagens foram feitas colocando-se um macho com duas fêmeas, diferenciadas por coloração artificial da pelagem de uma delas, em um aquário de vidro. De frente para este, foi posicionada uma câmera conectada a um computador portátil equipado com o programa *Windows Movie Maker* para produção de filmes cronometrados, e uma luminária de mesa com uma luz de coloração vermelha lateralmente de maneira a iluminar indiretamente o campo de filmagem. Os animais foram mantidos juntos por um período de 2 a até 15 horas, após o qual, as fêmeas eram examinadas para verificação da presença de tampão vaginal e separadas nos casos em que este estava presente para confirmação da gravidez por variação do peso corporal até o 14º dia de gestação. Para determinar o horário da concepção, os filmes eram analisados. Assim como nas injeções *in utero* de microesferas, as fêmeas foram anestesiadas com uma mistura de 200 mg/Kg de Cloridrato de Cetamina 5% (Ketalar®; Pfizer) e 10 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina 2% (Rompun®; Bayer Health Care) administrada por via i.p. e receberam 0,64 mg/Kg de paracetamol 32 mg/ml (Tylenol®; Janssen-Cilag Farmacêutica) oralmente por gotejamento.

Para identificação e isolamento dos neurônios de camada V, administrou-se 50 mg/Kg BrdU 10 mg/mL (Sigma-Aldrich Corp., EUA) em NaOH 0,007 N por via i.p.

(Miller & Nowakowski, 1988) em fêmeas no 14º dia gestacional, dia em que nascem os neurônios destinados a camada V do córtex (Caviness, 1982). No 18º dia embrionário, quando alguns neurônios de camada V já se estabeleceram na placa cortical e seus axônios começaram a cruzar a linha média (Ozaki & Wahlsten, 1998), os embriões foram retirados para isolamento das células do córtex. As fêmeas grávidas passaram por uma histerectomia parcial para retirada de parte da ninhada para os procedimentos de cultura. Após a retirada dos embriões, em procedimento estéril, o córtex foi dissecado e suas células dissociadas. Após a dissociação, as células foram incubadas com Hoechst 33342 (H33342) (Sigma-Aldrich Corp, EUA) para separação por citometria de fluxo baseada na fluorescência desse marcador nuclear. O Hoechst pode ser utilizado para separar células viáveis BrdU positivas e negativas por citometria devido ao “silenciamento” da fluorescência do Hoechst pelo BrdU (Mozdziak *et al.*, 2000) (Figura 14).

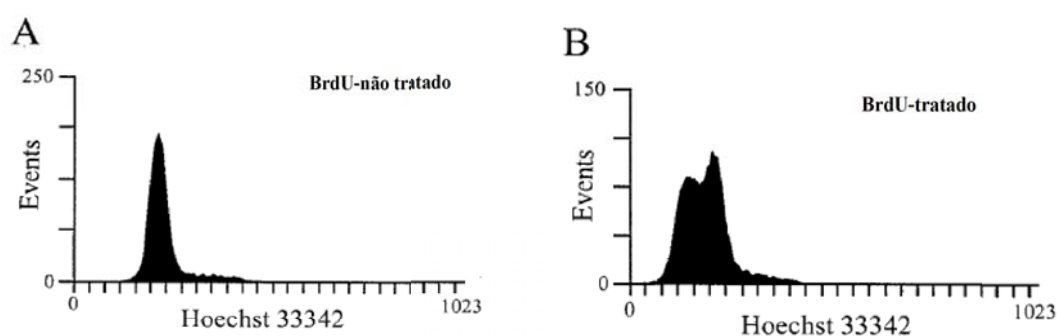


Figura 14: Histograma da fluorescência do Hoechst33342 de células de animais não tratados **(A)** e tratados **(B)** com BrdU. O eixo da abscissa representa a intensidade de fluorescência do Hoechst 33342, e o eixo das ordenadas, o número de eventos registrados. Nos animais não tratados há um pico único de intensidade indicando apenas uma população única de células marcada homogeneamente, enquanto nos tratados pode-se observar duas populações com intensidades de marcação distintas (modificado de Mozdziak *et al.*, 2000).

Para verificar histologicamente se as células marcadas se estabelecem na camada cortical esperada após o amadurecimento do córtex, apenas parte dos embriões foi retirada para a dissociação das células corticais enquanto a outra parte foi deixada no útero para nascer e os filhotes pós-natos serem sacrificados e seus

córtices processados para imunohistoquímica contra o BrdU. Para isso, fizemos uma cirurgia de histerectomia parcial nas grávidas no 18º dia gestacional que consistiu em: **(1)** anestesia da fêmea grávida (descrita no ítem **3.1.1**); **(2)** tricotomia e incisão cirúrgica longitudinal de pele, subcutâneo e musculatura de aproximadamente 4 cm na região abdominal inferior, expondo o útero; **(3)** clampeamento dos ramos das artérias uterinas que irrigam a região de onde os fetos serão retirados; **(4)** retirada parcial do útero e abertura do saco amniótico; **(5)** retirada dos embriões posicionados mais distalmente no corno uterino; **(6)** ligadura dos vasos uterinos clampeados utilizando-se fio de sutura reabsorvível 6-0 (Ethicon, Inc., EUA); **(7)** reposição do útero na cavidade abdominal e uso de grampeador cirúrgico AutoClip 9 mm Applier (MikRon Precision Inc., EUA) para fechar a incisão; **(8)** administração via oral de analgésico (descrita no ítem **3.1.1**) para a fêmea e monitoramento visual da mesma por um período de 6-7 h pós-cirurgia. A Figura 15 representa a cronologia dos experimentos desta etapa.

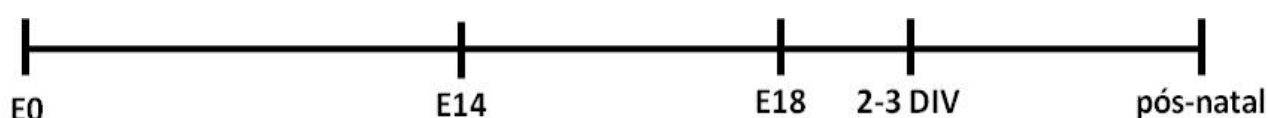


Figura 15: E0: concepção (acasalamento assistido); E14: pulso BrdU i.p. na fêmea (50 mg/Kg) E18: dissecação e dissociação Cx → incubação com Hoechst 33342 (30 min; 37 °C) → FACS → cultura; 2-3 DIV: fixação e imunocitoquímica; pós-natal: processamento histológico e imunohistoquímica; Abreviaturas: BrdU: bromo-deoxiuridina; Cx: córtex; i.p.: intraperitoneal; E: dia embrionário.

Durante todo o procedimento, o útero foi mantido úmido aplicando-se PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4 estéril a temperatura ambiente, e a fêmea foi mantida aquecida por meio de um cobertor homeotérmico (Harvard Apparatus Limited, RU).

3.2. Dissociação de células

Para a cultura de neurônios calosos (marcados com microesferas), foi dissecada a região homotópica contralateral ao sítio de injeção dos encéfalos de embriões E19 ou filhotes P7. Para a cultura de neurônios da camada V (marcados com BrdU), foi dissecado o córtex dorsolateral. As células desses tecidos foram dissociadas em procedimento estéril.

O procedimento consistiu em: **(1)** dissecação da região de interesse e dissociação mecânica em tripsina-EDTA 0,01%; **(2)** incubação a 37 °C por 5-10 min; **(3)** centrifugação da suspensão a 1.500 rpm em centrífuga clínica (CELM; raio do rotor: 9 cm) por seis minutos; **(4)** inativação da tripsina com soro fetal bovino (SFB) (Gibco® Invitrogen Corp., EUA) por 5 min em repouso; **(5)** dissociação mecânica com pipeta Pasteur; **(6)** centrifugação da suspensão a 1.500 rpm em centrífuga clínica (CELM; raio do rotor: 9 cm); **(7)** ressuspensão das células em HBSS livre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Gibco® Invitrogen Corp., EUA); **(8)** filtragem da suspensão celular com membrana de nylon estéril (Cell Strainer, 70 μm ; BD Biosciences, EUA); **(9)** para separação de células marcadas com BrdU, as células dissociadas foram ressuspensas em 1,1 ml de HBSS livre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, uma alíquota de 100 μl diluída em 900 μl da mesma solução para aquisição do controle negativo e o volume restante incubado com 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342 a 1 mg/ml a 37 °C por 30 min; **(10)** separação das células em um citômetro de fluxo com separador de células.

3.3. Citometria de fluxo e cultura de células

Dentre as medidas possíveis obtidas na citometria de fluxo, foram analisados os parâmetros intrínsecos (tamanho celular, granularidade citoplasmática, autofluorescência) e um parâmetro extrínseco (fluorescência). A fluorescência

analisada nas nossas amostras decorre de macromoléculas autofluorescentes e dos marcadores – microesferas fluorescentes verdes e Hoechst 33342. Neste trabalho, a citometria de fluxo foi aplicada com intuito de recuperar o maior número possível de células marcadas para os experimentos *in vitro*.

Para o isolamento de células calosas marcadas com microesferas fluorescentes verdes (descrito anteriormente), usamos o citômetro de fluxo/sorteador celular FACS Aria (BD BioSciences, EUA) localizado na Unidade Multiusuário de Citometria de Fluxo (bloco I/sala I2-055, CCS, UFRJ) e operado pelo Dr. Hamilton da Silva Jr., responsável pela calibração do mesmo para nossas condições de experimento. A excitação das amostras baseou-se nas características do espectro das microesferas com os lasers de 488 nm e 635 nm. A separação das células-alvo foi feita com carga de 3500 V, em pressão de aproximadamente 40 PSI em demarcação específica, apresentadas nos gráficos. Com isso foi mantida a razão em torno de 3000 eventos/seg. A detecção de fluorescências fora do parâmetro para detecção das microesferas verdes foi considerada autofluorescência intrínseca.

No caso das células de camada V marcadas com BrdU, usou-se um MoFlo Cell Sorter (Dako Colorado, Inc.) localizado na Unidade Multi-Usuário de Citometria de Fluxo (bloco D/sala 039, CCS, UFRJ) e calibrado e operado pela técnica Alessandra de Paiva Granato. O aparelho fica em uma sala com filtração do ar, condição apropriada para coleta estéril de células. Para a marcação com Hoechst, a amostra é excitada na faixa do UV e sua fluorescência analisada com filtro BP 450/50. As células-alvo foram separadas com carga de 1300 V, *nozzle* de 100 μm , pressão de 20 PSI, em demarcação específica, apresentada(s) nos gráficos. A detecção de fluorescências fora do parâmetro do Hoechst 33342 também foi considerada autofluorescência intrínseca.

Seguindo-se à filtragem das células marcadas com microesferas ou à incubação das células com Hoechst descritas nas etapas 7 – 9 do item 3.1.4, procedeu-se (1) a aquisição do controle negativo (células não marcadas); (2) aquisição da amostra marcada e análise dos gráficos para demarcação da população a ser separada; (3) coleta das células em tubos preparados previamente com 2 mL de SFB, deixados a 37 °C por no mínimo 4 h e invertidos periodicamente; (4) aquisição das células separadas para análise do grau de pureza/enriquecimento da amostra isolada; (5) registro dos gráficos; (6) novamente em sala de cultura, centrifugação da suspensão celular a 1.500 rpm por 5 min; (7) plaqueamento de 15-30 x 10³ células/cm² sobre lamínulas estéreis previamente recobertas com poli-L-lisina 0,1%; (8) adição de meio de cultura suplementado (47% DMEM F12 + 30% HBSS + 20% SFB + 2% Penicilina/ Streptomicina + 1% Fungizon) às células plaqueadas. Após 72 h, as culturas foram fixadas por 2-3 h com paraformaldeído (PFA; Vetec, Brasil) 4% para procedimento de imunocitoquímica.

3.4. Imunocitoquímica

Observando os dados de citometria de fluxo das células retrogradamente marcadas (microesferas fluorescentes) e dissociadas de córtices contralaterais de animais injetados, duas subpopulações destacaram-se por apresentarem parâmetros intrínsecos compatíveis com os de células calosas. Para verificar a identidade dessas células elas foram coletadas, postas em cultura e, após 24 h, procedeu-se a imunocitoquímica. Usamos 4 marcadores para identificar bioquimicamente as populações selecionadas: um anticorpo contra um antígeno nuclear específico de neurônios (NeuN, 1:50; Chemicon Int., Inc., EUA); um anticorpo contra a proteína ácida filamentar glial (GFAP) (1:100; DAKO, Dinamarca);

um anticorpo contra o ácido γ -aminobutírico (GABA) (1:500; Sigma-Aldrich Corp., EUA) para identificar interneurônios gabaérgicos; e um anticorpo contra a proteína carreadora de cálcio intracelular presente em neurônios calosos pós-natais (Mitchell *et al.*, 2006) Calretinina (1:2000; Chemicon Int., Inc., EUA). Para todos eles, usamos o anticorpo secundário fluorescente Cianina3 (Cy3; 1:600; DAKO, Dinamarca).

Seguimos o protocolo de imunofluorescência indireta que consiste em: **(1)** após a fixação, 3 lavagens de 5 min com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(2)** permeabilização das células com PBS-Triton 0,2% por 5 min; **(3)** 3 lavagens de 5 min com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(5)** incubação com PBS-BSA 5% por 30 min; **(5)** incubação com anticorpo primário diluído em PBS-BSA 1% em câmara úmida por 2 h a temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C; **(7)** 3 lavagens de 5 min com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(8)** incubação com anticorpo secundário diluído em PBS-BSA 1% em câmara úmida por 2 h a temperatura ambiente; **(9)** 3 lavagens de 5 min com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(10)** contracoloração dos núcleos celulares com 4',6'-diamidino-2'-fenilindol (DAPI; Molecular Probes® Invitrogen, EUA) 100 mg/L por 2 min para identificação das células; **(11)** 3 lavagens de 5 min com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(12)** lavagem das lamínulas em água destilada, retirada do excesso em papel filtro; **(13)** montagem das lâminas com o meio N-propil-galato (Merck, Brasil) 5% em glicerol 80% diluído em tampão fosfato 0,1 M de fosfato pH 8,0 para os anticorpos secundários fluorescentes.

Para confirmar os dados da literatura que afirmam que o Hoechst quando incorporado ao DNA de células BrdU positivas emite uma fluorescência menos intensa do que a das células BrdU negativas e pode ser usado para distinguir essas 2 subpopulações em uma suspensão celular (Mozdziak *et al.*, 2000), realizou-se imunocitoquímica não fluorescente para BrdU nas células isoladas por citometria de

fluxo e cultivadas por até 72h. Para isso, usamos o seguinte protocolo: **(1)** fixação das células com PFA 4% por 2-3 horas; **(2)** 3 lavagens de 5 min cada com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(3)** incubação com H₂O₂ 3% em PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4 (1:10) por 30 min; **(4)** incubação com HCl 2M à 37 °C por 1h; **(5)** lavagem com tampão borato pH 8,5; **(6)** 3 lavagens de 5 min com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(7)** permeabilização com PBS-Triton 0,5% por 10 min; **(8)** 3 lavagens de 5 min cada com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(9)** incubação com cloreto de amônio 50 mM por 15 min; **(10)** 3 lavagens de 5 min cada com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(11)** incubação com PBS-BSA 5% por 30 min; **(12)** incubação com anticorpo contra BrdU (anti-BrdU, 1:3; Amersham-Biosciences, Suíça; kit RPN 202) diluído em PBS-BSA 1% por 1h à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C em câmara úmida; **(13)** 3 lavagens de 5 min cada com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(14)** incubação com anticorpo secundário biotilado (1:600; Vector Laboratories, Inc., EUA) 45 min à 37 °C; **(15)** 3 lavagens de 5 min cada com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(16)** incubação com os reagentes A e B do kit HRP-ABC (VectaStain Elite ABC kit; Vector Laboratories, Inc., EUA) por 30 min à temperatura ambiente; **(17)** 3 lavagens de 5 min cada com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(18)** revelação com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich Corp., EUA) 5 mg/ml diluído em tampão Tris 0,1 M pH 7,6; **(19)** 3 lavagens de 5 min cada com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(20)** 3 lavagens de 5 min cada com PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4; **(21)** montagem das lâminas com Glicerol P.A. (Vetec, Brasil).

3.5. Processamento histológico

3.5.1. Encéfalos retrogradamente marcados com microesferas

Grávidas no 19º dia gestacional foram anestesiadas com éter, e seus embriões foram decapitados, perfundidos com solução salina (cloreto de sódio - NaCl 0,9%) e fixados com PFA 4% por via transcardíaca com bomba peristáltica (Masterflex; Cole Parmer Instruments Co., EUA), seus encéfalos retirados e pós-fixados por imersão em PFA 4%. Os encéfalos fixados foram emblocados em ágar 2,5% e seccionados coronalmente a 200 µm de espessura em vibrátomo (VT 1000S; Leica, Alemanha). Os cortes que continham o corpo caloso foram coletados, contracolorados com DAPI 100 mg/L por 5 min, lavados em PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4 e montados com Glicerol P.A. (Vetec, Brasil) sobre lâminas previamente recobertas com poli-L-lisina 200 µg/mL. As lâminas foram seladas com esmalte e mantidas protegidas da luz a 4-8 °C até a análise.

3.5.2. Encéfalos de animais marcados com BrdU

Para avaliação da dispersão das células marcadas com BrdU no córtex, filhotes P48 nascidos após a histerectomia parcial foram anestesiados com éter, sacrificados, perfundidos com NaCl 0,9% e fixados com PFA 4% por via transcardíaca com bomba peristáltica (Masterflex; Cole Parmer Instruments Co., EUA), seus encéfalos retirados e seccionados não-emblocados em vibrátomo (VT 1000S; Leica, Alemanha). As secções coronais com 50 µm de espessura foram coletadas em placas para imunohistoquímica flutuante (Netwell 3478 Costar; Corning Inc., EUA) contendo PBS 0,1 M de fosfato pH 7,4.

3.6. Imunohistoquímica

Apesar de a cronologia do nascimento das células corticais já ser extensamente descrita na literatura, como existe variação entre cepas de camundongos,

confirmamos, por imunohistoquímica, o destino laminar das células marcadas pela injeção de BrdU em E14, revelando este marcador em encéfalos adultos. Os animais foram sacrificados, fixados e seus encéfalos seccionados como descrito no item anterior.

O protocolo de imunohistoquímica para BrdU foi o mesmo usado para a imunocitoquímica não fluorescente deste marcador descrita no item 3.4, com algumas alterações: por se tratar de secções de 50 μm , estas foram coletadas em placas para imunohistoquímica flutuante e ficaram sob agitação orbital nas etapas de incubação para melhor penetração das soluções e anticorpos no tecido; usamos o anti-BrdU (1:500; Harlan Laboratories, Inc., EUA).

3.7. Captura e documentação de imagens

Para as análises das culturas de células fixadas usamos o microscópio óptico de fluorescência Axiovert (Zeiss, Brasil) equipado com filtros de rodamina (Schott-Zeiss BP 546 / FT 580 / LP 590), fluoresceína (Schott-Zeiss BP 450-490/FT 510 LP 520) e ultravioleta (Schott-Zeiss BP 365/FT 395/LP 397). Para análise das imunocitoquímicas e imunohistoquímicas usamos o microscópio óptico de fluorescência Axioplan (Zeiss, Brasil) equipado com os mesmos filtros. As imagens foram capturadas e documentadas por videocâmeras digitais AxioCam HRc e AxioCam (Zeiss, Brasil) acopladas aos microscópios Axioplan e Axiovert, respectivamente, e conectadas a microcomputadores, e otimizadas por comandos destas e do programa *AxioVision Rel 4.7*.

3.8. Análises Estatísticas

Para avaliar a eficiência da purificação das células de camada V pela citometria de fluxo, após imunocitoquímica revelando o BrdU, contamos as células positivas e negativas de 20 campos diferentes de 17 lamínulas e analisamos os dados no software Prisma 5 (GraphPad Software, Inc., EUA) utilizando o teste- t *Mann-Whitney* não-paramétrico *one-tailed* e estatística de coluna.

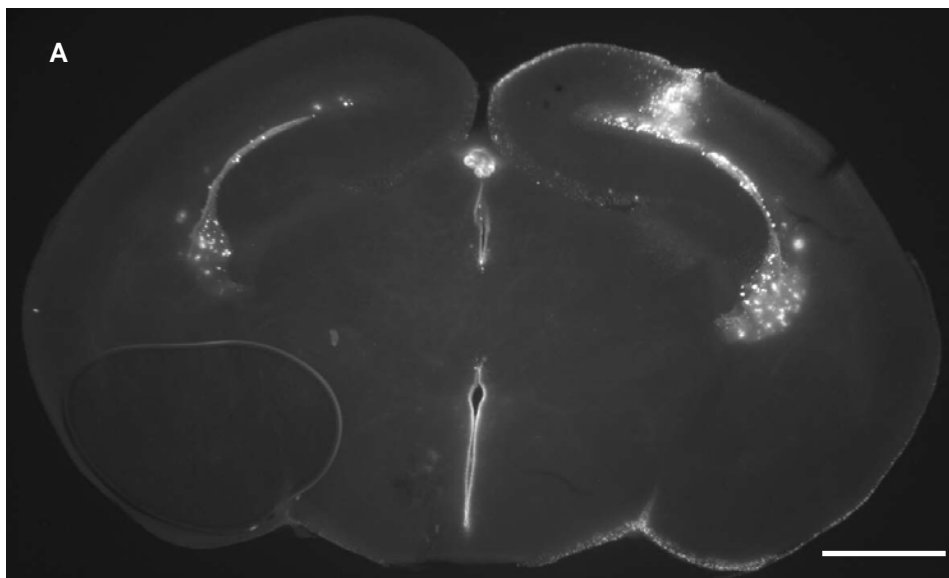
4. RESULTADOS

4.1. Marcação retrógrada *in vivo*

Na tentativa de obter células contralaterais retrogradamente marcadas, fizemos injeções *in utero* e em animais pós-natais. Microesferas fluorescentes nos encéfalos de animais embrionários (E18; n = 132) ou P3 (n=2), sendo a maior parte da ninhada utilizada para citometria de fluxo e cultivo enquanto alguns animais foram retirados para verificação do posicionamento da injeção e comprovação de células contralaterais.

4.1.1 *In situ*

A injeção de microesferas de látex fluorescentes verdes foi capaz de marcar células no hemisfério contralateral de animais embrionários tardios. No primeiro caso, as injeções foram *in utero*, no córtex dorso-medial bem próximo à linha média (Figura 16A) e as microesferas foram transportadas de um dia para o outro. Observou-se marcação na região homotópica contralateral (Figura 16B, C).



