



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

THAYANA DE NAZARÉ ARAÚJO MOREIRA

ASPECTOS MORFOLÓGICOS COMPARATIVOS ENTRE NEURÔNIOS DA
CAMADA I DO CÓRTEX VISUAL DE DUAS ESPÉCIES DE ROEDORES: *Cavia*
porcellus E *Rattus norvegicus*.

BELÉM-PARÁ

2014

THAYANA DE NAZARÉ ARAÚJO MOREIRA

ASPECTOS MORFOLÓGICOS COMPARATIVOS ENTRE NEURÔNIOS DA
CAMADA I DO CÓRTEX VISUAL DE DUAS ESPÉCIES DE ROEDORES: *Cavia
porcellus* E *Rattus norvegicus*.

Dissertação apresentada e aprovada pela
coordenação do Curso de Pós-Graduação
em Neurociências e Biologia Celular, da
Universidade Federal do Pará, como
requisito para a obtenção do grau de
Mestre em Neurociências e Biologia
Celular.

Orientador: Prof. Dr. Manoel da Silva Filho

BELÉM-PARÁ

2014

THAYANA DE NAZARÉ ARAÚJO MOREIRA

ASPECTOS MORFOLÓGICOS COMPARATIVOS ENTRE NEURÔNIOS DA
CAMADA I DO CÓRTEX VISUAL DE DUAS ESPÉCIES DE ROEDORES: *Cavia
porcellus* E *Rattus norvegicus*.

Orientador: Prof. Dr. Manoel da Silva Filho

Banca Examinadora: Prof. Dr. Anderson Raiol Rodrigues
Prof. Dr. Daniel Valle Vasconcelos Santos
Prof. Dr. Moisés Hamoy

Belém, 20 de agosto de 2014

BELÉM-PARÁ

2014

Ao meu amor, Fábio Carvalho,
e à minha família: Antonio,
Noemia e Thiago.

AGRADECIMENTOS

Chegar até este momento seria impossível sozinha e, graças à Deus, tive ajuda de muita gente boa ao longo dessa trajetória, as quais faço questão de abraçar e agradecer por toda a ajuda direta ou indireta para que eu fosse capaz de realizar mais esse sonho.

Agradeço especialmente ao meu amor e maior incentivador para conclusão desse mestrado, Fábio Carvalho. Muito obrigada, amor, por todo o seu carinho, amor, companheirismo, cumplicidade, atenção, cuidado e direcionamento que me deste desde o dia que nos reencontramos. Você me faz ser uma pessoa melhor a cada dia e meu amor por você é infinito. Obrigada por estar comigo em todos os momentos, por não me deixar fraquejar e por todo o apoio e incentivo inesgotáveis até os últimos momentos dessa trajetória.

Agradeço aos meus amados pais Antonio e Noemia, e ao meu irmãozinho Thiago, por todo amor e torcida para mais essa conquista, pelas orações e pelos momentos de aconchego e relaxamento. Vocês são a minha base forte, meus amores!

Agradeço ao meu querido orientador Prof. Manoel da Silva Filho por ter me acolhido quando eu estava perdida e me mostrado que eu posso ir mais além escolhendo esse caminho. Prof., nesses dois anos que estamos caminhando juntos você me ensinou tanta coisa boa que eu nem sei por onde começar a te agradecer. Sinto-me privilegiada de poder estar em sua companhia e poder desfrutar de sua sabedoria e conhecimento. Tenho uma profunda admiração pelo ser humano que você é e por toda sua dedicação e amor pela ciência que são inspiradores. Obrigada pelas orientações profissionais e pessoais, sem você nada disso seria possível.

Agradeço a todos os colegas de laboratório que estão conosco e aqueles que já passaram por lá. Todos vocês de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e me proporcionaram diversos momentos de alegria e descontração. Faço um agradecimento especial ao colega Daniel Santos que muito me ajudou a entender e manusear as ferramentas de análise e por toda a sua contribuição neste trabalho, sempre muito prestativo e paciente. Dani, muito obrigada de coração!

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, à coordenação do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (PPNBC) e à secretaria da PPNBC pela

prestatividade e agilidade do atendimento, em especial à Sra. Socorro Andrade pela paciência e atenção.

*Foi o tempo que dedicaste à
tua rosa que a fez tão
importante.*

Antonie Saint Exupéry

RESUMO

A camada I tem como característica principal a baixa quantidade de neurônios e uma alta densidade de fibras nervosas. A morfologia dos neurônios da camada I ainda é pouco estudada, tanto que nos estudos que avaliaram a morfologia desses neurônios não se chegou ainda a um consenso sobre as formas e funções desses neurônios. Este estudo avaliou a morfologia dos neurônios da camada I do córtex visual de duas espécies de roedores: *Cavia porcellus*, popularmente conhecido no Brasil como porquinho-da-índia e *Rattus norvegicus*, que é o rato e foi utilizada a linhagem Wistar, comumente usado nas pesquisas científicas. O porquinho-da-índia é um modelo animal muito estudado, utilizado em diversos segmentos da ciência. Apesar dessa espécie ser bem estudada, trabalhos na camada I desse animal são relativamente raros, especialmente em relação à morfologia e eletrofisiologia dos neurônios dessa região cortical. Pesquisas em ratos sobre os neurônios da camada I são mais frequentes, tanto em relação a morfologia quanto a eletrofisiologia. Para discriminar as possibilidades de diferenças na morfologia dos neurônios da camada I do córtex visual do porquinho-da-índia e do rato, este estudo classificou esses neurônios de acordo com a trajetória de seus dendritos e analisou as medidas dendríticas utilizando a técnica de injeção intracelular de biocitina. Após a classificação dos neurônios as comparações foram feitas entre os mesmos tipos celulares de cada roedor. Foram utilizados 35 porquinhos-da-índia da variedade Dunkin-Hartley de pêlo curto de ambos os sexos com idades de 4 a 5 dias de vida pós-natal. Quanto aos ratos, foram utilizados 30 ratos da variedade Wistar, de ambos os sexos com idades de 14 a 21 dias de vida pós-natal. Os animais foram anestesiados e tiveram seus encéfalos removidos, hemisférios separados e foram realizados cortes no plano coronal na região occipital onde se localiza a área visual dos roedores. As fatias foram mantidas em líquido cérebro-espinhal artificial e em seguida levadas ao microscópio para injeção de biocitina e posteriormente foram fixadas e tratadas para montagem em lâmina e contracoloradas com Nissl para melhor visualização. Os neurônios encontrados foram classificados como: horizontais, ascendentes, descendentes e radiais. Foram analisadas as seguintes medidas dendríticas: área do campo receptor, comprimento dendrítico total e médio, área total do corpo celular, número de dendritos, distância da pia-máter e análise da distribuição de Sholl. Dos resultados obtidos os mais notáveis foram o alcance dos ramos dendríticos e o tamanho do corpo celular dos neurônios da camada I do porquinho-da-índia quando comparados aos do rato. Isso sugere que, nessa espécie, um maior número de microcircuitos neurais podem ser estabelecidos, e por conseguinte maior taxa metabólica, justificada pelo maior tamanho do corpo celular.

Palavras-Chave: camada I, morfologia, córtex visual, porquinho-da-índia

ABSTRACT

The layer I has as main characteristic the low number of neurons and a high density of nerve fibers. The morphology of neurons of layer I is still understudied, so that in studies evaluating the morphology of these neurons has not yet reached a consensus on the forms and functions of these neurons. This study evaluated the morphology of neurons in layer I of the visual cortex of two rodent species: *Cavia porcellus*, popularly known in Brazil as a guinea pig and *Rattus norvegicus*, which is the rat and the Wistar strain was used, commonly used in scientific research. The guinea pig is a widely studied animal model used in several areas of science. Although this species is well studied, works on layer I of this animal are relatively rare, especially in relation to morphology and electrophysiology of neurons in this cortical region. Research in rats on neurons of layer I are more frequent, both in relation to morphology and electrophysiology. To discriminate the potential for differences in the morphology of neurons in layer I of the visual cortex of the guinea pig and mouse, this study classified these neurons according to the trajectory of their dendrites and dendritic measures analyzed using the technique of intracellular injection of biocytin. After classification of neurons comparisons were made between the same cell types of each rodent. 35 guinea India Dunkin-Hartley variety of short-haired of both sexes aged 4-5 days of postnatal life were used. As for the rats, 30 rats of Wistar variety of both sexes aged 14 to 21 days of postnatal life were used. The animals were anesthetized and had their brains removed, separated hemispheres and sections were made in the coronal plane in the occipital region where is located the visual area of rodents. Slices were maintained in artificial cerebrospinal fluid and then brought to the microscope to inject biocytin and subsequently were fixed and treated for mounting on slides and counterstained with Nissl for better viewing. Neurons found were classified as horizontal, ascending, descending and radial. The receptive field area, total and average dendritic length, total area of the cell body, dendrites number, distance from the pia mater and distribution analysis Sholl: The following dendritic measures were analyzed. Results of the most notable were the extent of dendritic branches and the size of the cell body of neurons of layer I of the guinea pig compared to rat. This suggests that in this species, a larger number of neural microcircuits can be established, and therefore greater metabolic rate justified by the size of the cell body.