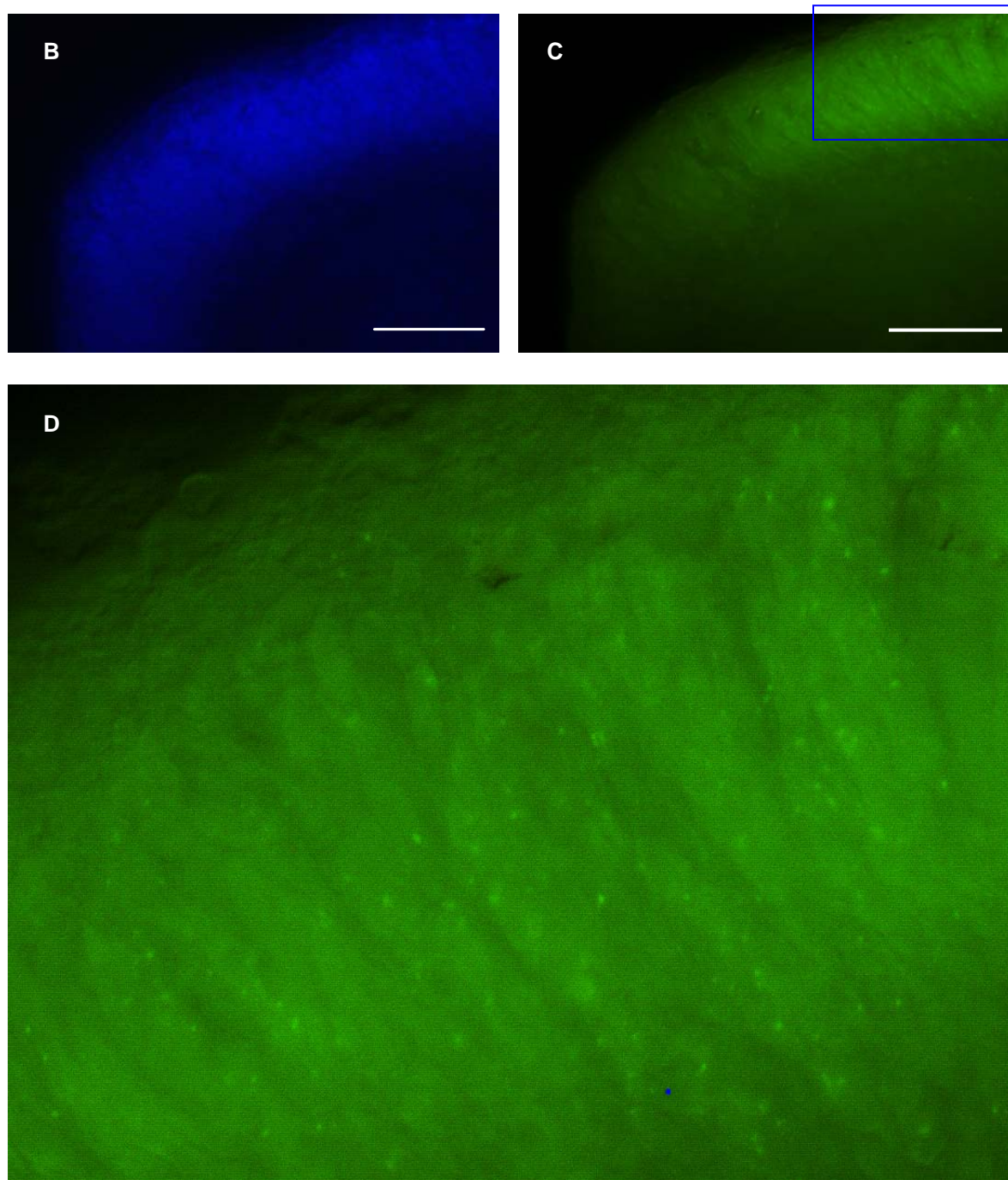


Figura 16: Fotomicrografias por epifluorescência de encéfalos E18 injetados *in utero*. **(A)** Corte coronal mostrando o sítio de injeção no córtex dorsal. Na imagem pode-se ver que os ventrículos laterais também estão indevidamente marcados. **(B-D)** Córtex contralateral contracorado com DAPI (B) e marcado com beads (C e D). A Figura D representa a área destacada pelo retângulo em C. Barras de escala: 200 μm **(A)**; 100 μm **(B-C)**.

4.1.2. *In vitro*

Após a injeção, as células corticais E18 foram separadas por citometria de fluxo, escolhendo a população a ser isolada com base nas características físicas detectadas pelo aparelho. A análise citométrica mostrou que as populações originadas dos córtices ipsi e contralaterais apresentaram parâmetros físicos semelhantes (Figuras 17) e o parâmetro extrínseco distinto, sendo as populações ipsilaterais mais intensamente marcadas, resultado coerente com o que se observa *in situ* (Figuras 14A).

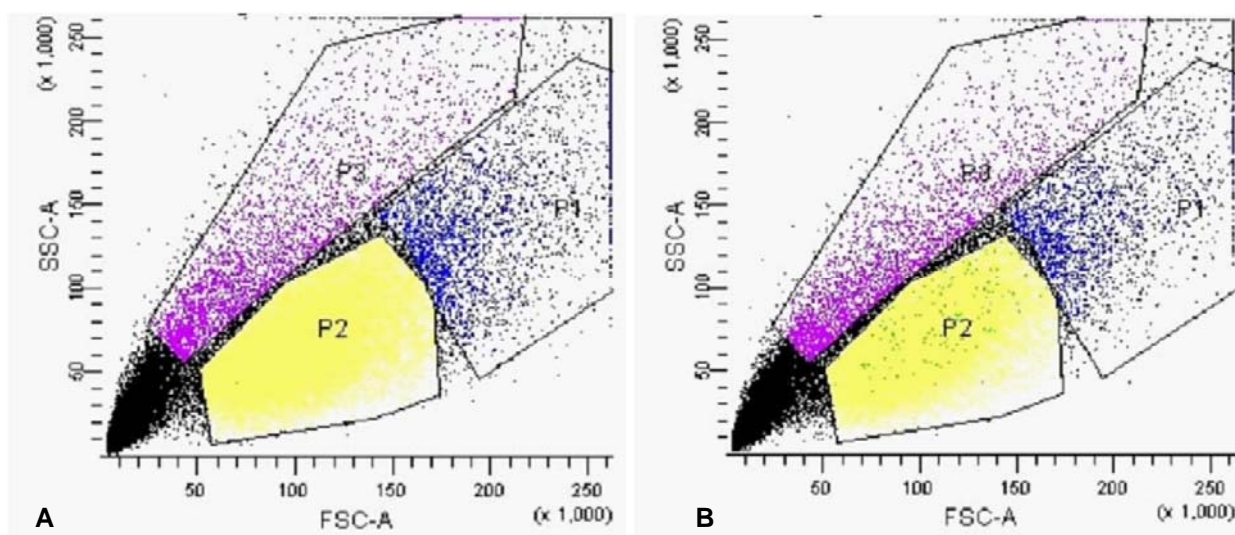


Figura 17: Gráficos gerados após a citometria de fluxo de células corticais obtidas a partir dos córtices ipsilateral (A) e contralateral (B) de animal injetado com beads verdes em E18 e dissociadas em E19. As populações P1 (azul) e P2 (amarela) apresentaram perfis de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) aparentemente compatíveis com as populações de neurônios de projeção.

Após observarmos marcação do córtex contralateral pelas microesferas (Figura 13) e um padrão para os parâmetros físicos relacionados (Figuras 14), testamos a sobrevivência das células em cultura após o processo de separação celular no citômetro.

Para os cérebros de animais injetados, a dissecação e separação das células no citômetro ocorreu 3 dias após a injeção. Nesse experimento, o córtex contralateral foi comparado a um hemisfério cortical de um animal controle em que não foi feita

injeção de marcadores. As amostras apresentaram o mesmo perfil de parâmetros intrínsecos revelados nos experimentos de injeção em animais embrionários, enquanto a intensidade de fluorescência foi maior na amostra do animal injetado (Figura 18).

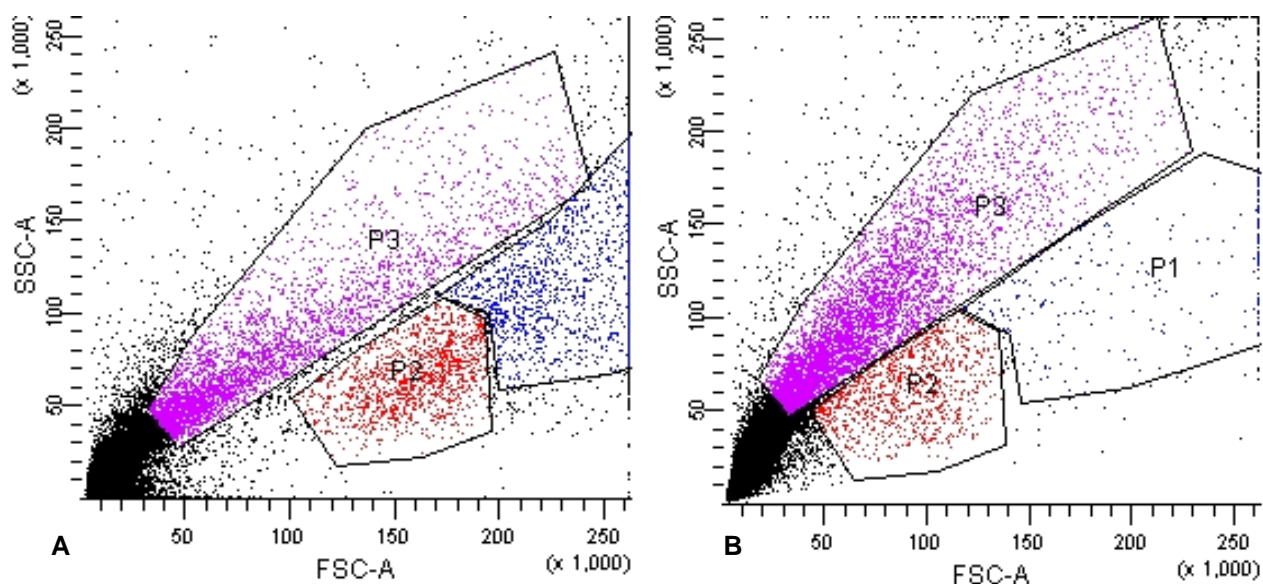


Figura 18: Gráficos gerados após a citometria de fluxo de células corticais dos córtices ipsi **(A)** e contralateral **(B)** de animais injetados com microesferas em P3 e dissociadas em P7. Observe que os perfis de tamanho (FSC) e granulidade (SSC) das células dos córtices de animais pós-natos e embrionários (Figura 13) são semelhantes.

Para ambas as idades (E18 e P3), selecionamos e separamos duas subpopulações da amostra de células contralaterais do animal marcado (identificadas como P1 e P2 nos gráficos das Figuras 14 e 15), em ambiente estéril, ressuspendemos e plaqueamos as células. A cultura foi fixada 1 dia depois, contracorada com DAPI e analisada. A análise por microscopia de fluorescência mostrou co-localização das marcações de DAPI e de microesferas fluorescentes (Figura 19).

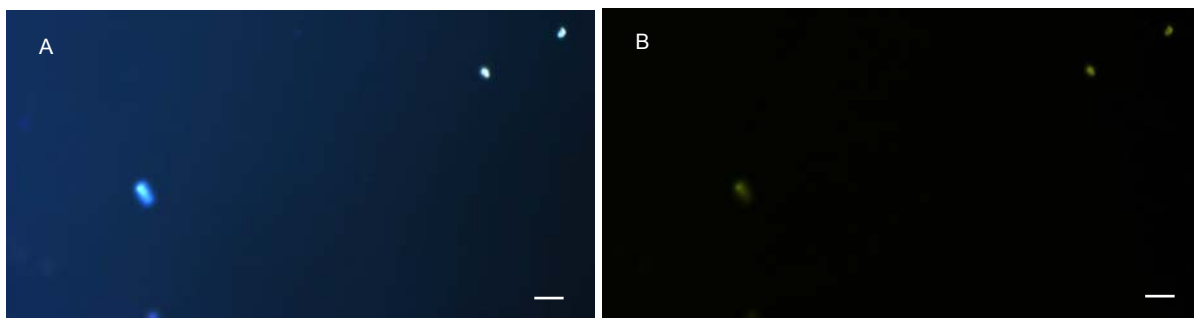


Figura 19: Fotomicrografia por epifluorescência de células marcadas com microesferas fluorescentes em E17 e isoladas por citometria de fluxo em E18. **(A)** Contracoloração com DAPI. **(B)** Marcação com as microesferas. Barras de escala: 20 μm .

Escolhemos as subpopulações P1 e P2 (Figuras 17 e 18) para verificar se uma delas correspondia aos neurônios calosos. Fizemos uma separação das células e as caracterizamos por imunocitoquímica. Buscamos identificar as populações **(1)** neuronal ou glial das células pela expressão de NeuN ou GFAP, respectivamente; **(2)** de neurônios de projeção pela ausência de expressão de GABA; e **(3)** de neurônios calosos pós-natais pela expressão de Calretinina. Os resultados indicaram: **(1)** que as subpopulações P1 e P2 eram GFAP-negativas (Figura 20); **(2)** eram de neurônios em sua maioria, em ambas (Figuras 21); **(3)** e GABA-positivas (Figuras 22); **(4)** em P3 as células das duas amostras expressavam Calretinina (Figuras 23). Quantitativamente, observamos o seguinte perfil de marcação nas populações P1 e P2, respectivamente: NeuN-positivas, 64 e 79%; GFAP-positivas, 0 e 19%; GABA-positivas, 9 e 64%; Calretinina-positivas, 0 e 100% (Figura 24).

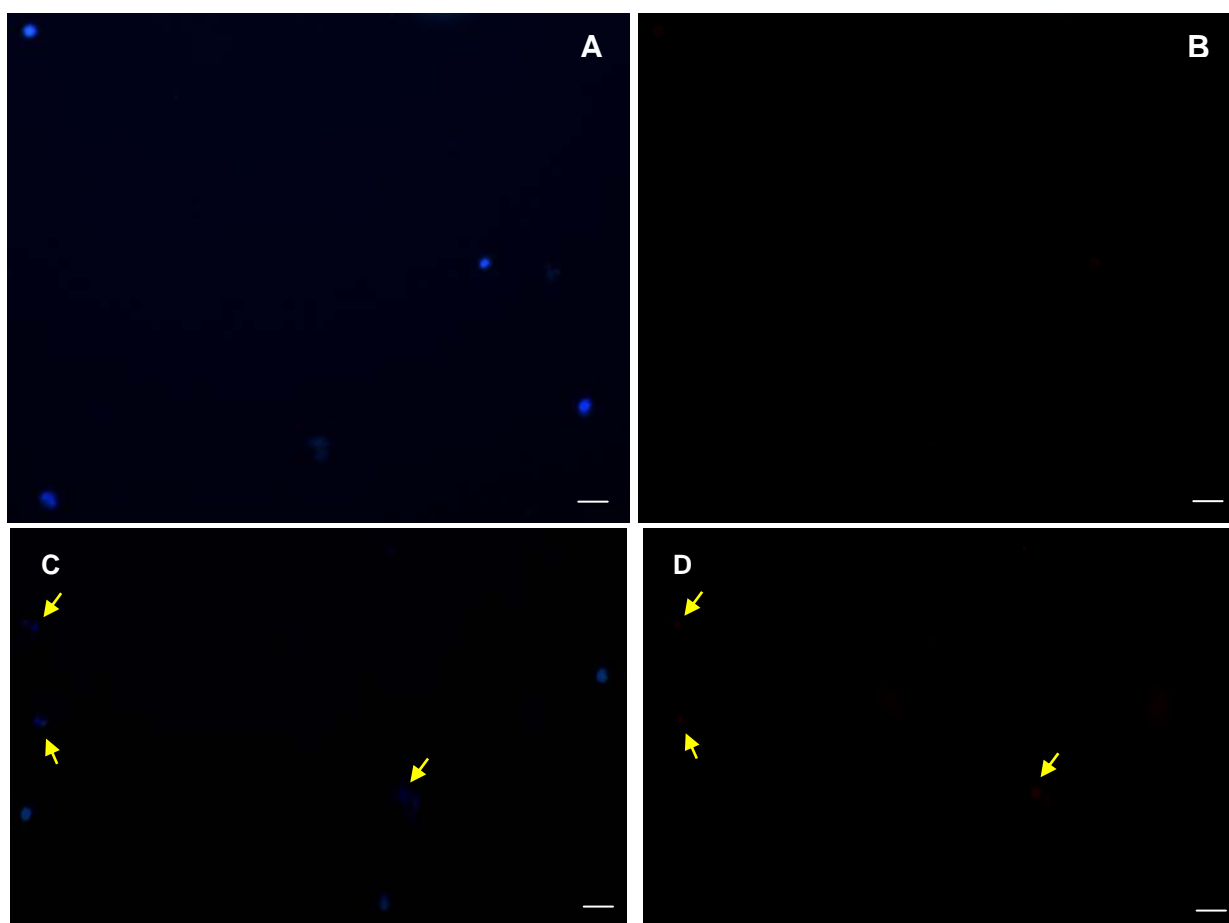


Figura 20: Fotomicrografias por epifluorescência de DAPI e imunocitoquímica contra GFAP das populações P1 (A e B) e P2 (C e D). Não há células contrascoradas com DAPI e GFAP-positivas (setas) em P1, e há poucas em P2. Barras de escala: 20 μm .

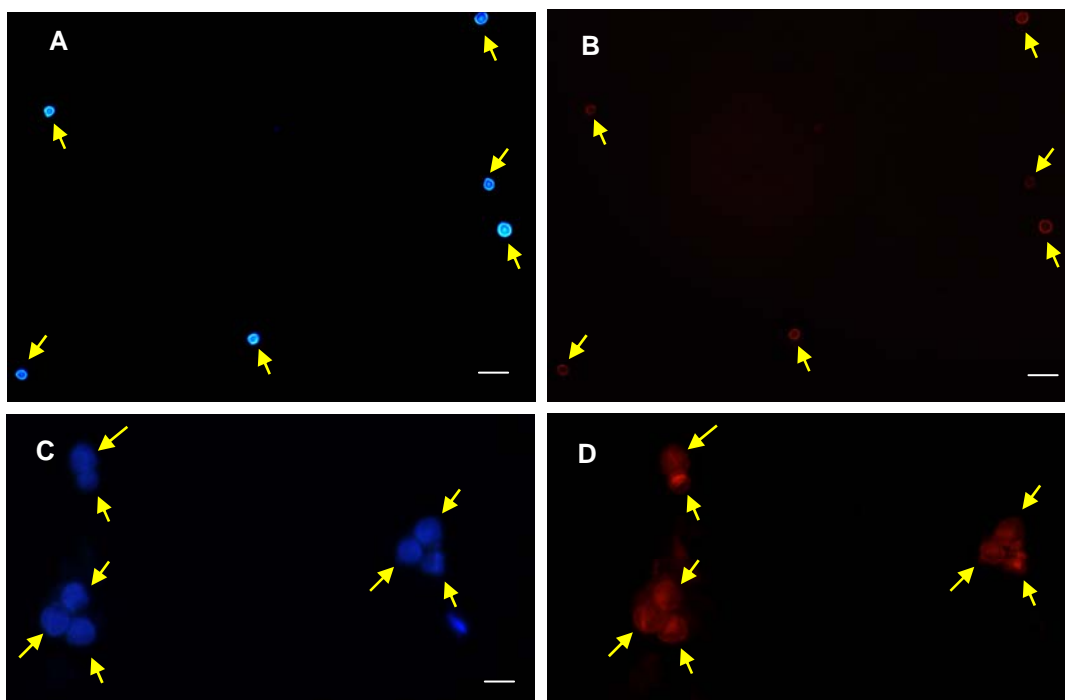


Figura 21: Fotomicrografias por epifluorescência de DAPI e imunocitoquímica contra NeuN das populações P1 (A e B) e P2 (C e D). Setas apontam células contracoradas com DAPI (A e C) e NeuN-positivas (B e D). Barras de escala: 20 μm (A e B); 10 μm (C e D).

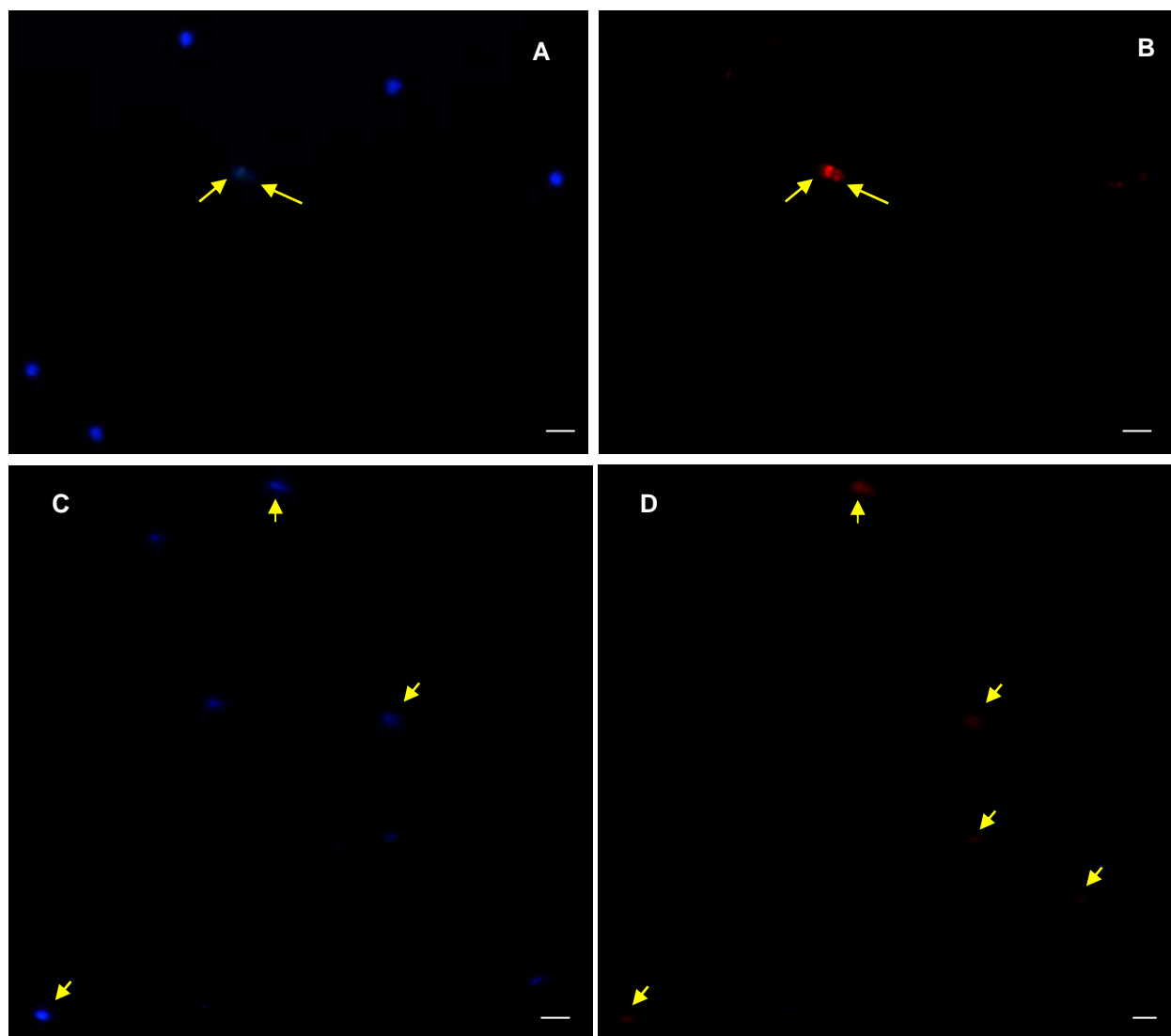


Figura 22: Fotomicrografias por epifluorescência de DAPI e imunocitoquímica contra GABA das populações P1 (A e B) e P2 (C e D). Setas indicam células visualizadas pela contracoloração com DAPI e GABA-positivas (B e D). Barras de escala: 20 μm .