Keywords: layer I, morphology, visual cortex, guinea pig

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Ilustração mostrando os passos para a retirada do bloco cortical no plano coronal contendo a área visual primária. Notar a laminação onde a camada I possui população neuronal mais rarefeita 12
- Figura 2. Célula piramidal encontrada no córtex visual do rato (seta vermelha) com seu dendrito apical se projetando até a camada I (seta azul) 15
- Figura 3. Desenhos de células encontradas na camada I do córtex visual dos roedores classificadas como horizontal (A) e ascendente (B). A célula horizontal (A) tem a maioria de seus dendritos surgindo em polos opostos do seu corpo celular (em vermelho) e em trajetória horizontal. A célula ascendente (B) tem a maioria de seus dendritos projetados para cima do seu corpo celular (em azul) 19
- Figura 4. Desenhos de células encontradas na camada I do córtex visual dos roedores classificadas como descendentes (A) e radiais (B). A células descendente (A) tem a maioria dos seus dendritos projetados para baixo do seu corpo celular (em vermelho). A célula radial (B) tem os seus dendritos projetados para todos os lados a partir do seu corpo celular (em azul) 20
- Figura 5. Fotografia em perspectiva dos encéfalos do porquinho-da-índia (A) e do rato (B). As áreas em vermelho correspondem as áreas visuais das duas espécies 25
- Figura 6. Área de análise representada pela barra vertical (90 μ m) que abrange toda a extensão entre a superfície pial (seta azul) e a borda superior da camada II (seta vermelha) do córtex visual do porquinho-da-índia..... 26
- Figura 7. Desenho esquemático da metodologia da técnica de injeção intracelular de biocitina. As fatias são levadas à cuba de injeção intracelular adaptada ao microscópio (A e B). Ao localizar a célula na camada I (C), a micropipeta é posicionada sobre o corpo celular e em contato com a membrana a ponta da micropipeta faz uma sucção com posterior ruptura da membrana e a biocitina foi injetada fixando o potencial do neurônio em -65 mV (D)..... 27
- Figura 8. Desenho esquemático da metodologia aplicada nas análises das medidas dendríticas em neurônio horizontal. Os pontilhados azuis indicam a área do campo receptor dendrítico e os pontilhados vermelhos indicam a área total do corpo celular em A. Em B cada traço colorido representa um tipo de dendrito (primário a quaternário) o comprimento de cada traço foi medido e somado resultando na comprimento dendrítico total, e a média dessa soma resulta no comprimento dendrítico médio. A distância da pia-máter é medida traçando uma reta do centro do corpo celular até a altura da superfície pial como ilustrado na barra branca em C 29
- Figura 9. Desenho esquemático da metodologia da análise de distribuição de Sholl em um neurônio horizontal. Os círculos azuis são 20 μ m maiores em relação ao seu