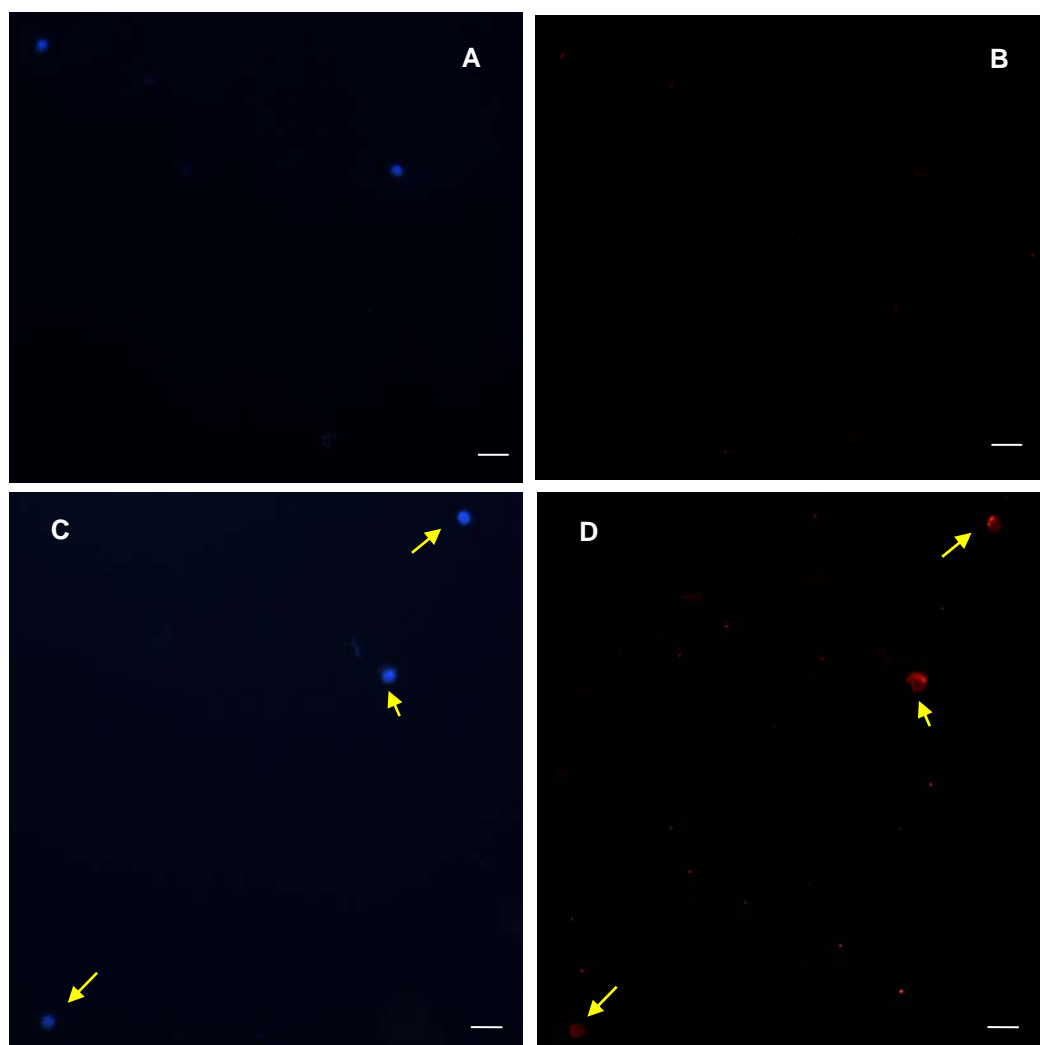


Figura 23: Fotomicrografias por epifluorescência de DAPI e imunocitoquímica contra Calretinina das populações P1 (A e B) e P2 (C e D). Células Calretinina-positivas não são encontradas na população P1, mas em P2 todas as células contracoloradas com DAPI apresentaram marcação positiva para este marcador (setas em C e D). Barras de escala: 20 μm .

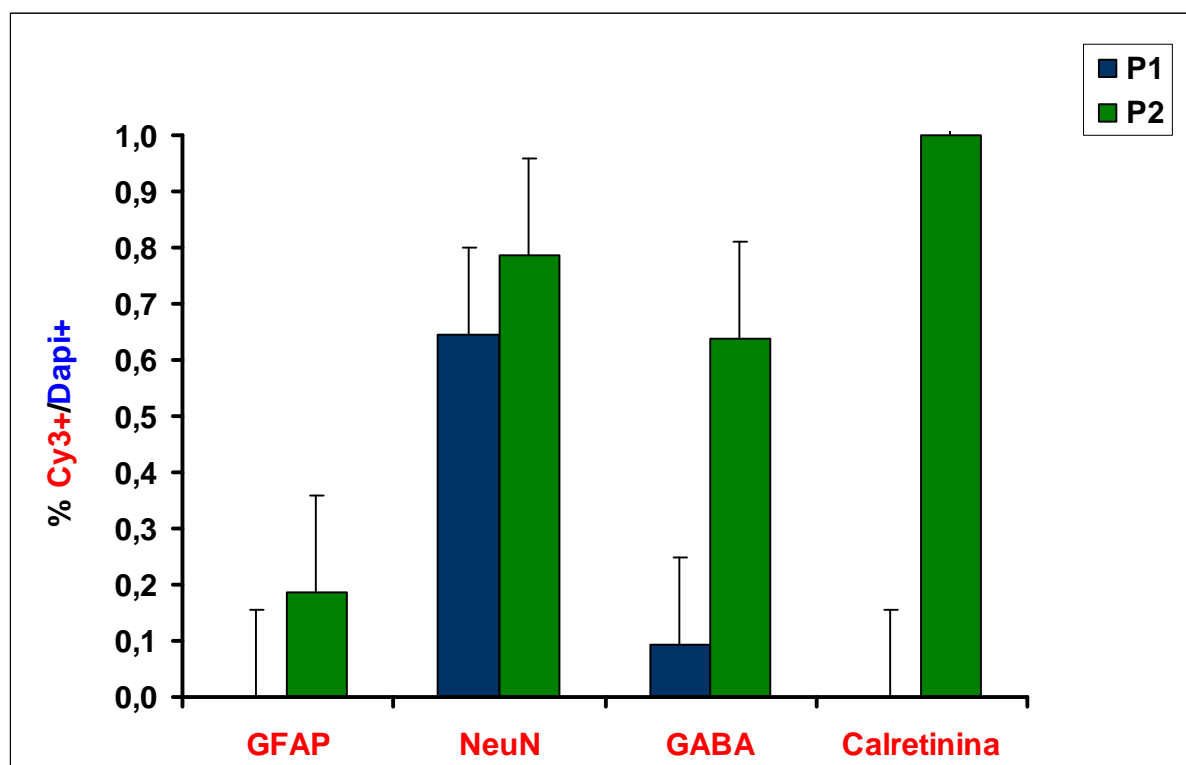


Figura 24: Quantificação da imunocitoquímica das células marcadas com microesferas em P3 e isoladas por citometria de fluxo. Nas duas populações, a maioria das células isoladas são NeuN-positivas e poucas são GFAP-positivas. Pela imunocitoquímica contra GABA, 9% das células de P1 e 64% de P2 são GABA-positivas. A marcação para Calretinina apresenta uma diferença entre as populações P1 e P2 que pode significar que a primeira representaria em sua maioria os neurônios de projeção subcortical, e a segunda os calosos. As barras representam a variação interna de um experimento em quintuplicata.

4.2. Marcação com BrdU

Como método alternativo e mais simples para isolar células para experimentos de cultura, marcamos as células *in vivo* com BrdU no dia de nascimento da população celular da camada V do neocórtex para isolá-las das demais por citometria de fluxo baseada na intensidade de fluorescência de um segundo marcador nuclear. Os experimentos e resultados descritos seguiram a técnica de separação celular descrita para linhagens celulares e células musculares (Mozdziak *et al.*, 2000) e visaram estabelecer as condições do processo de separação nas quais as células separadas sobrevivam em cultura e emitam neuritos, podendo ser utilizadas em estudos *in vitro* de direcionamento axonal da população em questão.

4.2.1. Citometria de fluxo

Grávidas (n = 10) no 14º dia gestacional receberam uma injeção i.p. de 50 mg/Kg de BrdU para marcar os neurônios da camada V. No 18º dia gestacional, dissecou-se a região do córtex próxima à linha média, as células dissociadas foram incubadas com Hoechst 33342 como descrito no item 3.2. A análise citométrica mostrou, como descrito anteriormente (Mozdziak *et al.*, 2000), a presença de 2 subpopulações com intensidades de fluorescência emitida pelo Hoechst distintas (Figura 25). Primeiramente foi feita análise dos perfis de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células. Em seguida, demarcou-se uma região do gráfico que incluía células vivas e excluía debris e células mortas (região R2 na Figura 25A). Em seguida, foi feita análise da fluorescência do Hoechst 33342 através de dois tipos de gráfico: no primeiro (Figuras 25B e F), a análise foi comparativa à de uma fluorescência controle (FL1); no segundo, a análise foi relativa à intensidade de fluorescência apenas do marcador (Figuras 25C e G), criando-se o histograma da amostra. Na segunda análise, observou-se a presença de duas populações principais com intensidades de fluorescência distintas (regiões R3 e R4 nas Figuras 25B e C). Foram isoladas células da população com menor intensidade de marcação de Hoechst (áreas R3 e R4 nas Figuras 25B e C). As demarcações (R2, R3 e R4) dos gráficos de análise pós-isolamento basearam-se nas regiões correspondentes dos gráficos de análise pré-isolamento. Após a separação, uma pequena alíquota das amostras recuperadas era novamente analisada para verificar o grau de pureza da mesma (Figuras 25D-F). As células separadas por citometria de fluxo eram imediatamente plaqueadas e foram mantidas em cultura por 72 horas.

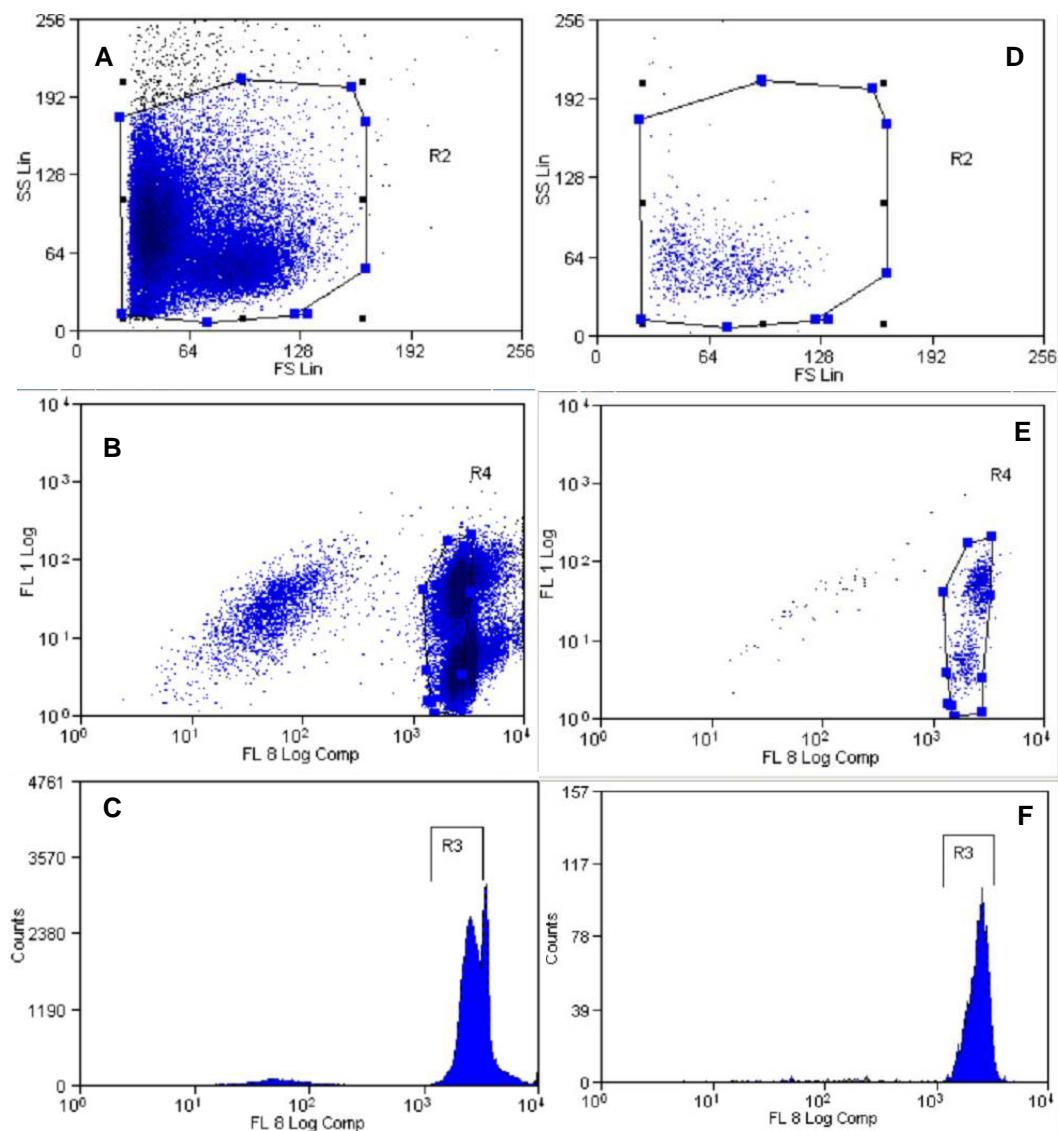


Figura 25: Análise por citometria de fluxo das células dissociadas a partir de encéfalos de embriões marcados com BrdU em E14 e incubadas com Hoechst 33342 previamente ao isolamento (A-C) e após o mesmo (D-G). Cada ponto nos gráficos A-F corresponde a uma célula. (A e D) Perfis de tamanho (FS) e granulosidade (SS) das células corticais; (B e E) gráficos de intensidade de marcação do Hoechst (FL8) e de fluorescência controle (FL1) das células da região R2 dos gráficos A e E. R3 e R4 representam as células da população R2 com baixa fluorescência de Hoechst; (C e F) Histogramas das células da região R2 dos gráficos A e E. A marcação é considerada positiva a partir do ponto 10^1 deste gráfico após calibração com uma amostra não incubada com Hoechst.

4.2.2. Imunocitoquímica

Para verificar o grau de pureza da população separada, realizou-se uma imunocitoquímica para revelar o BrdU. Espera-se que células nascidas em E14, portanto com alta incorporação de BrdU, tenham baixa intensidade de fluorescência da marcação do Hoechst 33342, e que estas células sejam a maioria plaqueada. As

análises microscópicas mostraram que a maioria ($80,73\% \pm 1,577$, $n=4$ experimentos, 308 campos de $0,4 \text{ mm}^2$ analisados) das células plaqueadas era BrdU-positiva, e que a fluorescência emitida nestas pelo Hoechst era menos intensa nestas (Figura 26 e 27).

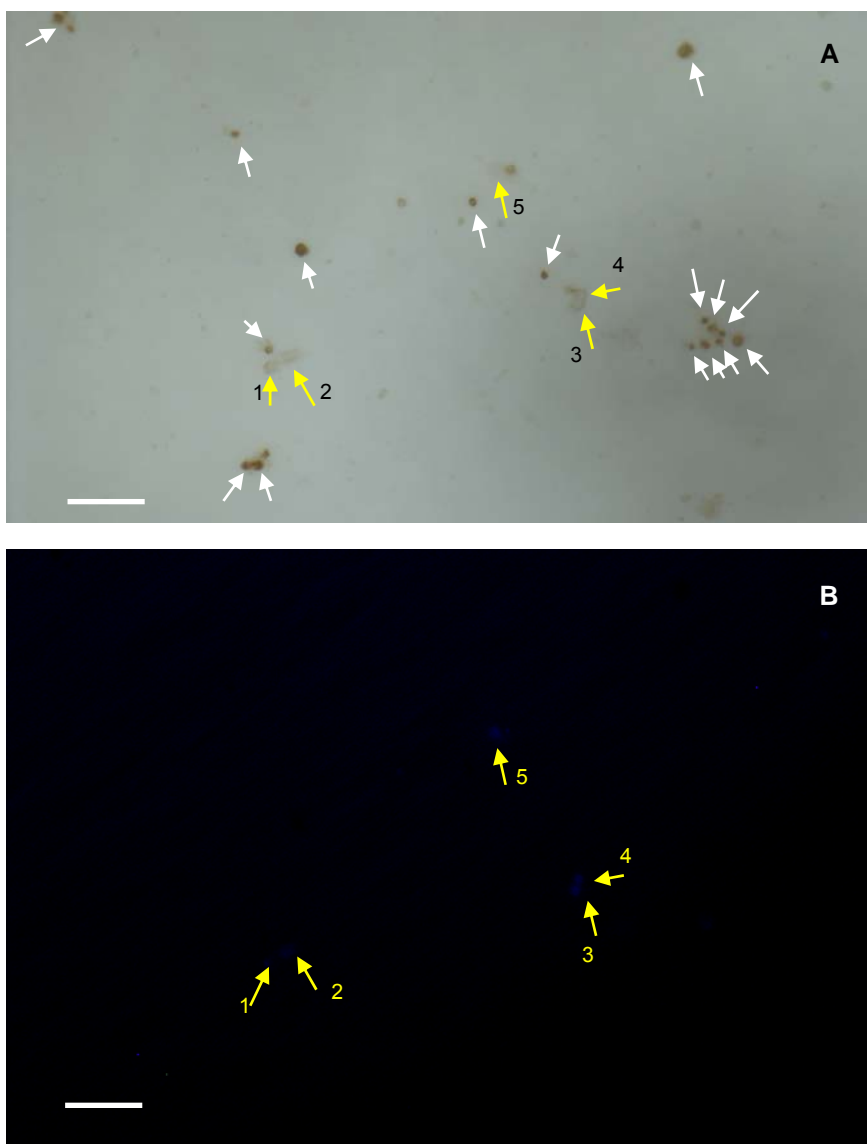


Figura 26: Fotomicrografias por luz transmitida (A) e epifluorescência (B) de células dissociadas após 72 horas de cultura e imunomarcadas para BrdU (núcleos marrons em A). Note que núcleos BrdU-positivos (setas brancas) não são visualizados no filtro de fluorescência do Hoechst e núcleos BrdU-negativos (setas amarelas numeradas) são Hoechst-positivos. Barras de escala: $20 \mu\text{m}$.

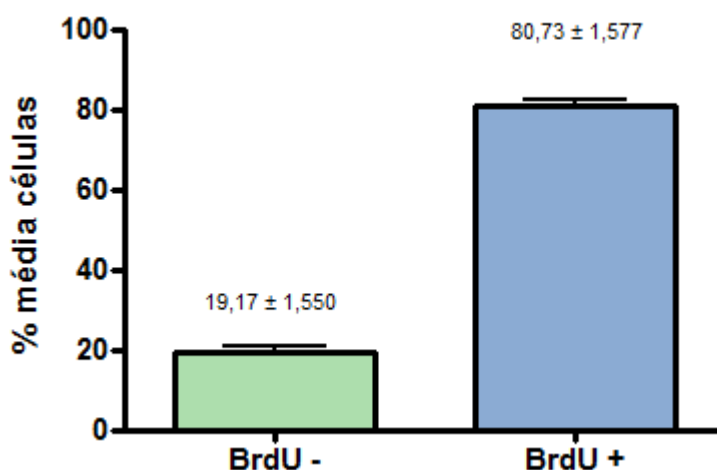
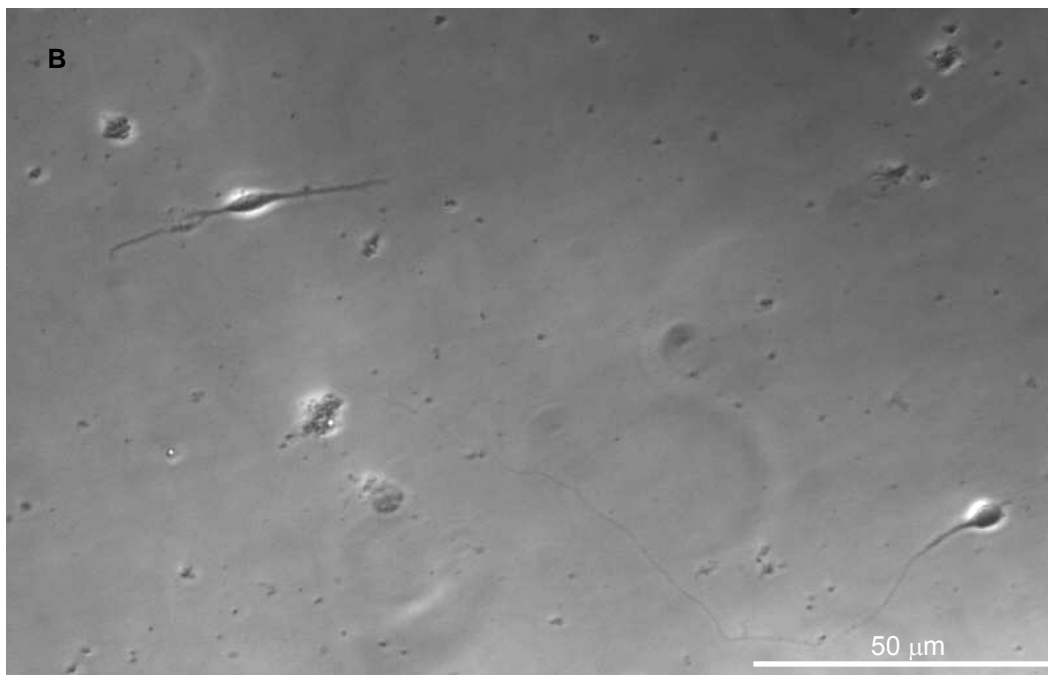
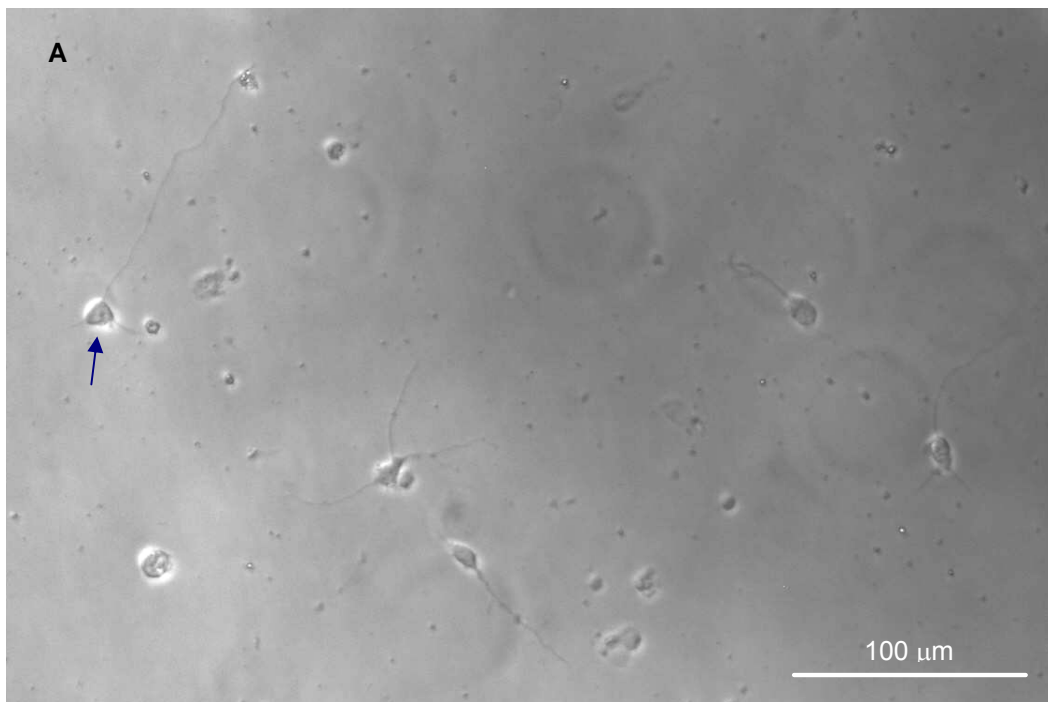


Figura 27: Percentuais das células BrdU-negativas e -positivas na população isolada por citometria de fluxo e cultivada por até 72 horas. As barras representam a média \pm desvio padrão. $n=4$ $p<0,0001$ (Teste t Mann-Whitney, com intervalo de confiança de 5%).

4.2.3. *In vitro*

Além de confirmar a possibilidade de separação das células de uma determinada camada cortical por citometria de fluxo a partir dos efeitos deste marcador de DNA sobre a emissão de fluorescência pelo Hoechst, buscamos também definir as condições ideais de pressão e o diâmetro do *nozzle* usado para separação das células para que estas se mantivessem viáveis em cultura. Analisando as culturas observamos a presença de neuritos extensos e com ramificações já nas primeiras 24 h de cultura 24 (Figura 28).



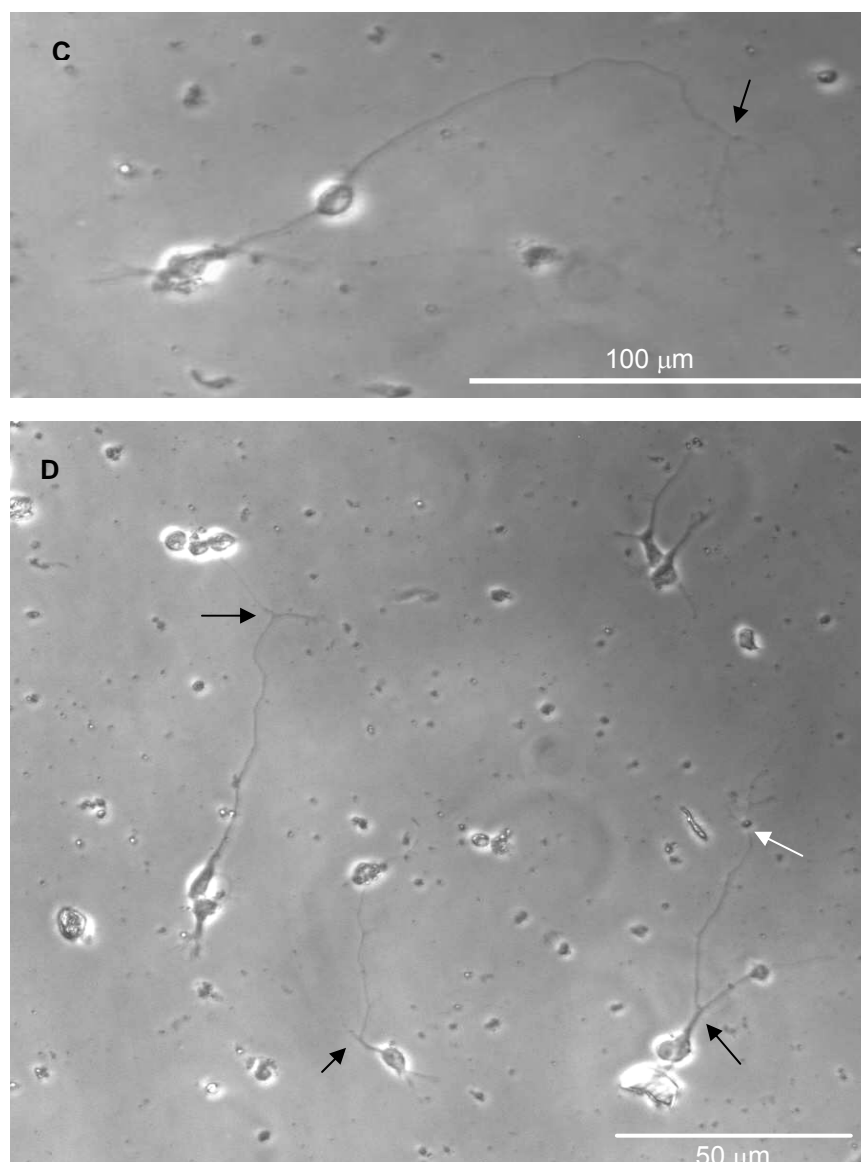
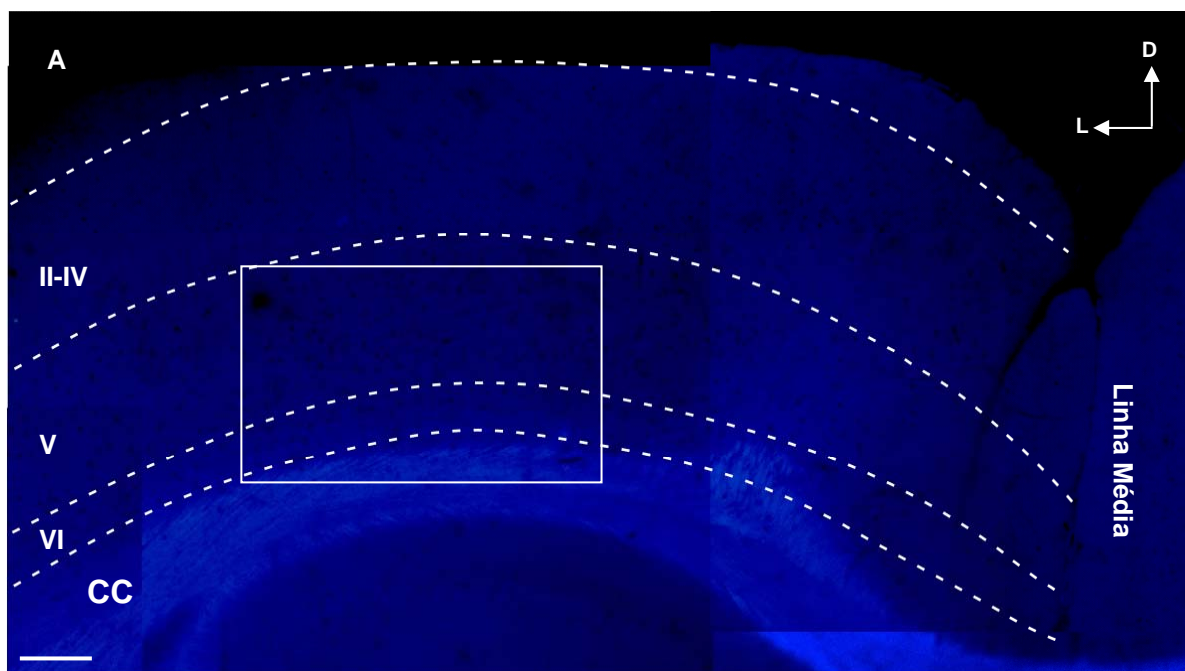
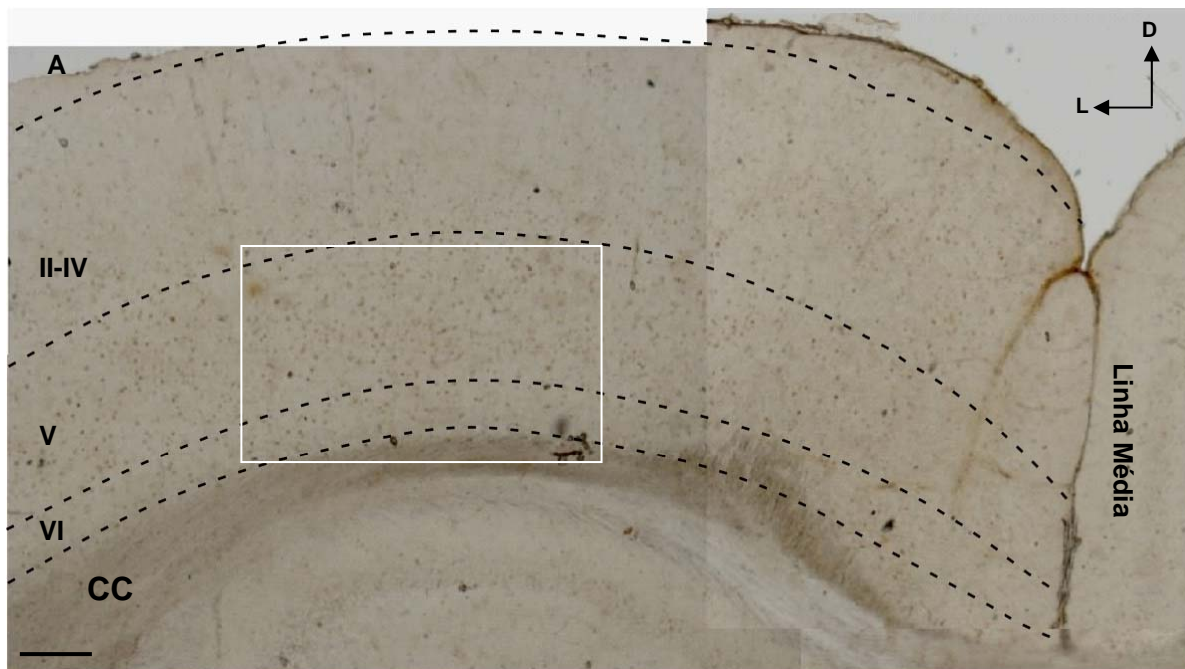


Figura 28: Fotomicrografias de células isoladas por citometria de fluxo e mantidas em cultura. A viabilidade celular é preservada após a separação das populações no citômetro. Em menos de 24 horas, observa-se uma célula piramidal típica com dendritos basais e um dendrito apical (seta azul) e longos prolongamentos neuríticos (A-D), com bifurcações (setas pretas) e ramificações (seta branca). Barras de escala indicadas nas imagens.

4.2.4. *In situ*

Para avaliar a dispersão laminar das células corticais marcadas após injeção de BrdU em E14, animais ($n = 2$) da mesma ninhada dos embriões utilizados para os experimentos *in vitro* foram sacrificados em P48 como descrito no item 3.5, e procedeu-se a imunohistoquímica flutuante contra BrdU descrita no item 3.6 nas

secções de seus encéfalos. Como pode ser observado na Figura 29, a maioria das células estabeleceu-se na camada V.



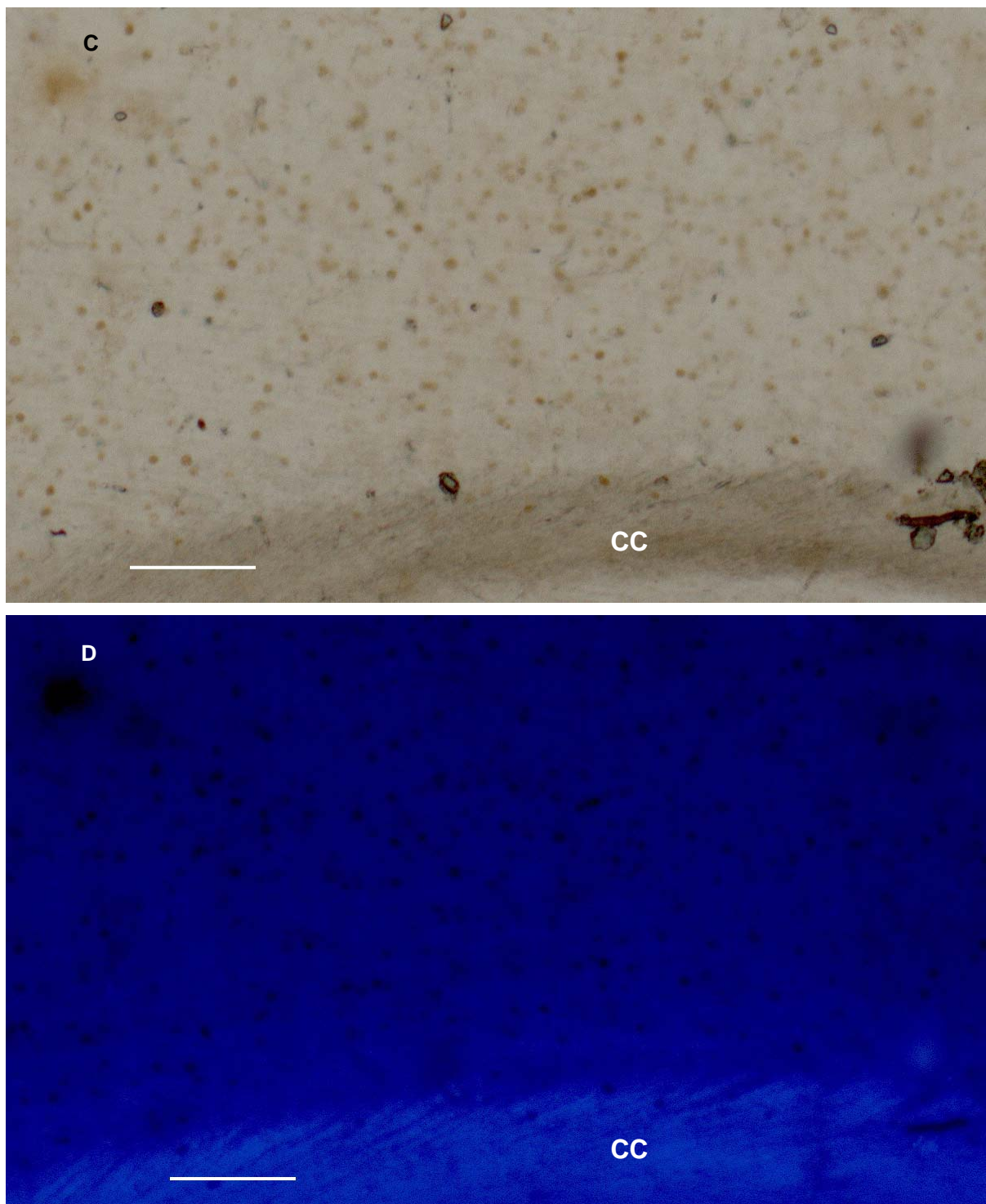


Figura 29: Montagens de fotomicrografias de cortes coronais de encéfalos marcados com BrdU em E14 e sacrificados em P48. **A e C** representam imagens da imunohistoquímica contra BrdU, e **B e D**, o tecido contracorado com DAPI. Em **A**, observa-se que a maioria das células BrdU-positivas (marcação marrom) estabeleceram-se na camada V do córtex. **C e D** representam ampliações das áreas demarcadas pelos retângulos em **A** e **B**, respectivamente. CC: corpo caloso; D: dorsal; L: lateral. Barras de escala: A e B: 200 μm ; C e D: 100 μm .

5. DISCUSSÃO

Uma das principais características do córtex cerebral é sua diversidade de subtipos celulares, cada um com um perfil genético, maquinaria molecular e bioquímica, morfologia, padrões eletrofisiológicos e de conexão típicos. Muitos destes parâmetros celulares estão bem descritos e são válidos para distinguir as populações de células nervosas corticais, mas muito ainda precisa ser revelado, principalmente em relação à origem ontogenética da variedade dos perfis. Nesse sentido, modelos *in vitro* podem contribuir muito para essa compreensão, mas esbarram nas dificuldades de interpretar resultados obtidos a partir de culturas compostas por tipos distintos interagindo entre si, ou de purificar cada um deles para caracterizá-los isoladamente e mais facilmente entender as complexas interações entre eles e como cada um contribui para o funcionamento da estrutura como um todo.

A proposta inicial do presente trabalho era estudar uma etapa crucial do desenvolvimento do SN – o crescimento axonal - no contexto do neocórtex de roedores. No entanto, a questão técnica acima comentada nos levou a tentar uma nova abordagem metodológica para purificar a subpopulação neuronal cujos axônios formam a principal comissura telencefálica de mamíferos euterianos e, posteriormente, poder caracterizar a influência e os mecanismos de ação de uma molécula no direcionamento dessas fibras. Nas próximas páginas, serão discutidos: **(1)** a técnica escolhida para o isolamento das células corticais; **(2)** o paradigma classicamente aplicado para diferenciar populações neuronais de projeção; **(3)** a aplicabilidade do uso de uma metodologia extensamente descrita no campo da citogenética como alternativa ao item **2**; **(4)** a influência das estratégias ontogênicas do neocórtex no uso deste método.

5.1. Purificação de Neurônios por Citometria de Fluxo

Apesar de ser, obviamente, uma ferramenta extremamente útil para a neurobiologia, a técnica de separação de células por citometria de fluxo permaneceu pouco explorada após sua introdução nesta área, em meados na década de 80. Os primeiros trabalhos mostraram a viabilidade de se obter neurônios intactos do cérebro inteiro (Meyer *et al.*, 1980) de ratos adultos, e do gânglio da raiz dorsal, córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e medula espinhal de ratos embrionários pela técnica em questão e da sua manutenção em cultura após o isolamento (St. John *et al.*, 1986); alguns destes trabalhos também isolaram motoneurônios marcados retrogradamente com conjugado de lectina com um fluorocromo (Calof & Reichardt, 1984) ou enriqueceram uma subpopulação rara (2%) de neurônios de dois núcleos hipotalâmicos pela imunomarcação do peptídeo neurofisina, aumentando sua frequência para cerca de 80% (Paden *et al.*, 1986). Féron e colaboradores (1995) isolaram células neuroepiteliais de ratos adultos usando marcadores fluorescentes retrógrados e demonstraram que, apesar da fluorescência mais intensa e duradoura do Dil, o *Fast Blue* constitui melhor marcador para a citometria pois sua marcação citoplasmática elimina os fragmentos celulares e seu espectro de marcação mais estreito é compatível com outras marcações. Este trabalho também demonstrou que as células mantiveram sua morfologia pós-isolamento nas condições estabelecidas – 125 células isoladas/ segundo com *nozzle* de 76 µm. Trabalhos com células neurais fetais humanas usaram os aspectos físicos para separar neurônios e astrócitos e também conseguiram resultados satisfatórios em cultura, como evidenciado pelas análises morfológica, funcional e imunocitoquímica, e após o transplante de neurônios estriatais em encéfalos de ratos adultos após 4 semanas (Rozental *et al.*, 1995; Chiu *et al.*, 1998).

No início desta década, outros grupos adotaram a marcação retrógrada com moléculas fluorescentes para purificar subpopulações específicas de córtices em desenvolvimento e neonatos e da retina madura de roedores ou de animais transgênicos expressando marcadores de subtipos neuronais ligados a moléculas fluorescentes para estudos *in vitro* do desenvolvimento e de regeneração (Catapano *et al.*, 2001; 2004; Fischer *et al.*, 2004). Tanto as injeções *in utero* de rastreadores fluorescentes quanto o uso de linhagens de animais transgênicos mostraram-se eficientes para obtenção de amostras puras e homogêneas em relação à classe neuronal por citometria de fluxo. A imunomarcação de antígenos subtipo-específicos, estratégia largamente usada para isolamento de células do sistema hematopoiético por FACS, encontra uma dificuldade para ser aplicada em neurobiologia devido à existência de poucos marcadores de superfície que distinguem os muitos subtipos neuronais com precisão uma vez que duas ou mais classes podem expressar moléculas em comum. Com os avanços da neurogenética, novos marcadores vêm sendo descritos, mas grande parte destas moléculas são fatores de transcrição cujo uso em citometria requer a fixação das células. Devido a essas limitações do nosso campo de estudos, buscamos alternativas para identificar a população de nosso interesse e prosseguir com a investigação *in vitro* da corticogênese.

Em uma primeira etapa deste trabalho, seguimos a metodologia descrita por Catapano e colaboradores (2001) para marcar e isolar as células calosas. Nossas análises de citometria das células de animais embrionários e pós-natais marcados com microesferas fluorescentes nas mesmas idades apontaram para padrões de intensidade de fluorescência, tamanho e granularidade bem similares entre as populações relacionadas. Após apenas 24 h em cultura, as células selecionadas e separadas foram analisadas e mostraram marcação positiva para as microesferas

fluorescentes. Também observamos que as amostras de córtex contralateral analisadas apresentavam, dentro de cada uma delas, populações marcadas com parâmetros celulares intrínsecos (tamanho e granularidade) um pouco distintos. Intuitivamente, não haveria outra possibilidade para a identidade dessas células contralaterais com marcação no espectro de emissão das microesferas fluorescentes senão neurônios de projeção calosos. Considerando a heterogeneidade da população de neurônios de projeção e outros conhecimentos da ontogênese do neocórtex, buscamos determinar a identidade dessas células. Sendo assim, em um experimento-piloto único, marcamos um dos hemisférios de animais pós-natos com microesferas, separamos duas sub-populações contralaterais baseados em seus perfis de tamanho e granulosidade e fizemos reações imunocitoquímicas contra marcadores glial – GFAP – e neuronal – NeuN - para confirmar o fenótipo neuronal; contra o neurotransmissor de interneurônios, GABA, para excluir essa população de neurônios corticais; e contra a proteína ligadora de cálcio, Calretinina, expressa na população calosa a partir de P3 e não na de projeção subcortical (Molnar & Cheung, 2006). Os resultados de imunofenotipagem para os marcadores neuronais e gliais foram coerentes com nossas expectativas: a maioria das células separadas nos dois experimentos analisados eram NeuN-positivas e GFAP-negativas. Aparentemente, a elevada frequência de marcação Calretinina-positiva na população P2 (perfil de tamanho menor em relação a população P1) falaria a favor da hipótese de que esta população seria a população calosa e a outra, a subcortical. No entanto, contrariando o esperado, uma grande proporção de células dessa mesma população era GABA-positiva, perfil bioquímico incompatível com a população de neurônios de projeção. Além disso, a interpretação dos resultados da identidade do subtipo neuronal da população P2 encontra mais

dois obstáculos: **(1)** a Calretinina também é encontrada em interneurônios (Xu *et al.*, 2006; Fogarty *et al.*, 2007), limitando seu uso como marcador caloso pós-natal; **(2)** também se encontra expressão de GABA em neurônios de projeção (Tomioka *et al.*, 2005; Higo *et al.*, 2007). Uma vez que nosso interesse é estudar a população calosa durante o período embriogênico, não nos aprofundamos nessa questão, pois a Calretinina não é expressa nos neurônios de nosso interesse no período pré-natal, e seguimos tentando otimizar a injeção *in vivo* de microesferas em embriões E18 e em busca de marcadores de células calosas embrionárias em camundongos.

Entretanto, a sobrevivência das células marcadas *in utero* não apresentou resultados satisfatórios, não sendo observado presença de neuritos das células marcadas com microesferas fluorescentes em cultura com as condições de isolamento aplicadas – 3000 eventos/ segundo com pressão de 40 PSI. Em contrapartida, utilizando a marcação de BrdU e Hoechst, apesar de não ser possível separar especificamente neurônios calosos por FACS, fazendo a separação com uma pressão de 20 PSI e em *nozzle* de 100 μm , obtivemos neurônios viáveis em cultura e que foram capazes de emitir ramificações.

5.2. Rastreamento Neuronal

Os marcadores usados para revelar o(s) alvo(s) das populações de neurônios corticais de projeção e que utilizam o sentido do fluxo axoplasmático que supre o terminal axonal com moléculas que são produzidas no soma e transportadas até ele são chamados *anterógrados*. Os aminoácidos radioativos foram os primeiros “marcadores” anterógrados usados apresentando as vantagens do baixo peso molecular, da rápida incorporação e de serem transportados pela fenda sináptica (Wise & Jones, 1976; Köbbert *et al.*, 2000). Atualmente usam-se lectinas vegetais, a

subunidade β da toxina do cólera, a leuco-aglutinina, a biocitina e neurobiotinas, carbocianinas e aminas dextranas (Vercelli *et al.*, 2000). Para estudar a origem cortical das conexões, explora-se o transporte *retrógrado*, através do qual sinais moleculares são enviados do axônio para o soma do neurônio. A enzima peroxidase da raiz-forte (HRP) foi a primeira molécula a ser usada como marcador retrógrado (Vercelli *et al.*, 2000 para referências). Em seguida, surgiram marcadores fluorescentes como carbocianinas, *Fast Blue*, *True Blue*, *Nuclear Yellow*, *Lucifer Yellow*, *Fluoro-Gold*, aminas dextranas fluorescentes (Köbbert *et al.*, 2000 para referências) e microesferas, e não fluorescentes como a subunidade β da toxina do cólera.

O marcador pode ser colocado no tecido através de injeção por pressão, injeção iontoforética ou inserção de cristais. A captação pode ser ativa ou passiva. No primeiro caso, o marcador é captado pelo terminal sináptico intacto ou por fibras rompidas pelo processo de colocação do marcador. A eficiência desta captação varia de um para outro, alguns são melhor captados pelo terminal intacto enquanto outros pelas fibras lesionadas. No caso da passiva, o gradiente de concentração local do marcador é o responsável pela entrada deste na célula. Marcadores hidrofílicos acumulam-se em vesículas endocíticas e são transportados ativamente enquanto os lipofílicos se inserem na membrana da célula e difundem-se por esta ou por vesículas de reciclagem de lipídeos da membrana. O marcador também pode ser colocado diretamente no citoplasma de células individuais através de injeções intracelulares. A difusão do marcador ocorre por transporte vesicular ou pela membrana no caso de moléculas lipofílicas. A difusão por vesículas é eficiente para longas distâncias mas só ocorre em tecido vivo enquanto a difusão pela membrana permite a marcação de tecido fixado. Em relação à visualização da marcação, esta

pode ser detectada direta ou indiretamente. No caso de marcadores fluorescentes, a visualização da(s) célula(s) marcada(s) *in vivo* ou *in vitro* é direta e a marcação compatível com outros experimentos – eletrofisiologia, cultura de célula/tecido etc. A variedade de marcadores fluorescentes desenvolvidos com espectros de absorção/emissão distintos permite o uso combinado de múltiplos marcadores no mesmo tecido, mas eles não são uma boa opção para tecidos parafinizados e crio-seccionados e apresentam a limitação de perderem a intensidade da fluorescência emitida quanto mais o marcador é exposto à luz. Os demais marcadores podem ser visualizados com métodos imunohistoquímicos como anticorpos secundários, peroxidase-anti-peroxidase, avidina-biotina-peroxidase e reações com fosfatase alcalina ou peroxidase (Köbber *et al.*, 2000). O desenvolvimento técnico-científico possibilitou o desenvolvimento de novos marcadores e novas técnicas de marcação e um conhecimento crescente da estrutura axonal e dos mecanismos envolvidos no transporte de materiais nessa estrutura, garantindo avanços nos estudos de neuroanatomia, neurogenética, neuroquímica e das neurobiologias molecular e celular de subpopulações específicas, principalmente pelo intercâmbio de conhecimento entre elas.

Desde sua introdução nos estudos neuroanatômicos, as microesferas vêm sendo empregadas como uma ferramenta valiosa para o rastreamento de vias axonais por não serem citotóxicas; produzirem sítios de injeção pequenos e sem necrose; poderem ser usadas em estudos com dupla marcação e em combinação com outras técnicas funcionais, histológicas e de biologia molecular; sua fluorescência ter uma duração relativamente longa; e marcarem diretamente sem a necessidade de serem revelados por métodos imunohistoquímicos, o que constitui um aspecto vantajoso para o emprego desses marcadores em modelos *in vitro* com explantes e células

dissociadas (Katz *et al.*, 1984; Cornwall & Phillipson, 1988; Katz & Iarovici, 1990; Härtig *et al.*, 1992; Senatorov *et al.*, 1997; Vercelli *et al.*, 2000; Altun *et al.*, 2001; Maruyama & Ohmori, 2006). Por serem transportadas retrogradamente, em vesículas e apenas pelas fibras rompidas pelo processo da injeção (Madison *et al.*, 1990; Vercelli *et al.*, 2000), as microesferas fluorescentes também apresentam um potencial uso para estudos em que é necessário o isolamento de populações específicas de neurônios de projeção, como caracterização funcional, imunofenotipagem, citoarquitetonia, morfologia e direcionamento axonal no neocórtex (Naegele *et al.*, 1988; Catapano *et al.*, 2001; 2004), retina (Aarnoutse *et al.*, 1995), medula (Charlton & Helke, 1987; Huang, 1987), cerebelo (Dietrichs & Haines, 1986; Xu & Grant, 1988) e tronco encefálico (Chi *et al.*, 2007; McCauley *et al.*, 2009).

O uso desses traçadores pode ser comparado ao de uma outra classe de marcadores fluorescentes largamente utilizados na neurobiologia, as carbocianinas. Pela sua natureza lipofílica, elas marcam tanto células neuronais vivas, por transporte ativo, quanto fixadas, pela sua difusão lateral na membrana (Honig & Hume, 1986; Godement *et al.*, 1987; Honig & Hume, 1989) conferindo grande eficiência à sua marcação uma vez que, inserido no envoltório da célula, podem deslocar-se lateralmente como um lipídio da própria membrana, marcando a célula em toda sua extensão. No caso de neurônios, corpo celular e arborizações dendríticas e axonais são eficientemente marcados. Seu uso apresenta algumas vantagens para os estudos de dinâmica e estrutura de membranas celulares, vias neuronais, mapeamento de destino celular e outros: **(1)** marca células vivas e tecidos não-mielinizados anterograda e retrogradamente; **(2)** sua fluorescência é intensa e tem uma meia-vida longa; **(3)** não é tóxico para os tecidos vivos (Honig,

1993). Além disso, pode ser usado em cristais ou diluído e sua marcação não se restringe às células atingidas, bastando que haja contato entre as membranas de duas células vizinhas para que uma região extensa do tecido seja marcada.

Para investigar a formação de vias no período embrionário, as microesferas apresentam uma desvantagem sobre as carbocianinas porque requerem que o tecido esteja vivo e não marcam a extensão total dos prolongamentos. No entanto, o transporte unidirecional, exclusivamente retrógrado daquelas (Madison *et al.*, 1990), confere maior confiança nos resultados das origens das vias. Já no caso de estudos do desenvolvimento das diferentes populações neuronais, estas podem ser identificadas retrogradamente pela injeção *in utero* dos marcadores após um período de sobrevivência suficiente para que o mesmo percorra as fibras do sítio de injeção até seus somas de origem. Nesse caso, a vantagem das microesferas sobre as carbocianinas está no fato das fibras intactas na área da injeção não captarem as primeiras (Katz & Iarovici, 1990) enquanto as segundas parecem poder se inserir na membrana axonal de fibras não rompidas no sítio de injeção marcando populações impróprias. Mas alguns trabalhos mostram afirmam que carbocianinas também só marcam fibras lesadas (Danilo Arruda Furtado – Manuscrito de Tese de Doutorado, Biofísica/UFRJ 2005).

Resultados *in vivo* preliminares de nosso laboratório mostram que a difusão dessa carbocianina requer um curto período para que o hemisfério contralateral seja marcado. No entanto, para a marcação de encéfalos embrionários, surgiu um inconveniente para nosso projeto. A inviabilidade de inserirmos os cristais *in utero* nos obrigou a retirar o encéfalo e mantê-lo em ACSF. Após 12 horas, já há sofrimento do tecido, o que faz com que o conservemos por, no máximo 20 horas neste fluido. Assim, o tempo de exposição do tecido ao marcador pode não ser

suficiente para que as fibras atingidas pelo mesmo sejam completamente marcadas dependendo da localização dos cristais no encéfalo. Tal problema poderia ser contornado, pelo menos, de duas formas: **(1)** inserindo-se o cristal na substância branca cortical suficientemente próximo da linha média para que as fibras calosas tenham sua trajetória bem traçada em pouco tempo; **(2)** injetando-se *in utero* o marcador diluído, para que este se difunda *in vivo* pelo tecido.

Uma vez que a inserção de cristais de Dil apresentou-se limitada para os estudos *in vitro* pelas razões acima discutidas, optamos pelo uso de microesferas fluorescentes para isolar a população de neurônios calosos de camundongos. No início desta década, Catapano e colaboradores (2001) isolaram esta população aliando a injeção de microesferas e a técnica de citometria de fluxo. As injeções eram realizadas através da parede uterina em um dos hemisférios corticais e, 24 – 48 h depois, os animais eram sacrificados, o hemisfério contralateral era dissecado e suas células dissociadas para serem isoladas por citometria de fluxo devido à fluorescência das microesferas e coletadas esterilmente para serem cultivadas. Optamos por tentar reproduzir a metodologia acima descrita para substituir o Dil nos estudos *in vitro*.

Pelos nossos resultados no presente trabalho seguindo tal metodologia, a injeção das microesferas fluorescentes aliada à separação por citometria de fluxo das células contralaterais mostrou ser uma alternativa viável para rastrear e isolar a população calosa em animais pós-natos. No entanto, para as injeções *in utero*, não atingimos o mesmo grau de eficiência na purificação das células marcadas, o que atribuímos a três fatores que limitaram a reprodutividade da técnica e a eficiência da marcação, respectivamente: **(1)** a possibilidade da injeção não ultrapassar o córtex e atingir o ventrículo lateral; **(2)** o número reduzido de células marcadas em função da

curta janela temporal entre a marcação e o sacrifício dos animais para dissociação das células; **(3)** a inviabilidade de manter estas células em cultura após a separação. O primeiro problema poderia ser resolvido com o uso de um aparelho de ultrassonografia adequado aos animais utilizados no projeto para permitir o posicionamento correto da injeção na profundidade do tecido cortical. O segundo fator já constitui uma limitação mais difícil de se contornar. O corpo caloso começa a se formar por volta de E16 no camundongo (Ozaki & Wahlsten, 1998), o que poderia ser explorado realizando-se a injeção *in utero* nesta idade, aumentando-se o tempo de exposição das fibras ao marcador e, por consequência, o número de células marcadas. No entanto, uma vez que as microesferas são captadas apenas pelas fibras rompidas, apenas uma pequena quantidade delas seria capturada pelos axônios pioneiros desta comissura enquanto os próximos a cruzar a linha média não seriam marcados. Além disso, por se tratar de um estágio muito precoce, o tecido cortical ainda em formação é muito delgado nesta idade, o que dificultaria a observação da área de injeção ainda que usássemos um ultrassom. O terceiro inviabilizou nosso principal objetivo de testar as respostas das células calosas às moléculas de direcionamento

5.3. Marcação com BrdU

O BrdU foi descrito como uma ferramenta para o estudo da histogênese no início da década de 70 (Packard *et al.*, 1973). Assim como a timidina tritiada, ele é um análogo de timidina e se incorpora ao DNA das células quando estas estão passando pela fase de intérfase (S) do ciclo celular. Embora não haja diferença entre a eficiência de marcação dessas duas moléculas, o uso do BrdU apresenta algumas vantagens sobre seu análogo radiotivo: **(1)** sua revelação é mais rápida,

baixando o tempo para obtenção dos resultados de 1 - 3 meses para 1 - 3 dias; **(2)** é mais seguro, não exigindo manipulação de radioatividade; **(3)** é mais simples pois não requer condições especiais para o processamento do tecido. Um aspecto negativo da técnica de revelação do BrdU é a dificuldade de conciliá-la com algumas técnicas histológicas devido aos tratamentos necessários para a desnaturação do DNA (Miller & Nowakowski, 1988) e a possibilidade dele ser incorporado na reparação de DNA e não na replicação (Taupin, 2007). No início da década de 90, Soriano e colaboradores conseguiram associar a imunohistoquímica para este marcador a técnicas de rastreamento axonal e à detecção de outros antígenos neurais (Soriano *et al.*, 1991; Soriano & Del Rio, 1991).

Outro aspecto relevante do uso desse marcador de proliferação que não pode ser ignorado em estudos de embriogênese é sua citotoxicidade, uma vez que este se insere no material genético da célula podendo causar alterações no ciclo celular e no desenvolvimento embrionário. Alguns dos efeitos descritos incluem redução do tamanho e peso corporal dos embriões e aumento da mortalidade da prole e da morte celular (Packard *et al.*, 1974; Sekerková *et al.*, 2004), necrose, redução da neuronogênese e da sobrevivência dos neurônios pós-mitóticos (Bannigan, 1987), prejuízos à neuritogênese (Biggers *et al.*, 1987), defeitos de migração e posicionamento (Sekerková *et al.*, 2004). Mas tais efeitos estão diretamente relacionados à dose aplicada, visto que, na dose usada classicamente, não se observou efeito tóxico evidente (Miller & Nowakowski, 1988).

Por sua marcação ser permanente, uma das aplicações mais exploradas do BrdU é o rastreamento da linhagem e do momento de origem de populações específicas (Plickert & Kroiher, 1988). Em camundongos, a meia-vida do BrdU no organismo da fêmea é de 30 min, e nos embriões fica disponível por até 80 min após a injeção

(Packard *et al.*, 1973). A incorporação pelas células a níveis detectáveis ocorre por até 8h após um único pulso do marcador (Hayes & Nowakowski, 2000). Durante estes períodos, todas as células que entram em intérfase podem captar o marcador com eficiência distinta, mas isso não significa que todas as células marcadas estão se dividindo quando da presença dele nem que as células não-marcadas não estão: as células que captaram poucas moléculas e/ou prosseguem realizando sucessivos ciclos mitóticos acabam por ter sua marcação diluída entre suas células-filha; estas, por sua vez, podem logo parar de se dividir e carregar o marcador mesmo que ele não esteja mais disponível no momento do seu nascimento. Nesse sentido, é importante conhecer a dinâmica do ciclo celular da população em questão, sendo a duração do ciclo e o número de ciclos que os progenitores completam antes de começarem a se diferenciar aspectos de grande relevância quando se está investigando eventos celulares relacionados à proliferação e migração celulares.

5.3.1. BrdU e Hoechst

No final da década de 70, alguns trabalhos começaram a explorar os efeitos do BrdU sobre a fluorescência de marcadores da família dos bisbenzimidazóis para estudar a síntese dos ácidos nucleicos e a cinética de ciclo celular por métodos ópticos (Latt, 1977; Latt *et al.*, 1977). O marcador bisbenzimidazólico típico, Hoechst 33258, emite fluorescência quando ligado ao DNA e tal ligação pode ocorrer de duas maneiras: **(1)** eletrostaticamente, com saturação de uma molécula de marcador para cada 3 grupos fosfato e produzindo uma baixa fluorescência; **(2)** ligando-se ao par de bases A-T com altas especificidade e estabilidade mesmo em condições de elevada força iônica, também com a saturação de um marcador para cada 3 pares A-T, porém emitindo uma fluorescência mais intensa. Uma vez que a ligação A-T,

mais especificamente a timidina, é o alvo da marcação do Hoechst 33258 (Weisblum & Haensler, 1974; Latt *et al.*, 1975), quando esta base é substituída pelo seu análogo halogenado, acredita-se que este último modo de ligação seja o principal afetado pela presença do BrdU, causando a redução da fluorescência emitida pelo Hoechst. É importante destacar que as bisbenzimididas não se intercalam no DNA (Müller & Gautier, 1975).

Embora a detecção do BrdU por imunocitoquímica tenha grande sensibilidade e seja compatível com sistemas de fluxo, ela apresenta o inconveniente de não se aplicar a estudos com células vivas ou que requerem integridade da cromatina devido à necessidade de desnaturação do DNA. Para contornar essa limitação, os efeitos da interação entre essas duas marcações começaram a ser explorados para aplicação em estudos genéticos e de cinética celular por citometria de fluxo. Latt e colaboradores (1977) determinaram que a presença de BrdU no material genético de células ovarianas vivas e fixadas interfere na fluorescência emitida pelo Hoechst 33258 reduzindo-a com uma magnitude capaz de ser detectada pela técnica. E a avaliação da eficiência de outras bisbenzimididas da família do Hoechst 33258 em diferentes condições mostrou que o análogo Hoechst 33342 marca melhor células vivas, provavelmente devido a uma maior permeabilidade da membrana plasmática, com uma boa sensibilidade à presença do BrdU no material genético celular e pouca citotoxicidade, caracterizando-o como o primeiro marcador vital específico de DNA e não-tóxico (Latt, 1977; Arndt-Jovin & Jovin, 1977). Os trabalhos que se seguiram exploraram essa metodologia no intuito de refinar a técnica (Böhmer, 1979; Dolbeare *et al.*, 1983; Kubbies & Rabinovitch, 1983; Crissman & Steinkamp, 1987) e encontrar as condições ótimas para diversas aplicações e tipos celulares (Ellwart & Dörmer, 1985; Kubbies *et al.*, 1985a; b; Kubbies & Friedl, 1985).

Contudo, os modelos *in vitro* usados nos estudos acima podem ser limitados para analisar populações celulares que podem ter alterações genéticas ou seu comportamento proliferativo afetados por fatores externos como drogas, disfunções, infecções e lesões ou o próprio fato de estarem *ex vivo*. Para tais condições experimentais, a aplicação *in vivo* de BrdU fornece mais respostas dos efeitos desses estímulos a um tecido em relação ao acesso das drogas ao mesmo, à regulação da taxa de proliferação das células ou que alterações eles estariam causando na maquinaria genética e molecular de um grupo de células (Allen & Latt, 1976; Roholl & Distel, 1984; Gerlyng *et al.*, 1992; Maggio-Price *et al.*, 1993). Em 2000, Mozdziak e colaboradores testaram essa metodologia *in vivo* causando lesões químicas em músculos de ratos adultos para induzir a regeneração do tecido. Dois dias após a lesão, o grupo tratado recebia 3 injeções de BrdU a cada 4 h e os animais eram sacrificados 14 h após o último pulso. As células do músculo solear foram dissociadas, marcadas com Hoechst 33342 e analisadas por citometria de fluxo. A análise das células do grupo controle - que não recebeu BrdU - apresentou um pico único de fluorescência do Hoechst enquanto a citometria das células dos animais tratados identificou 2 perfis de fluorescência do Hoechst. Ao isolar as 2 populações, a imunocitoquímica para BrdU revelou que as células da população do perfil de menor intensidade eram positivas e as da população de maior intensidade era negativa para este antígeno.

Baseando-nos no trabalho de Mozdziak e colaboradores (2000) acima e explorando as estratégias ontogenéticas da estrutura neocortical, testamos a aplicação do paradigma discutido neste tópico para otimizar o número de células dissociadas do córtex embrionário de camundongos e isoladas por citometria de fluxo para estudos *in vitro* da corticogênese. Nossos resultados confirmam que a

combinação das marcações de BrdU e Hoechst 33342 pode ser usada para identificar e isolar células corticais de camada V por citometria de fluxo. Comparada à marcação retrógrada com microesferas fluorescentes para o estudo proposto, esta técnica apresenta as vantagens de reduzir as taxas de mortalidade dos embriões decorrente do processo cirúrgico necessário para a injeção *in utero* de rastreadores neuronais; e de marcar um número muito maior de células, por ser rápida e exigir apenas que as células estejam ciclando quando da presença do marcador, enquanto a captação das microesferas pelas fibras calosas e seu transporte retrógrado até seus somas de origem é mais lenta e menos eficiente para animais embrionários uma vez que o intervalo entre a injeção e a dissociação das células é muito curto para marcar uma quantidade significativa de neurônios calosos. Isso foi comprovado pela frequência das populações de interesse em cada uma das estratégias utilizadas: enquanto o percentual de células marcadas com as microesferas correspondia a 10% do número total de eventos, as células identificadas pela fluorescência de baixa intensidade do Hoechst representavam mais de 60% do mesmo.

No entanto, o BrdU não marca células calosas especificamente quando injetado intraperitonealmente, marcando as zonas proliferativas ventral e cortical – fontes de interneurônios e neurônios de projeção, respectivamente – e estas dividem a mesma data de nascimento e estrato cortical final com outros tipos celulares (Miller, 1985; Anderson, 2002). Para contornar este inconveniente, pretendemos imunofenotipar as células da população isolada (BrdU-positiva) com marcadores que diferenciem neurônios (NeuN-positivos) e células gliais (GFAP-positivas); interneurônios (GABA-positivas) e neurônios de projeção (Emx-positivas); e, finalmente, neurônios calosos (Satb2-positivas) e subpopulações que projetam para outras regiões. Repetiremos

a metodologia para as camadas V e II/III, principais destinos laminares de neurônios calosos. Se a frequência desse subtipo neuronal nas amostras purificadas for elevada, fazendo o uso do BrdU uma estratégia muito mais vantajosa que o rastreamento retrógrado para sua separação em embriões, poderemos aplicá-lo em nossos estudos de direcionamento axonal.

5.4. Ciclo Celular e Neuronogênese Cortical

Em mamíferos, o neocórtex é uma estrutura hexalaminada composta por uma grande variedade de subtipos celulares. A característica mais importante do desenvolvimento do neocórtex é o surgimento ordenado de cada camada em uma seqüência definida de eventos proliferativos e migratórios (Sidman *et al.*, 1961; Angevine & Sidman, 1961; Caviness, 1982) que deu origem ao conceito de “picos ou ondas neurogênicos (as)”: intervalos definidos em que as células de cada estrato são geradas e migram dorsalmente para formá-lo. A primeira onda dá origem à camada I e à subplaca e as ondas seguintes formam as camadas II – VI em um gradiente invertido, onde as camadas mais profundas nascem primeiro (Angevine & Sidman, 1961). E cada um desses estratos apresenta um padrão topográfico de conectividade (Gilbert & Kelly, 1975; Innocenti *et al.*, 1985). Sendo assim, os eventos proliferativos são de importância crucial para as etapas seguintes de diferenciação e especificação das células de projeção e, finalmente, de formação de vias.

A neurogênese neocortical começa em uma camada simples do neuroepitélio, e os primeiros neuroprogenitores do sistema nervoso central são as células neuroepiteliais (NE) da parede ventricular que dão origem aos primeiros neurônios e uma segunda classe de progenitores, as células de glia radial (RGC). Esses dois tipos são encontrados na superfície em contato com os ventrículos laterais, sendo

por isso agrupados na classe dos progenitores apicais, e a cinética de seus ciclos celulares apresenta uma particularidade: a posição dos seus núcleos no eixo ápico-basal reflete a fase do ciclo mitótico uma vez que eles deslocam-se para a região basal para duplicar seu material genético nesta e retornam para a parte apical para finalizar a mitose (Sidman *et al.*, 1959; Seymour & Berry, 1975; Takahashi *et al.*, 1993), conferindo aparência estratificada a este compartimento proliferativo. As RGC's estendem um prolongamento até a superfície dorsal do telencéfalo que apóia os neurônios de projeção recém gerados durante sua migração para as camadas superiores (Nadarajah & Parnavelas, 2002; Noctor *et al.*, 2002; Nadarajah, 2003). Um terceiro tipo, os progenitores intermediários (IPC) ou progenitores basais (BP's), nasce tanto das NE's quanto das RGC's e passa a ocupar a região basal da ZV para constituir as zonas intermediária (IZ) e subventricular (SVZ) mais tarde. Por último, os precursores neurais curtos também se originam das RGC's e residem na VZ, mas apresentam morfologia, perfil molecular e cinéticas de ciclo distintos destas, compõem a quarta classe de progenitores (Götz *et al.*, 2002; Gal *et al.*, 2006; Corbin *et al.*, 2008). No telencéfalo dorsal, as NE's e RGC's são as principais fontes dos neurônios de projeção das camadas profundas, enquanto grande parte dos das camadas supragranulares são gerados mais tardiamente pelas duas outras classes (Smart & McSherry, 1982; McConnell & Kaznowski, 1991; Frantz *et al.*, 1994; Tarabykin *et al.*, 2001; Gal *et al.*, 2006).

Em camundongos, o período de produção de neurônios se estende do 11º ao 17º dias embrionários (considerando-se a concepção como dia 0) (Caviness, 1982). As primeiras células geradas cumprem dois objetivos principais: **(1)** aumentar o repertório de progenitores e **(2)** gerar os primeiros neurônios que formarão as camadas VI e V. No primeiro caso, as duas ou uma das células-filhas produzidas

permanece no ciclo mitótico, por divisão simétrica proliferativa ou assimétrica, respectivamente; no segundo caso, a célula progenitora sofre uma mitose simétrica neurogênica ou uma mitose assimétrica em que uma das células deixa o ciclo e inicia a etapa de diferenciação neuronal (Nowakowski *et al.*, 2002; Noctor *et al.*, 2004). As células que deixam o ciclo compõem a fração Q e as que continuam gerando novos progenitores ou células pós-mitóticas, a fração P (Takahashi *et al.*, 1994; Caviness & Takahashi, 1995). Estudos com timidina radioativa e/ ou BrdU revelaram que, no telencéfalo dorsal, durante esses 6 dias, ocorrem 11 ciclos celulares com duração (Tc) inicial de 8 h e que tornam-se progressivamente mais longos atingindo o tempo de 18 h no 11º (Nowakowski *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 1995). Estudos seguintes não só detalharam essa seqüência de formação das camadas e a cinética dos ciclos dos diferentes progenitores, como também determinaram os ciclos de origem dos subtipos neuronais que as compõem e as mudanças dos perfis moleculares das células geradas por cada classe de progenitor e em cada etapa, revelando os mecanismos citogenéticos de diferenciação e especificação da formação do neocórtex (Takahashi *et al.*, 1999; Fode *et al.*, 2000; Tarabykin *et al.*, 2001; Caviness *et al.*, 2003; Calegari *et al.*, 2005; Dehay & Kennedy, 2007; Suter *et al.*, 2007; Noctor *et al.*, 2008).

A cinética do ciclo mitótico neuronogênico é um aspecto muito relevante para nosso trabalho uma vez que o paradigma de marcação das células de camada V depende da disponibilidade do marcador de proliferação no momento exato e específico de produção deste estrato. Por esse motivo, optamos pelo monitoramento por vídeo do acasalamento para determinar o momento preciso da concepção, garantindo a correta datação dos embriões para injeção do BrdU. Nossos resultados de imunohistoquímica em animais pós-natais, quando as células já acabaram de

migrar e se estabeleceram definitivamente nas suas camadas de destino, fortalecem nossos resultados de FACS já que observamos células BrdU-positivas ocupando principalmente as camadas profundas no córtex maduro. Análises quantitativas mais precisas devem ser realizadas no intuito de determinar o período ideal da injeção com maior precisão. Uma possível desvantagem do método em relação à injeção de traçadores decorre da identificação fenotípica inespecífica das células calosas já que a injeção intraperitoneal não discrimina, dentro do mesmo estrato, células de projeção e de circuitaria local, nem células de projeção de diferentes vias. Injeções de traçadores retrógrados desses animais pós-natos marcados com BrdU podem contribuir para esta questão através da comparação e quantificação das marcações de BrdU e do(s) traçador(es). Segundo Koester & O'Leary (1993), as células calosas ocupariam posições mais profundas na camada 5, enquanto as de projeção subcortical são mais superficiais, provavelmente sendo geradas em momentos distintos. Embora os tempos de neurogênese destas duas subcamadas sejam muito próximos, o que dificulta limitar a exposição ao BrdU de modo a marcar exclusivamente uma delas, é possível que consigamos determinar o momento de nascimento dos neurônios calosos com relativa precisão, otimizando a pureza das nossas amostras.

5.5. Classificação dos Neurônios Corticais

No neocórtex, neurônios e glias, incluindo os respectivos subtipos dessas duas classes de células neurais, originam-se das mesmas células progenitoras no epitélio pseudo-estratificado que margeia os ventrículos laterais, a zona ventricular (ZV) (Heins *et al.*, 2002). Neurônios de circuitaria local e de projeção são gerados no mesmo momento (Miller, 1985; Anderson, 2002), mas em regiões não sobrepostas

da zona proliferativa telencefálica (Lavdas *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2002) e são molecularmente distinguíveis muito antes da diferenciação bioquímica de seus progenitores (Schwartz *et al.*, 1991) pela expressão dos genes *Lhx6* e *Dlx1* (Anderson *et al.*, 1997; Lavdas *et al.*, 1999; Marin *et al.*, 2000; Stühmer *et al.*, 2002b) e *Emx1* e *Tbr1* (Chan *et al.*, 2001; Hevner *et al.*, 2001; Gorski *et al.*, 2002), respectivamente. Embora as colorações histológicas mais comuns não revelem, a ZV é dotada de uma heterogeneidade molecular desde o início do desenvolvimento que é a base da formação da complexa estrutura cortical com seus inúmeros tipos celulares (Soriano *et al.*, 1995; Gal *et al.*, 2006). Aparentemente, não há linhagens de precursores tipo-específicas, mas sim uma fina regulação de eventos moleculares e celulares que são passados às progênes para gerar e ampliar essa diversidade progressivamente (Walsh & Cepko, 1990; Cai *et al.*, 2002; Gal *et al.*, 2006).

No caso das células de projeção, há uma relação entre a camada de origem e a região que inervam (Gilbert & Kelly, 1975; Innocenti *et al.*, 1985), permitindo se classificar os subtipos por esse critério em um primeiro nível. Porque essas células se comprometem fenotipicamente tão cedo, pode-se estudar a formação de uma determinada via axonal a partir de eventos da corticogênese anteriores ao surgimento das primeiras estruturas axono-dendríticas (Koester & O'Leary, 1993). Porém, o critério hodológico não pode ser o único considerado para classificar, descrever e caracterizar detalhadamente subtipos da classe neurônios de projeção à medida que células projetando a partir de um mesmo estrato ou para um mesmo alvo podem exibir perfis moleculares e morfo-funcionais variados (Peters & Kara, 1985; Larkman & Mason, 1990; Koester & O'Leary, 1993; Arimatsu & Ishida, 1999; 2002; Thomson & Bannister, 2003; Hattox *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2008). Além

disso, algumas células de projeção emitem axônios colaterais para mais de uma região-alvo transitoriamente no período embrionário (Lent & Lacerda-de-Menezes, 1988; Garcez *et al.*, 2007), e em animais pós-natos (McGeorge & Faull, 1987; Hedin-Pereira *et al.*, 1999); a expressão de marcadores de subpopulações varia temporalmente (revisado por Leone *et al.*, 2008); e nem sempre apresenta um padrão laminar restrito (Frantz *et al.*, 1994; Arimatsu *et al.*, 1999; Leid *et al.*, 2004; Alcamo & McConnell, 2008; Lai *et al.*, 2008).

A base dessa diversidade dos neurônios corticais de projeção, foco deste trabalho, tem sido evidenciada com os estudos que revelam uma grande combinação de moléculas definindo as subpopulações de uma mesma camada emitindo axônios para regiões-alvo distintas ou diferentes origens laminares e alvos comuns (revisado em Molyneaux *et al.*, 2007). Nosso foco é uma subpopulação da camada V que projeta através do corpo caloso, comunicando os dois hemisférios telencefálicos e integrando as informações que convergem para o córtex cerebral.

Esse estrato no neocórtex é gerado do 14º ao 15º dia gestacional (concepção = E0) (Angevine & Sidman, 1961; Caviness, 1982; Polleux *et al.*, 1998) e é composto por neurônios de projeção com a morfologia piramidal típica e pertencentes às 3 principais classes hodológicas: associativos, comissurais e corticofugais. Histologicamente ela pode ser subdividida em dois compartimentos, Va e Vb, que separam duas subpopulações morfológica e funcionalmente diferentes (Kasper *et al.*, 1994): o primeiro corresponde à região mais dorsal da camada, tem uma baixa densidade celular, suas células (Tipo I) têm um soma grande, respondem a estímulos despolarizantes com disparos em salva e projetam subcerebralmente; o segundo, mais ventral, apresenta maior celularidade em relação ao anterior, e suas células (Tipo II) são menores, disparam regularmente mediante estimulação e

projetam para o córtex contralateral e para o estriado ipsilateral (Koester & O'Leary, 1993; Kasper *et al.*, 1994a). Entretanto essa classificação ainda não é suficiente para diferenciar totalmente cada subtipo de neurônios presente no córtex.

A combinação dos dados hodológicos e morfo-funcionais extensamente descritos aos recentes resultados de estudos neurogenéticos têm revelado que as células piramidais do córtex não constituem uma classe homogênea em nenhum desses aspectos. Mas a principal contribuição desses estudos é a descoberta de marcadores para essas subpopulações e/ou para as camadas: o gene *Brn2* é expresso nas camadas II-III e V (McEvelly *et al.*, 2002; Sugitani *et al.*, 2002); as expressões de *Cux1* e *Cux2* estendem-se da II à IV (Nieto *et al.*, 2004; Zimmer *et al.*, 2004); *Er81* é observado em células de projeção corticoespinhal e calosas (Xu *et al.*, 2000; Yoneshima *et al.*, 2006); *Ctip-2* marca os corticoespinhais e corticotectais de camada V (Arlotta *et al.*, 2005); *Otx-1* identifica os subcerebrais das camadas V e VI (Frantz *et al.*, 1994); *Fezf1* e *Sox5* como marcadores de neurônios projetando subcorticalmente (Hirata *et al.*, 2004; Arlotta *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Molyneaux *et al.*, 2005; Kwan *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2008); proteína 36, expressa nas células cortifugais da camada V (Stanfield & Jacobowitz, 1990); Calretinina, presente tardiamente em alguns neurônios calosos, mas também em interneurônios (Mitchell *et al.*, 2006); *Lmo4*, expresso em piramidais do tipo II da camada V (Arlotta *et al.*, 2005; Azim *et al.*, 2009); *Satb2* conferindo a identidade calosa (Britanova *et al.*, 2005; 2008; Szemes *et al.*, 2006); GAP-43, proteína sináptica de neurônios corticotálânicos (Feig, 2004). É importante ressaltar que esses genes têm suas expressões sub e supra-reguladas em diferentes momentos do desenvolvimento e da vida pós-natal para cumprir funções distintas em cada um deles (Frantz *et al.*, 1994; Hevner *et al.*, 2003; Nieto *et al.*, 2004; Arlotta *et al.*, 2005; revisado por Mólnar

& Cheung, 2006) acrescentando um obstáculo ao seu uso como marcadores de subtipos.

Diante dessas dificuldades, a identificação e o isolamento *in vivo* da população de nosso interesse retiveram nossa atenção, levando-nos a testar diferentes métodos e compará-los. Aparentemente, a injeção de rastreador retrógrado associado à citometria de fluxo forneceria um excelente resultado em termos qualitativos pois a identidade calosa das células recuperadas seria mais confiável. No entanto, para o caso de animais embrionários, o aspecto quantitativo foi prejudicado devido ao curto período de marcação. A solução para a baixa recuperação celular seria a imunofenotipagem com anticorpo fluorescente contra um marcador da nossa população, mas todas as moléculas até então descritas são intracelulares, e suas marcações exigem a fixação da amostra – inviabilizando o isolamento de células vivas. Outro problema enfrentado foi a irregularidade do aproveitamento das injeções *in utero* de rastreador pela dificuldade de se precisar o sítio de injeção no eixo dorso-ventral e controlar a sobrevivência dos embriões após a cirurgia.

O uso de BrdU para o isolamento de células de camada V por citometria apresentou resultados muito mais satisfatórios em relação ao número de células recuperadas. No entanto, na idade escolhida para injeção, além da neurogênese dos neurônios de projeção calosos e subcorticais de camada V, também ocorre a de interneurônios corticais (Wonders *et al.*, 2006) e células gliais que formarão as estruturas da linha média que auxiliam na formação do corpo caloso (Silver *et al.*, 1982; Richards *et al.*, 2004; Jovanov-Milosevic *et al.*, 2006; Lindwall *et al.*, 2007). Para identificar quais células neurais estão presentes na população purificada por citometria de fluxo, usaremos um marcador de actina filamentar glial, GFAP; um marcador neuronal nuclear específico, NeuN; um marcador de interneurônios

gabaérgicos, GABA; e o marcador de um fator de transcrição presente em neurônios de projeção calosos no período embrionário, Satb2.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresenta três importantes resultados:

(1) foram estabelecidas as condições de isolamento de células por citometria de fluxo que fornece células viáveis para crescimento em cultura emitindo neuritos de diferentes tamanhos e morfologias;

(2) a população calosa pode ser isolada das demais injetando-se microesferas fluorescentes *in utero* e usando-se citometria de fluxo para selecionar as células;

(3) a dupla marcação do DNA com BrdU e Hoechst 33342 pode ser usada para identificar células por citometria de fluxo, constituindo uma opção vantajosa e promissora para a técnica de FACS.

Considerando a importante função do córtex cerebral, não é incompreensível que esta seja uma estrutura de tamanha complexidade morfológica e que sua formação exija uma enorme multiplicidade de moléculas e mecanismos que garantam o correto cumprimento de cada etapa, minimizando os riscos de erros que podem ser altamente prejudiciais ou mesmo deletérios para o organismo em formação. Nesse sentido, esperamos contribuir direta e indiretamente para a compreensão de parte do intrincado sistema de controle de formação do córtex cerebral ao propor um método mais simples e rápido de isolamento de neurônios viáveis para aplicação nos estudos *in vitro* dessas estratégias ontogênicas do córtex de mamíferos.

7. PERSPECTIVAS

Nossos próximos objetivos (já em andamento) envolvem: **(1)** a imunofenotipagem das células isoladas pela marcação de BrdU e cultivadas para identificar quais são os subtipos celulares recuperados e em que frequência para confirmar a eficácia do método no isolamento de neurônios calosos de camada V; **(2)** ajustar as condições ideais para isolamento em diferentes idades embrionárias, possibilitando assim a aplicação da citometria para investigação de eventos e mecanismos até mais precoces da embriogênese; **(3)** co-cultivar as células isoladas com uma fonte exógena de Netrina-1 para testar o comportamento axônico.

Esperamos identificar que fatores atuantes sobre os axônios das células corticais determinam a opção destas por conectar um alvo no hemisfério ipsilateral, contralateral ou em alvos subcorticais. Talvez as células calosas mais imaturas não expressem os receptores que determinam a saída das projeções córtico-fugais pela cápsula interna. Já é conhecido que a Netrina é expressa por um alvo intermediário da via córtico-fugal, a cápsula interna, precocemente (E14). E que seu receptor DCC é expresso por células corticais de projeção, incluindo as de projeção subcortical e as calosas (Braisted et al., 2000). A linha média, onde o corpo caloso se forma, também expressa Netrina (Serafini et al., 1996), mas o padrão têmporo-espacial parece ser mais tardio (Bonnin et al., 2007). Pode ser que as células próximas à linha média respondam a fatores dessa estrutura e essa proximidade seja suficiente para o cruzamento. Nossos resultados futuros, aliados a outros resultados de nosso laboratório, possivelmente contribuirão para elucidar alguns passos da estratégia de formação do corpo caloso e o papel da Netrina-1 neste contexto.

Uma vez confirmada a ação da Netrina-1 sobre os axônios calosos em cultura, é interessante explorar os receptores e mecanismos celulares envolvidos. O bloqueio

dos receptores e de algumas vias sinalizadoras na presença e na ausência da Netrina-1 e em diferentes idades pode dar respostas interessantes quanto à dinâmica do direcionamento axonal da população calosa.

8. REFERÊNCIAS

- Aarnoutse, E. J., Van der Want, J. J., & Vrensen, G. F. 1995. Retrograde fluorescent microsphere tracing of retinal and central afferents to the nucleus of the optic tract in pigmented and albino rats. *Neurosci.Lett.*, 201(2): 143-146.
- Alcamo, E. A., Chirivella, L., Dautzenberg, M., Dobрева, G., Farinas, I., Grosschedl, R., & McConnell, S. K. 2008. *Satb2* regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron*, 57(3): 364-377.
- Allen, J. W. & Latt, S. A. 1976. In vivo BrdU-33258 Hoechst analysis of DNA replication kinetics and sister chromatid exchange formation in mouse somatic and meiotic cells. *Chromosoma*, 58(4): 325-340.
- Altun, M., Bergman, E., & Ulfhake, B. 2001. Retrograde labeling of primary sensory neurons with fluorescent latex microspheres: a useful tool for long term tagging of neurons. *J.Neurosci.Methods*, 108(1): 19-24.
- Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L., & Rubenstein, J. L. 1997. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science*, 278(5337): 474-476.
- Anderson, S. A., Kaznowski, C. E., Horn, C., Rubenstein, J. L., & McConnell, S. K. 2002. Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo. *Cereb.Cortex*, 12(7): 702-709.
- Andjelic, S., Gallopin, T., Cauli, B., Hill, E. L., Roux, L., Badr, S., Hu, E., Tamas, G., & Lambolez, B. 2009. Glutamatergic nonpyramidal neurons from neocortical layer VI and their comparison with pyramidal and spiny stellate neurons. *J.Neurophysiol.*, 101(2): 641-654.
- Angevine, J. B., Jr. & Sidman, R. L. 1961. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature (London)*, 192: 766-768.
- Arimatsu, Y., Kojima, M., & Ishida, M. 1999. Area- and lamina-specific organization of a neuronal subpopulation defined by expression of latexin in the rat cerebral cortex. *Neuroscience*, 88(1): 93-105.
- Arimatsu, Y. & Ishida, M. 2002. Distinct neuronal populations specified to form corticocortical and corticothalamic projections from layer VI of developing cerebral cortex. *Neuroscience*, 114(4): 1033-1045.
- Arimatsu, Y., Ishida, M., Kaneko, T., Ichinose, S., & Omori, A. 2003. Organization and development of corticocortical associative neurons expressing the orphan nuclear receptor *Nurr1*. *J.Comp Neurol.*, 466(2): 180-196.
- Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., & Macklis, J. D. 2005. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, 45(2): 207-221.
- Arndt-Jovin, D. J. & Jovin, T. M. 1977. Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content. *J.Histochem.Cytochem.*, 25(7): 585-589.
- Ascoli, G. A., Ono-Nanclares, L., Anderson, S. A., Barrionuevo, G., Avides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsaki, G., Cauli, B., DeFelipe, J., Fairen, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fregnac, Y., Freund, T. F., Gardner, D., Gardner, E. P., Goldberg, J. H., Helmstaedter, M., Hestrin, S., Karube, F., Kisvarday, Z. F., Lambolez, B., Lewis, D. A., Marin, O., Markram, H., Munoz, A., Packer, A., Petersen, C. C., Rockland, K. S., Rossier, J., Rudy, B., Somogyi, P., Staiger, J. F., Tamas, G., Thomson, A. M., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., West, D. C., & Yuste, R. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat.Rev.Neurosci.*, 9(7): 557-568.
- Azim, E., Shnyder, S. J., Cederquist, G. Y., Sohur, U. S., & Macklis, J. D. 2009. *Lmo4* and *Clim1* Progressively Delineate Cortical Projection Neuron Subtypes during Development. *Cereb.Cortex*.

- Bannigan, J. G. 1987. Autoradiographic analysis of effects of 5-bromodeoxyuridine on neurogenesis in the chick embryo spinal cord. *Brain Res.*, 433(2): 161-170.
- Bannister, A. P. 2005. Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. *Neurosci.Res.*, 53(2): 95-103.
- Batista-Brito, R., Machold, R., Klein, C., & Fishell, G. 2008. Gene expression in cortical interneuron precursors is prescient of their mature function. *Cereb.Cortex*, 18(10): 2306-2317.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. 2002. A estrutura do Sistema Nervoso. *Neurociências Desvendando o Sistema Nervoso*: 164-252.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. 2002. Neurônios e Glia. *Neurociências Desvendando o Sistema Nervoso*: 23-49.
- Bohmer, R. M. 1979. Flow cytometric cell cycle analysis using the quenching of 33258 Hoechst fluorescence by bromodeoxyuridine incorporation. *Cell Tissue Kinet.*, 12(1): 101-110.
- Bohner, A. P., Akers, R. M., & McConnell, S. K. 1997. Induction of deep layer cortical neurons in vitro. *Development*, 124(4): 915-923.
- Bonnin, A., Torii, M., Wang, L., Rakic, P., & Levitt, P. 2007. Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. *Nat.Neurosci.*, 10(5): 588-597.
- Bourassa, J. & Deschenes, M. 1995. Corticothalamic projections from the primary visual cortex in rats: a single fiber study using biocytin as an anterograde tracer. *Neuroscience*, 66(2): 253-263.
- Britanova, O., Akopov, S., Lukyanov, S., Gruss, P., & Tarabykin, V. 2005. Novel transcription factor *Satb2* interacts with matrix attachment region DNA elements in a tissue-specific manner and demonstrates cell-type-dependent expression in the developing mouse CNS. *Eur.J.Neurosci.*, 21(3): 658-668.
- Britanova, O., Alifragis, P., Junek, S., Jones, K., Gruss, P., & Tarabykin, V. 2006. A novel mode of tangential migration of cortical projection neurons. *Dev.Biol.*, 298(1): 299-311.
- Britanova, O., de Juan, R. C., Cheung, A., Kwan, K. Y., Schwark, M., Gyorgy, A., Vogel, T., Akopov, S., Mitkovski, M., Agoston, D., Sestan, N., Molnar, Z., & Tarabykin, V. 2008. *Satb2* is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron*, 57(3): 378-392.
- Butt, S. J., Fuccillo, M., Nery, S., Noctor, S., Kriegstein, A., Corbin, J. G., & Fishell, G. 2005. The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron*, 48(4): 591-604.
- Bystron, I., Blakemore, C., & Rakic, P. 2008. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat.Rev.Neurosci.*, 9(2): 110-122.
- Cai, L., Hayes, N. L., Takahashi, T., Caviness, V. S., Jr., & Nowakowski, R. S. 2002. Size distribution of retrovirally marked lineages matches prediction from population measurements of cell cycle behavior. *J.Neurosci.Res.*, 69(6): 731-744.
- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., & Huttner, W. B. 2005. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J.Neurosci.*, 25(28): 6533-6538.
- Callaway, E. M. & Katz, L. C. 1990. Emergence and refinement of clustered horizontal connections in cat striate cortex. *J.Neurosci.*, 10(4): 1134-1153.
- Calof, A. L. & Reichardt, L. F. 1984. Motoneurons purified by cell sorting respond to two distinct activities in myotube-conditioned medium. *Dev.Biol.*, 106(1): 194-210.

- Catapano, L. A., Arnold, M. W., Perez, F. A., & Macklis, J. D. 2001. Specific neurotrophic factors support the survival of cortical projection neurons at distinct stages of development. *J.Neurosci.*, 21(22): 8863-8872.
- Catapano, L. A., Arlotta, P., Cage, T. A., & Macklis, J. D. 2004. Stage-specific and opposing roles of BDNF, NT-3 and bFGF in differentiation of purified callosal projection neurons toward cellular repair of complex circuitry. *Eur.J.Neurosci.*, 19(9): 2421-2434.
- Caviness, V. S., Jr. 1982. Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res.*, 256(3): 293-302.
- Caviness, V. S., Jr. & Takahashi, T. 1995. Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Dev.*, 17(3): 159-163.
- Caviness, V. S., Jr., Goto, T., Tarui, T., Takahashi, T., Bhide, P. G., & Nowakowski, R. S. 2003. Cell output, cell cycle duration and neuronal specification: a model of integrated mechanisms of the neocortical proliferative process. *Cereb.Cortex*, 13(6): 592-598.
- Chan, C. H., Godinho, L. N., Thomaidou, D., Tan, S. S., Gulisano, M., & Parnavelas, J. G. 2001. Emx1 is a marker for pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Cereb.Cortex*, 11(12): 1191-1198.
- Chang, S. L., LoTurco, J. J., & Nisenbaum, L. K. 2000. In vitro biocytin injection into perinatal mouse brain: a method for tract tracing in developing tissue. *J.Neurosci.Methods*, 97(1): 1-6.
- Charlton, C. G. & Helke, C. J. 1987. Substance P-containing medullary projections to the intermediolateral cell column: identification with retrogradely transported rhodamine-labeled latex microspheres and immunohistochemistry. *Brain Res.*, 418(2): 245-254.
- Chen, B., Schaevitz, L. R., & McConnell, S. K. 2005. Fezl regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 102(47): 17184-17189.
- Chi, F. L., Jiao, Y., Liu, H. J., Wang, J., Shi, Y., & Barr, J. J. 2007. Retrograde neuron tracing with microspheres reveals projection of CGRP-immunolabeled vestibular afferent neurons to the vestibular efferent nucleus in the brainstem of rats. *Neuroendocrinology*, 85(3): 131-138.
- Chiu, F. C., Potter, P. E., & Rozental, R. 1998. Purification of human fetal hippocampal neurons by flow cytometry for transplantation. *Methods*, 16(3): 260-267.
- Cho, R. H., Segawa, S., Okamoto, K., Mizuno, A., & Kaneko, T. 2004. Intracellularly labeled pyramidal neurons in the cortical areas projecting to the spinal cord. II. Intra- and juxta-columnar projection of pyramidal neurons to corticospinal neurons. *Neurosci.Res.*, 50(4): 395-410.
- Cho, R. H., Segawa, S., Mizuno, A., & Kaneko, T. 2004. Intracellularly labeled pyramidal neurons in the cortical areas projecting to the spinal cord. I. Electrophysiological properties of pyramidal neurons. *Neurosci.Res.*, 50(4): 381-394.
- Conti, F., Rustioni, A., Petrusz, P., & Towle, A. C. 1987. Glutamate-positive neurons in the somatic sensory cortex of rats and monkeys. *J.Neurosci.*, 7(6): 1887-1901.
- Corbin, J. G., Nery, S., & Fishell, G. 2001. Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nat.Neurosci.*, 4 Suppl: 1177-1182.
- Corbin, J. G., Gaiano, N., Juliano, S. L., Poluch, S., Stancik, E., & Haydar, T. F. 2008. Regulation of neural progenitor cell development in the nervous system. *J.Neurochem.*, 106(6): 2272-2287.
- Cornwall, J. & Phillipson, O. T. 1988. Quantitative analysis of axonal branching using the retrograde transport of fluorescent latex microspheres. *J.Neurosci.Methods*, 24(1): 1-9.

- Crissman, H. A. & Steinkamp, J. A. 1987. A new method for rapid and sensitive detection of bromodeoxyuridine in DNA-replicating cells. *Exp.Cell Res.*, 173(1): 256-261.
- Dean, P. N. 2003. Flow Cytometry Instrumentation. *Curr. Protocol. Cytom.*: 1.1.1-1.1.8. John Wiley & Sons, Inc.
- DeDiego, I., Smith-Fernandez, A., & Fairen, A. 1994. Cortical cells that migrate beyond area boundaries: characterization of an early neuronal population in the lower intermediate zone of prenatal rats. *Eur.J.Neurosci.*, 6(6): 983-997.
- DeFelipe, J. & Farinas, I. 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog.Neurobiol.*, 39(6): 563-607.
- Dehay, C. & Kennedy, H. 2007. Cell-cycle control and cortical development. *Nat.Rev.Neurosci.*, 8(6): 438-450.
- Desai, A. R. & McConnell, S. K. 2000. Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development*, 127(13): 2863-2872.
- Deschenes, M., Bourassa, J., & Pinault, D. 1994. Corticothalamic projections from layer V cells in rat are collaterals of long-range corticofugal axons. *Brain Res.*, 664(1-2): 215-219.
- Deschenes, M., Veinante, P., & Zhang, Z. W. 1998. The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain Res.Brain Res.Rev.*, 28(3): 286-308.
- Dietrichs, E. & Haines, D. E. 1986. Do the same hypothalamic neurons project to both amygdala and cerebellum? *Brain Res.*, 364(2): 241-248.
- Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallavicini, M. G., & Gray, J. W. 1983. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 80(18): 5573-5577.
- Dreher, B., Dehay, C., & Bullier, J. 1990. Bihemispheric Collateralization of the Cortical and Subcortical Afferents to the Rat's Visual Cortex. *Eur.J.Neurosci.*, 2(4): 317-331.
- Ellwart, J. & Dormer, P. 1985. Effect of 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FdUrd) on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) incorporation into DNA measured with a monoclonal BrdUrd antibody and by the BrdUrd/Hoechst quenching effect. *Cytometry*, 6(6): 513-520.
- Elston, G. N., Pow, D. V., & Calford, M. B. 1997. Neuronal composition and morphology in layer IV of two vibrissal barrel subfields of rat cortex. *Cereb.Cortex*, 7(5): 422-431.
- Fazeli, A., Dickinson, S. L., Hermiston, M. L., Tighe, R. V., Steen, R. G., Small, C. G., Stoeckli, E. T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., Simons, J., Bronson, R. T., Gordon, J. I., Tessier-Lavigne, M., & Weinberg, R. A. 1997. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature (London)*, 386(6627): 796-804.
- Feig, S. L. 2004. Corticothalamic cells in layers 5 and 6 of primary and secondary sensory cortex express GAP-43 mRNA in the adult rat. *J.Comp Neurol.*, 468(1): 96-111.
- Feng, G., Mellor, R. H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q. T., Wallace, M., Nerbonne, J. M., Lichtman, J. W., & Sanes, J. R. 2000. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*, 28(1): 41-51.
- Feron, F., Lizard, G., & Sicard, G. 1995. Isolation of mature olfactory neurones using retrograde labelling and flow cytometry. *J.Neurosci.Methods*, 57(1): 9-14.
- Ferrere, A., Vitalis, T., Gingras, H., Gaspar, P., & Cases, O. 2006. Expression of Cux-1 and Cux-2 in the developing somatosensory cortex of normal and barrel-defective mice. *Anat.Rec.A Discov.Mol.Cell Evol.Biol.*, 288(2): 158-165.

- Fischer, D., Petkova, V., Thanos, S., & Benowitz, L. I. 2004. Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation. *J.Neurosci.*, 24(40): 8726-8740.
- Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S. L., Anderson, D. J., & Guillemot, F. 2000. A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev.*, 14(1): 67-80.
- Fogarty, M., Grist, M., Gelman, D., Marin, O., Pachnis, V., & Kessar, N. 2007. Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J.Neurosci.*, 27(41): 10935-10946.
- Frantz, G. D., Weimann, J. M., Levin, M. E., & McConnell, S. K. 1994. Otx1 and Otx2 define layers and regions in developing cerebral cortex and cerebellum. *J.Neurosci.*, 14(10): 5725-5740.
- Gal, J. S., Morozov, Y. M., Ayoub, A. E., Chatterjee, M., Rakic, P., & Haydar, T. F. 2006. Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J.Neurosci.*, 26(3): 1045-1056.
- Gao, W. J. & Zheng, Z. H. 2004. Target-specific differences in somatodendritic morphology of layer V pyramidal neurons in rat motor cortex. *J.Comp Neurol.*, 476(2): 174-185.
- Garcez, P. P., Henrique, N. P., Furtado, D. A., Bolz, J., Lent, R., & Uziel, D. 2007. Axons of callosal neurons bifurcate transiently at the white matter before consolidating an interhemispheric projection 4787. *Eur.J.Neurosci.*, 25(5): 1384-1394.
- Garel, S. & Rubenstein, J. L. 2004. Intermediate targets in formation of topographic projections: inputs from the thalamocortical system. *Trends Neurosci.*, 27(9): 533-539.
- Gaspard, N., Bouschet, T., Hourez, R., Dimidschstein, J., Naeije, G., van den, A. J., Espuny-Camacho, I., Herpoel, A., Passante, L., Schiffmann, S. N., Gaillard, A., & Vanderhaeghen, P. 2008. An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature (London)*, 455(7211): 351-357.
- Gerlyng, P., Stokke, T., Huitfeldt, H. S., Stenersen, T., Danielsen, H. E., Grotmol, T., & Seglen, P. O. 1992. Analytical methods for the study of liver cell proliferation. *Cytometry*, 13(4): 404-415.
- Gilbert, C. D. & Kelly, J. P. 1975. The projections of cells in different layers of the cat's visual cortex. *J.Comp Neurol.*, 163(1): 81-105.
- Godement, P., Vanselow, J., Thanos, S., & Bonhoeffer, F. 1987. A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development*, 101(4): 697-713.
- Godement, P., Wang, L. C., & Mason, C. A. 1994. Retinal axon divergence in the optic chiasm: dynamics of growth cone behavior at the midline. *J.Neurosci.*, 14(11 Pt 2): 7024-7039.
- Gorski, J. A., Talley, T., Qiu, M., Puelles, L., Rubenstein, J. L., & Jones, K. R. 2002. Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *Journal of Neuroscience*, 22(15): 6309-6314.
- Gotz, M., Hartfuss, E., & Malatesta, P. 2002. Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res.Bull.*, 57(6): 777-788.
- Hardt, O., Scholz, C., Kusters, D., Yanagawa, Y., Pennartz, S., Cremer, H., & Bosio, A. 2008. Gene expression analysis defines differences between region-specific GABAergic neurons. *Mol.Cell Neurosci.*, 39(3): 418-428.

- Hartig, W., Paulke, B. R., & Bruckner, G. 1992. Fluorescent latex microspheres for retrograde tracing of neurons in mouse basal forebrain combined with immunocytochemistry: a methodical approach. *Acta Histochem.Suppl*, 42: 261-265.
- Hattox, A. M. & Nelson, S. B. 2007. Layer V neurons in mouse cortex projecting to different targets have distinct physiological properties. *J.Neurophysiol.*
- Hayes, N. L. & Nowakowski, R. S. 2000. Exploiting the dynamics of S-phase tracers in developing brain: interkinetic nuclear migration for cells entering versus leaving the S-phase. *Dev.Neurosci.*, 22(1-2): 44-55.
- Hedin-Pereira, C., Lent, R., & Jhaveri, S. 1999. Morphogenesis of callosal arbors in the parietal cortex of hamsters. *Cereb.Cortex*, 9(1): 50-64.
- Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K. L., Hack, M. A., Chapouton, P., Barde, Y. A., & Gotz, M. 2002. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat.Neurosci.*, 5(4): 308-315.
- Hevner, R. F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y., Sheng, M., Smiga, S., Bulfone, A., Goffinet, A. M., Campagnoni, A. T., & Rubenstein, J. L. 2001. Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron*, 29(2): 353-366.
- Hevner, R. F., Daza, R. A., Rubenstein, J. L., Stunnenberg, H., Olavarria, J. F., & Englund, C. 2003. Beyond laminar fate: toward a molecular classification of cortical projection/pyramidal neurons. *Dev.Neurosci.*, 25(2-4): 139-151.
- Hevner, R. F., Hodge, R. D., Daza, R. A., & Englund, C. 2006. Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neurosci.Res.*, 55(3): 223-233.
- Hevner, R. F. 2007. Layer-specific markers as probes for neuron type identity in human neocortex and malformations of cortical development. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, 66(2): 101-109.
- Higo, S., Udaka, N., & Tamamaki, N. 2007. Long-range GABAergic projection neurons in the cat neocortex. *J.Comp Neurol.*, 503(3): 421-431.
- Hirata, T., Suda, Y., Nakao, K., Narimatsu, M., Hirano, T., & Hibi, M. 2004. Zinc finger gene fez-like functions in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons. *Dev.Dyn.*, 230(3): 546-556.
- Hirsch, J. A. 1995. Synaptic integration in layer IV of the ferret striate cortex. *J.Physiol*, 483 (Pt 1): 183-199.
- Honig, M. G. & Hume, R. I. 1986. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J.Cell Biol.*, 103(1): 171-187.
- Honig, M. G. & Hume, R. I. 1989. Carbocyanine dyes. Novel markers for labelling neurons. *Trends Neurosci.*, 12(9): 336-338.
- Honig, M. G. 1993. Dil labelling. *Neuroscience Protocols*, 50(16): 1-20.
- Huang, L. Y. 1987. Electrical properties of acutely isolated, identified rat spinal dorsal horn projection neurons. *Neurosci.Lett.*, 82(3): 267-272.
- Innocenti, G. M., Frost, D. O., & Illes, J. 1985. Maturation of visual callosal connections in visually deprived kittens: a challenging critical period. *J.Neurosci.*, 5(2): 255-267.
- Jacobson, M. 1991. *Developmental Neurobiology*. New York: Plenum.
- Jovanov-Milosevic, N., Benjak, V., & Kostovic, I. 2006. Transient cellular structures in developing corpus callosum of the human brain. *Coll.Antropol.*, 30(2): 375-381.

- Kasper, E. M., Lubke, J., Larkman, A. U., & Blakemore, C. 1994. Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. III. Differential maturation of axon targeting, dendritic morphology, and electrophysiological properties. *Journal of Comparative Neurology*, 339(4): 495-518.
- Kasper, E. M., Larkman, A. U., Lubke, J., & Blakemore, C. 1994. Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. I. Correlation among cell morphology, intrinsic electrophysiological properties, and axon targets. *J.Comp Neurol.*, 339(4): 459-474.
- Katz, L. C., Burkhalter, A., & Dreyer, W. J. 1984. Fluorescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for in vivo and in vitro studies of visual cortex. *Nature (London)*, 310(5977): 498-500.
- Katz, L. C. & Iarovici, D. M. 1990. Green fluorescent latex microspheres: a new retrograde tracer. *Neuroscience*, 34(2): 511-520.
- Kawaguchi, Y. & Kubota, Y. 1997. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb.Cortex*, 7(6): 476-486.
- Kennedy, T. E., Serafini, T., de, I. T., Jr., & Tessier-Lavigne, M. 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord 12. *Cell*, 78(3): 425-435.
- Kobbert, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J. L., Mey, J., & Thanos, S. 2000. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog.Neurobiol.*, 62(4): 327-351.
- Koester, S. E. & O'Leary, D. D. 1993. Connectional distinction between callosal and subcortically projecting cortical neurons is determined prior to axon extension 1. *Dev.Biol.*, 160(1): 1-14.
- Koester, S. E. & O'Leary, D. D. 1994. Axons of early generated neurons in cingulate cortex pioneer the corpus callosum. *J.Neurosci*, 14(11 Pt 1): 6608-6620.
- Kubbies, M. & Rabinovitch, P. S. 1983. Flow cytometric analysis of factors which influence the BrdUrd-Hoechst quenching effect in cultivated human fibroblasts and lymphocytes. *Cytometry*, 3(4): 276-281.
- Kubbies, M., Schindler, D., Hoehn, H., & Rabinovitch, P. S. 1985. BrdU-Hoechst flow cytometry reveals regulation of human lymphocyte growth by donor-age-related growth fraction and transition rate. *J.Cell Physiol*, 125(2): 229-234.
- Kubbies, M., Schindler, D., Hoehn, H., & Rabinovitch, P. S. 1985. Cell cycle kinetics by BrdU-Hoechst flow cytometry: an alternative to the differential metaphase labelling technique. *Cell Tissue Kinet.*, 18(5): 551-562.
- Kubbies, M. & Friedl, R. 1985. Flow cytometric correlation between BrdU/Hoechst quench effect and base pair composition in mammalian cell nuclei. *Histochemistry*, 83(2): 133-137.
- Kwan, K. Y., Lam, M. M., Krsnik, Z., Kawasaki, Y. I., Lefebvre, V., & Sestan, N. 2008. SOX5 postmitotically regulates migration, postmigratory differentiation, and projections of subplate and deep-layer neocortical neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 105(41): 16021-16026.
- Lai, T., Jabaudon, D., Molyneaux, B. J., Azim, E., Arlotta, P., Menezes, J. R., & Macklis, J. D. 2008. SOX5 Controls the Sequential Generation of Distinct Corticofugal Neuron Subtypes. *Neuron*, 57(2): 232-247.
- Larkman, A. & Mason, A. 1990. Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. I. Establishment of cell classes. *J.Neurosci.*, 10(5): 1407-1414.
- Latt, S. A. & Wohlleb, J. C. 1975. Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes. *Chromosoma*, 52(4): 297-316.

- Latt, S. A. 1977. Fluorometric detection of deoxyribonucleic acid synthesis; possibilities for interfacing bromodeoxyuridine dye techniques with flow fluorometry. *J.Histochem.Cytochem.*, 25(7): 913-926.
- Latt, S. A., George, Y. S., & Gray, J. W. 1977. Flow cytometric analysis of bromodeoxyuridine-substituted cells stained with 33258 Hoechst. *J.Histochem.Cytochem.*, 25(7): 927-934.
- Lavdas, A. A., Mione, M. C., & Parnavelas, J. G. 1996. Neuronal clones in the cerebral cortex show morphological and neurotransmitter heterogeneity during development. *Cereb.Cortex*, 6(3): 490-497.
- Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V., & Parnavelas, J. G. 1999. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J.Neurosci.*, 19(18): 7881-7888.
- Leid, M., Ishmael, J. E., Avram, D., Shepherd, D., Fraulob, V., & Dolle, P. 2004. CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis. *Gene Expr.Patterns.*, 4(6): 733-739.
- Lent, R. & Lacerda-de-Menezes, J. R. 1988. The neurogenesis of the callosal population of cortical cells in hamsters. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 21(3): 503-506.
- Lent, R., Hedin-Pereira, C., Menezes, J. R., & Jhaveri, S. 1990. Neurogenesis and development of callosal and intracortical connections in the hamster. *Neuroscience*, 38(1): 21-37.
- Lent, R. 2001. Nascimento, Vida e Morte do Sistema Nervoso. 4647. *100 Bilhões de Neurônios - Conceitos Fundamentais de Neurociência*: 29-64.
- Leone, D. P., Srinivasan, K., Chen, B., Alcamo, E., & McConnell, S. K. 2008. The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 18(1): 28-35.
- Lindwall, C., Fothergill, T., & Richards, L. J. 2007. Commissure formation in the mammalian forebrain. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 17(1): 3-14.
- Lubke, J., Egger, V., Sakmann, B., & Feldmeyer, D. 2000. Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. *J.Neurosci.*, 20(14): 5300-5311.
- Madison, R., Macklis, J. D., & Thies, C. 1990. Latex nanosphere delivery system (LNDS): novel nanometer-sized carriers of fluorescent dyes and active agents selectively target neuronal subpopulations via uptake and retrograde transport. *Brain Res.*, 522(1): 90-98.
- Maggio-Price, L., Grossmann, A., Shiota, F., & Engel, D. 1993. Increased proliferative capacity of CD4+ and CD8+ T lymphocytes from mutant sphha/sphha mice is associated with increased IL-2 receptor expression. *Cell Immunol.*, 148(2): 346-356.
- Marin, O., Anderson, S. A., & Rubenstein, J. L. 2000. Origin and molecular specification of striatal interneurons. *Journal of Neuroscience*, 20(16): 6063-6076.
- Marin, O. & Rubenstein, J. L. 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat.Rev.Neurosci.*, 2(11): 780-790.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., & Wu, C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat.Rev.Neurosci.*, 5(10): 793-807.
- Maruyama, A. & Ohmori, H. 2006. Fluorescent labeling of rat auditory brainstem circuits for synaptic and electrophysiological studies. *J.Neurosci.Methods*, 152(1-2): 163-172.
- Mason, A. & Larkman, A. 1990. Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. II. Electrophysiology. *J.Neurosci.*, 10(5): 1415-1428.
- McCauley, A. K., Frank, S. T., & Godwin, D. W. 2009. Brainstem nitroergic innervation of the mouse visual thalamus. *Brain Res.*, 1278: 34-49.

- McConnell, S. K. & Kaznowski, C. E. 1991. Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science*, 254(5029): 282-285.
- McEvelly, R. J., de Diaz, M. O., Schonemann, M. D., Hooshmand, F., & Rosenfeld, M. G. 2002. Transcriptional regulation of cortical neuron migration by POU domain factors. *Science*, 295(5559): 1528-1532.
- McGeorge, A. J. & Faull, R. L. 1987. The organization and collateralization of corticostriate neurones in the motor and sensory cortex of the rat brain. *Brain Res.*, 423(1-2): 318-324.
- Meissirel, C., Dehay, C., Berland, M., & Kennedy, H. 1991. Segregation of callosal and association pathways during development in the visual cortex of the primate. *J.Neurosci.*, 11(11): 3297-3316.
- Mercer, A., West, D. C., Morris, O. T., Kirchhecker, S., Kerkhoff, J. E., & Thomson, A. M. 2005. Excitatory connections made by presynaptic cortico-cortical pyramidal cells in layer 6 of the neocortex. *Cereb.Cortex*, 15(10): 1485-1496.
- Meyer, R. A., Zaruba, M. E., & McKhann, G. M. 1980. Flow cytometry of isolated cells from the brain. *Anal.Quant.Cytol.*, 2(1): 66-74.
- Miller, M. W. 1985. Cogeneration of retrogradely labeled corticocortical projection and GABA-immunoreactive local circuit neurons in cerebral cortex. *Brain Res.*, 355(2): 187-192.
- Mitchell, E. J. F., Cheung, A. F. P., and Molnar, Z. 2006. Expression pattern of parvalbumin, calbindin and calretinin in cortical layer V projection neurons in rat. FENS Forum Abstracts 3.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., & Ogawa, M. 2001. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron*, 31(5): 727-741.
- Molnar, Z. & Cheung, A. F. 2006. Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci.Res.*
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M., & Macklis, J. D. 2005. Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron*, 47(6): 817-831.
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R., & Macklis, J. D. 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat.Rev.Neurosci.*, 8(6): 427-437.
- Moroni, R. F., Inverardi, F., Regondi, M. C., Watakabe, A., Yamamori, T., Spreafico, R., & Frassoni, C. 2009. Expression of layer-specific markers in the adult neocortex of BCNU-Treated rat, a model of cortical dysplasia. *Neuroscience*, 159(2): 682-691.
- Mozdziak, P. E., Pulvermacher, P. M., Schultz, E., & Schell, K. 2000. Hoechst fluorescence intensity can be used to separate viable bromodeoxyuridine-labeled cells from viable non-bromodeoxyuridine-labeled cells. *Cytometry*, 41(2): 89-95.
- Muller, W. & Gautier, F. 1975. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. A - T-specific non-intercalating DNA ligands. *Eur.J.Biochem.*, 54(2): 385-394.
- Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O., & Pearlman, A. L. 2001. Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat.Neurosci.*, 4(2): 143-150.
- Nadarajah, B. & Parnavelas, J. G. 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(6): 423-432.
- Nadarajah, B. 2003. Radial glia and somal translocation of radial neurons in the developing cerebral cortex. *Glia*, 43(1): 33-36.

- Naegele, J. R., Arimatsu, Y., Schwartz, P., & Barnstable, C. J. 1988. Selective staining of a subset of GABAergic neurons in cat visual cortex by monoclonal antibody VC1.1. *J.Neurosci.*, 8(1): 79-89.
- Nakagawa, Y. & O'Leary, D. D. 2003. Dynamic patterned expression of orphan nuclear receptor genes RORalpha and RORbeta in developing mouse forebrain. *Dev.Neurosci.*, 25(2-4): 234-244.
- Nieto, M., Monuki, E. S., Tang, H., Imitola, J., Haubst, N., Khoury, S. J., Cunningham, J., Gotz, M., & Walsh, C. A. 2004. Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J.Comp Neurol.*, 479(2): 168-180.
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Wong, W. S., Clinton, B. K., & Kriegstein, A. R. 2002. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J.Neurosci.*, 22(8): 3161-3173.
- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., & Kriegstein, A. R. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat.Neurosci.*, 7(2): 136-144.
- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., & Kriegstein, A. R. 2008. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J.Comp Neurol.*, 508(1): 28-44.
- Nowakowski, R. S., LaVail, J., & Rakic, P. 1975. The correlation of the time of origin of neurons with their axonal projection: the combined use of [3H]thymidine autoradiography and horseradish peroxidase histochemistry. *Brain Res.*, 99(2): 343-348.
- Nowakowski, R. S., Lewin, S. B., & Miller, M. W. 1989. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J.Neurocytol.*, 18(3): 311-318.
- Nowakowski, R. S., Caviness, V. S., Jr., Takahashi, T., & Hayes, N. L. 2002. Population dynamics during cell proliferation and neuronogenesis in the developing murine neocortex. *Results Probl.Cell Differ.*, 39: 1-25.
- O'Rourke, N. A., Chenn, A., & McConnell, S. K. 1997. Postmitotic neurons migrate tangentially in the cortical ventricular zone. *Development*, 124(5): 997-1005.
- Ozaki, H. S. & Wahlsten, D. 1992. Prenatal formation of the normal mouse corpus callosum: a quantitative study with carbocyanine dyes. *J.Comp Neurol.*, 323(1): 81-90.
- Ozaki, H. S. & Wahlsten, D. 1998. Timing and origin of the first cortical axons to project through the corpus callosum and the subsequent emergence of callosal projection cells in mouse. *J.Comp Neurol.*, 400(2): 197-206.
- Packard, D. S., Jr., Menzies, R. A., & Skalko, R. G. 1973. Incorporation of thymidine and its analogue, bromodeoxyuridine, into embryos and maternal tissues of the mouse. *Differentiation*, 1(6): 397-404.
- Packard, D. S., Jr., Skalko, R. G., & Menzies, R. A. 1974. Growth retardation and cell death in mouse embryos following exposure to the teratogen bromodeoxyuridine. *Exp.Mol.Pathol.*, 21(3): 351-362.
- Paden, C. M., Berglund, D. L., Hapner, S. J., & Welsh, C. J. 1986. A flow cytometric method for intracellular labeling and purification of rare neuronal populations: isolation of fixed neurophysin neurons. *Brain Res.*, 376(2): 310-319.
- Parnavelas, J. G., Anderson, S. A., Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V., & Rubenstein, J. L. 2000. The contribution of the ganglionic eminence to the neuronal cell types of the cerebral cortex. *Novartis.Found.Symp.*, 228: 129-139.
- Peters, A. & Kara, D. A. 1985. The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. I. The pyramidal cells. *J.Comp Neurol.*, 234(2): 218-241.

- Petersen, C. C., Hahn, T. T., Mehta, M., Grinvald, A., & Sakmann, B. 2003. Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100(23): 13638-13643.
- Plickert, G. & Krohler, M. 1988. Proliferation kinetics and cell lineages can be studied in whole mounts and macerates by means of BrdU/anti-BrdU technique. *Development*, 103(4): 791-794.
- Polleux, F., Dehay, C., Moraillon, B., & Kennedy, H. 1997. Regulation of neuroblast cell-cycle kinetics plays a crucial role in the generation of unique features of neocortical areas. *J.Neurosci.*, 17(20): 7763-7783.
- Polleux, F., Giger, R. J., Ginty, D. D., Kolodkin, A. L., & Ghosh, A. 1998. Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science*, 282(5395): 1904-1906.
- Polleux, F., Dehay, C., Goffinet, A., & Kennedy, H. 2001. Pre- and post-mitotic events contribute to the progressive acquisition of area-specific connectional fate in the neocortex. *Cereb.Cortex*, 11(11): 1027-1039.
- Rakic, P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex 267. *J.Comp Neurol.*, 145(1): 61-83.
- Ramos, R. L., Tam, D. M., & Brumberg, J. C. 2008. Physiology and morphology of callosal projection neurons in mouse. *Neuroscience*, 153(3): 654-663.
- Rash, B. G. & Richards, L. J. 2001. A role for cingulate pioneering axons in the development of the corpus callosum. *J.Comp Neurol.*, 434(2): 147-157.
- Richards, L. J., Plachez, C., & Ren, T. 2004. Mechanisms regulating the development of the corpus callosum and its agenesis in mouse and human. *Clin.Genet.*, 66(4): 276-289.
- Roholl, P. J. & Distel, B. 1984. A study of the proliferative response of rabbit T cells using the BrdU-Hoechst method. *Cell Tissue Kinet.*, 17(3): 263-273.
- Rozental, R., Gebhard, D., Padin, C., Urban, M., Wu, J. Y., Spray, D. C., & Chiu, F. C. 1995. Purification of cell populations from human fetal brain using flow cytometric techniques 45. *Brain Res.Dev.Brain Res.*, 85(2): 161-170.
- Rymar, V. V. & Sadikot, A. F. 2007. Laminar fate of cortical GABAergic interneurons is dependent on both birthdate and phenotype. *J.Comp Neurol.*, 501(3): 369-380.
- Schwartz, M. L., Rakic, P., & Goldman-Rakic, P. S. 1991. Early phenotype expression of cortical neurons: evidence that a subclass of migrating neurons have callosal axons 164. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 88(4): 1354-1358.
- Sekerikova, G., Ilijic, E., & Mugnaini, E. 2004. Bromodeoxyuridine administered during neurogenesis of the projection neurons causes cerebellar defects in rat. *J.Comp Neurol.*, 470(3): 221-239.
- Senatorov, V. V., Trudeau, V. L., & Hu, B. 1997. Immunofluorescence in situ hybridization (IFISH) in neurones retrogradely labelled with rhodamine latex microspheres. *Brain Res.Brain Res.Protoc.*, 1(1): 49-56.
- Serafini, T., Colamarino, S. A., Leonardo, E. D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W. C., & Tessier-Lavigne, M. 1996. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell*, 87(6): 1001-1014.
- Seymour, R. M. & Berry, M. 1975. Scanning and transmission electron microscope studies of interkinetic nuclear migration in the cerebral vesicles of the rat. *J.Comp Neurol.*, 160(1): 105-125.
- Shapiro, H. M. 2003. Overture. *Practical Flow Cytometry*: 1-60. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.

- Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J. T., Fasano, C. A., Phoenix, T. N., Lemischka, I. R., Ivanova, N. B., Stifani, S., Morrisey, E. E., & Temple, S. 2006. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat.Neurosci.*, 9(6): 743-751.
- Shirasaki, R., Katsumata, R., & Murakami, F. 1998. Change in chemoattractant responsiveness of developing axons at an intermediate target. *Science*, 279(5347): 105-107.
- Shu, T., Valentino, K. M., Seaman, C., Cooper, H. M., & Richards, L. J. 2000. Expression of the netrin-1 receptor, deleted in colorectal cancer (DCC), is largely confined to projecting neurons in the developing forebrain. *J.Comp Neurol.*, 416(2): 201-212.
- Shu, T. & Richards, L. J. 2001. Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the corpus callosum. *J.Neurosci.*, 21(8): 2749-2758.
- Shu, T., Sundaresan, V., McCarthy, M. M., & Richards, L. J. 2003. Slit2 guides both precrossing and postcrossing callosal axons at the midline in vivo. *J.Neurosci.*, 23(22): 8176-8184.
- Sidman, R. L., MIALE, I. L., & FEDER, N. 1959. Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp.Neurol*, 1: 322-333.
- Silver, J., Lorenz, S. E., Wahlsten, D., & Coughlin, J. 1982. Axonal guidance during development of the great cerebral commissures: descriptive and experimental studies, in vivo, on the role of preformed glial pathways. *J.Comp Neurol.*, 210(1): 10-29.
- Simons, D. J. & Woolsey, T. A. 1984. Morphology of Golgi-Cox-impregnated barrel neurons in rat Sml cortex. *J.Comp Neurol.*, 230(1): 119-132.
- Smart, I. H. & McSherry, G. M. 1982. Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon. II. Histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production. *J.Anat.*, 134(Pt 3): 415-442.
- Soriano, E. & Del Rio, J. A. 1991. Simultaneous immunocytochemical visualization of bromodeoxyuridine and neural tissue antigens. *J.Histochem.Cytochem.*, 39(3): 255-263.
- Soriano, E., Del Rio, J. A., Martinez-Guijarro, F. J., Ferrer, I., & Lopez, C. 1991. Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine in fluoro-gold-labeled neurons: a simple technique to combine retrograde axonal tracing and neurogenetic characterization of neurons. *J.Histochem.Cytochem.*, 39(11): 1565-1570.
- Soriano, E., Dumesnil, N., Auladell, C., Cohen-Tannoudji, M., & Sotelo, C. 1995. Molecular heterogeneity of progenitors and radial migration in the developing cerebral cortex revealed by transgene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92(25): 11676-11680.
- St John, P. A., Kell, W. M., Mazzetta, J. S., Lange, G. D., & Barker, J. L. 1986. Analysis and isolation of embryonic mammalian neurons by fluorescence-activated cell sorting. *J.Neurosci.*, 6(5): 1492-1512.
- Stanfield, B. B. & Jacobowitz, D. M. 1990. Antibody to a soluble protein purified from brain selectively labels layer V corticofugal projection neurons in rat neocortex. *Brain Res.*, 531(1-2): 219-224.
- Stuermer, C. A. & Bastmeyer, M. 2000. The retinal axon's pathfinding to the optic disk. *Prog.Neurobiol.*, 62(2): 197-214.
- Stuhmer, T., Anderson, S. A., Ekker, M., & Rubenstein, J. L. 2002. Ectopic expression of the Dlx genes induces glutamic acid decarboxylase and Dlx expression. *Development*, 129(1): 245-252.
- Stuhmer, T., Puellas, L., Ekker, M., & Rubenstein, J. L. 2002. Expression from a Dlx gene enhancer marks adult mouse cortical GABAergic neurons. *Cereb.Cortex*, 12(1): 75-85.

- Sugino, K., Hempel, C. M., Miller, M. N., Hattox, A. M., Shapiro, P., Wu, C., Huang, Z. J., & Nelson, S. B. 2006. Molecular taxonomy of major neuronal classes in the adult mouse forebrain. *Nat.Neurosci.*, 9(1): 99-107.
- Sugitani, Y., Nakai, S., Minowa, O., Nishi, M., Jishage, K., Kawano, H., Mori, K., Ogawa, M., & Noda, T. 2002. Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes Dev.*, 16(14): 1760-1765.
- Suter, B., Nowakowski, R. S., Bhide, P. G., & Caviness, V. S. 2007. Navigating neocortical neurogenesis and neuronal specification: a positional information system encoded by neurogenetic gradients. *J.Neurosci.*, 27(40): 10777-10784.
- Szemes, M., Gyorgy, A., Paweletz, C., Dobi, A., & Agoston, D. V. 2006. Isolation and characterization of SATB2, a novel AT-rich DNA binding protein expressed in development- and cell-specific manner in the rat brain. *Neurochem.Res.*, 31(2): 237-246.
- Tabata, H. & Nakajima, K. 2003. Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J.Neurosci.*, 23(31): 9996-10001.
- Takahashi, T., Nowakowski, R. S., & Caviness, V. S., Jr. 1992. BUdR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. *J.Neurocytol.*, 21(3): 185-197.
- Takahashi, T., Nowakowski, R. S., & Caviness, V. S., Jr. 1993. Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J.Neurosci.*, 13(2): 820-833.
- Takahashi, T., Nowakowski, R. S., & Caviness, V. S., Jr. 1994. Mode of cell proliferation in the developing mouse neocortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91(1): 375-379.
- Takahashi, T., Nowakowski, R. S., & Caviness, V. S., Jr. 1995. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J.Neurosci.*, 15(9): 6046-6057.
- Takahashi, T., Goto, T., Miyama, S., Nowakowski, R. S., & Caviness, V. S., Jr. 1999. Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate: relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall. *J.Neurosci.*, 19(23): 10357-10371.
- Tamamaki, N., Nakamura, K., Okamoto, K., & Kaneko, T. 2001. Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. *Neurosci.Res.*, 41(1): 51-60.
- Tan, S. S., Kalloniatis, M., Sturm, K., Tam, P. P., Reese, B. E., & Faulkner-Jones, B. 1998. Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of the cerebral neocortex. *Neuron*, 21(2): 295-304.
- Tanigawa, H., Wang, Q., & Fujita, I. 2005. Organization of horizontal axons in the inferior temporal cortex and primary visual cortex of the macaque monkey. *Cereb.Cortex*, 15(12): 1887-1899.
- Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N., & Gruss, P. 2001. Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Development*, 128(11): 1983-1993.
- Taupin, P. 2007. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res.Rev.*, 53(1): 198-214.
- Tiedemann, H., Asashima, M., Grunz, H., Knochel, W., Tiedemann, H. 1998. Neural induction in embryos. *Dev.Growth Differ.*, 40(4): 363-376.
- Thomson, A. M., West, D. C., Wang, Y., & Bannister, A. P. 2002. Synaptic connections and small circuits involving excitatory and inhibitory neurons in layers 2-5 of adult rat and cat neocortex: triple intracellular recordings and biocytin labelling in vitro. *Cereb.Cortex*, 12(9): 936-953.

- Thomson, A. M. & Bannister, A. P. 2003. Interlaminar connections in the neocortex. *Cereb.Cortex*, 13(1): 5-14.
- Tomioka, R., Okamoto, K., Furuta, T., Fujiyama, F., Iwasato, T., Yanagawa, Y., Obata, K., Kaneko, T., & Tamamaki, N. 2005. Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. *Eur.J.Neurosci.*, 21(6): 1587-1600.
- Tseng, G. F. & Prince, D. A. 1993. Heterogeneity of rat corticospinal neurons. *J.Comp Neurol.*, 335(1): 92-108.
- Valcanis, H. & Tan, S. S. 2003. Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex. *J.Neurosci.*, 23(12): 5113-5122.
- Veinante, P., Lavalley, P., & Deschenes, M. 2000. Corticothalamic projections from layer 5 of the vibrissal barrel cortex in the rat. *J.Comp Neurol.*, 424(2): 197-204.
- Vercelli, A., Repici, M., Garbossa, D., & Grimaldi, A. 2000. Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res.Bull.*, 51(1): 11-28.
- Voigt, T., LeVay, S., & Stamnes, M. A. 1988. Morphological and immunocytochemical observations on the visual callosal projections in the cat. *J.Comp Neurol.*, 272(3): 450-460.
- Walsh, C. & Cepko, C. L. 1990. Cell lineage and cell migration in the developing cerebral cortex. *Experientia*, 46(9): 940-947.
- Watakabe, A., Ichinohe, N., Ohsawa, S., Hashikawa, T., Komatsu, Y., Rockland, K. S., & Yamamori, T. 2007. Comparative analysis of layer-specific genes in Mammalian neocortex. *Cereb.Cortex*, 17(8): 1918-1933.
- Watakabe, A. 2009. Comparative molecular neuroanatomy of mammalian neocortex: what can gene expression tell us about areas and layers? *Dev.Growth Differ.*, 51(3): 343-354.
- Weisblum, B. & Haenssler, E. 1974. Fluorometric properties of the bibenzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA. *Chromosoma*, 46(3): 255-260.
- Wichterle, H., Turnbull, D. H., Nery, S., Fishell, G., & varez-Buylla, A. 2001. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development*, 128(19): 3759-3771.
- Wise, S. P. & Jones, E. G. 1976. Transneuronal or retrograde transport of (3H)adenosine in the rat somatic sensory system. *Brain Res.*, 107(1): 127-131.
- Wonders, C. P. & Anderson, S. A. 2006. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat.Rev.Neurosci.*, 7(9): 687-696.
- Xu, B., Zang, K., Ruff, N. L., Zhang, Y. A., McConnell, S. K., Stryker, M. P., & Reichardt, L. F. 2000. Cortical degeneration in the absence of neurotrophin signaling: dendritic retraction and neuronal loss after removal of the receptor TrkB. *Neuron*, 26(1): 233-245.
- Xu, Q. & Grant, G. 1988. Collateral projections of neurons from the lower part of the spinal cord to anterior and posterior cerebellar termination areas. A retrograde fluorescent double labeling study in the cat. *Exp.Brain Res.*, 72(3): 562-576.
- Xu, Q., De La, C. E., & Anderson, S. A. 2003. Cortical interneuron fate determination: diverse sources for distinct subtypes?. *Cereb.Cortex*, 13(6): 670-676.
- Xu, Q., Cobos, I., De La, C. E., Rubenstein, J. L., & Anderson, S. A. 2004. Origins of cortical interneuron subtypes. *J.Neurosci.*, 24(11): 2612-2622.

Xu, X., Roby, K. D., & Callaway, E. M. 2006. Mouse cortical inhibitory neuron type that coexpresses somatostatin and calretinin. *J.Comp Neurol.*, 499(1): 144-160.

Yoneshima, H., Yamasaki, S., Voelker, C. C., Molnar, Z., Christophe, E., Audinat, E., Takemoto, M., Nishiwaki, M., Tsuji, S., Fujita, I., & Yamamoto, N. 2006. Er81 is expressed in a subpopulation of layer 5 neurons in rodent and primate neocortices. *Neuroscience*, 137(2): 401-412.

Zhang, Z. W. & Deschenes, M. 1997. Intracortical axonal projections of lamina VI cells of the primary somatosensory cortex in the rat: a single-cell labeling study. *J.Neurosci.*, 17(16): 6365-6379.

Zimmer, C., Tiveron, M. C., Bodmer, R., & Cremer, H. 2004. Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons. *Cereb.Cortex*, 14(12): 1408-1420.

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](#)