antecessor. Os pontos vermelhos representam as interseções que as ramificações dendríticas fazem em cada intervalo e este resultado é plotado em função do número de interseções e a distância do centro do corpo celular.....	30
Figura 10. Células do tipo horizontal encontradas na camada I do córtex visual de porquinho-da-índia (A) e rato (B).....	33
Figura 11. Células do tipo ascendente encontradas na camada I do córtex visual do porquinho-da-índia (A) e do rato (B).....	34
Figura 12. Células do tipo descendente encontradas na camada I do córtex visual de porquinho-da-índia (A) e rato (B).....	36
Figura 13. Células do tipo radial encontradas na camada I do córtex visual de porquinho-da-índia (A) e rato (B).....	38
Figura 14. A espessura da camada I do córtex visual do porquinho-da-índia e do rato apresentou resultados muito semelhantes entre as duas espécies de roedores	39
Figura 15. Avaliação do número total de dendritos detectados em cada tipo celular encontrados na camada I do córtex visual do porquinho-da-índia e rato, com destaque para os neurônios radiais das duas espécies que apresentaram diferença significativa, mostrando que os neurônios radiais do porquinho-da-índia possuem um número maior de dendritos que os neurônios radiais do rato	41
Figura 16. Diferenças no comprimento dendrítico total encontradas em três tipos celulares das duas espécies estudadas. As células ascendentes, descendentes e radiais do porquinho-da-índia possuem um comprimento dendrítico maior quando comparadas aos mesmos tipos celulares encontrados na camada I do rato	42
Figura 17. Células ascendentes encontradas na camada I do córtex visual do porquinho-da-índia possuem o comprimento dendrítico médio significativamente maior que as células com a mesma classificação encontradas na mesma região cortical do rato.....	42
Figura 18. A área total do corpo celular de todos os tipos de neurônios encontrados na camada I do córtex visual do porquinho-da-índia é estatisticamente maior que os encontrados na mesma área cortical do rato	43
Figura 19. Diferenças encontradas na extensão da área do campo receptor dos tipos celulares detectados nos dois roedores estudados. As células ascendentes, descendentes e radiais apresentam resultados estatisticamente significantes mostrando que as células do porquinho-da-índia têm uma área de recepção de conexões maior que as células do rato	44

Figura 20. As distâncias encontradas entre o corpo celular e a pia-máter dos tipos celulares de cada espécie revelam diferenças significativas nas células ascendentes e descendentes	44
Figura 21. Diferenças do raio máximo de Sholl atingido pelas células da camada I dos roedores	45
Figura 22. Análise da distribuição de Sholl dos neurônios horizontais (A) e ascendentes (B) da camada I do córtex visual do porquinho-da-índia e do rato que mostra que os dendritos das células do porquinho-da-índia alcançam uma distância maior do que os dendritos das células da camada I do rato	47
Figura 23. Análise da distribuição de Sholl dos neurônios descendentes (A) e radiais (B) da camada I do córtex visual do porquinho-da-índia e do rato que mostra que os dendritos das células do porquinho-da-índia alcançam uma distância maior do que os dendritos das células da camada I do rato	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo das propriedades morfométricas dos tipos celulares encontrados na camada I do córtex visual de porquinho-da-índia e rato	40
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS NEURÔNIOS DO CÓRTEX CEREBRAL.....	14
1.2 CARACTERÍSTICAS DOS NEURÔNIOS DA CAMADA I	16
1.3 DESENVOLVIMENTO CORTICAL DO RATO	21
1.4 DESENVOLVIMENTO CORTICAL DO PORQUINHO-DA-ÍNDIA	22
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 MÉTODOS	24
3.1 ANIMAIS	24
3.2 HISTOLOGIA E ESTEREOLOGIA	24
3.2.1 Preparo das fatias e identificação de neurônios da camada I	24
3.2.2 Marcação de neurônios através da técnica de biocitina	26
3.3 TRATAMENTO DAS IMAGENS E MORFOMETRIA	28
3.4 CLASSIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS DA CAMADA I	31
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	50
5.1 CÉLULAS HORIZONTAIS	50
5.2 CÉLULAS ASCENDENTES	51
5.3 CÉLULAS DESCENDENTES	52
5.4 CÉLULAS RADIAIS	52
6 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

O córtex cerebral, também chamado de neocórtex, constitui aproximadamente 80% do cérebro humano. É composto por seis camadas que podem ser diferenciadas prontamente ao se observar um corte histológico do córtex como na Figura 1 que traz essa diferenciação por marcação e a sua numeração correspondente. A tentativa de entender e desvendar o esquema deste modelo com desenho tão complexo já ocorre há mais de um século. Entre as principais dificuldades para o entendimento dos circuitos desse sistema tem-se a enorme variedade de interneurônios inibitórios distribuídos nas camadas corticais (MARKRAM et al., 2004) presentes principalmente na camada I que é a região abordada neste estudo.

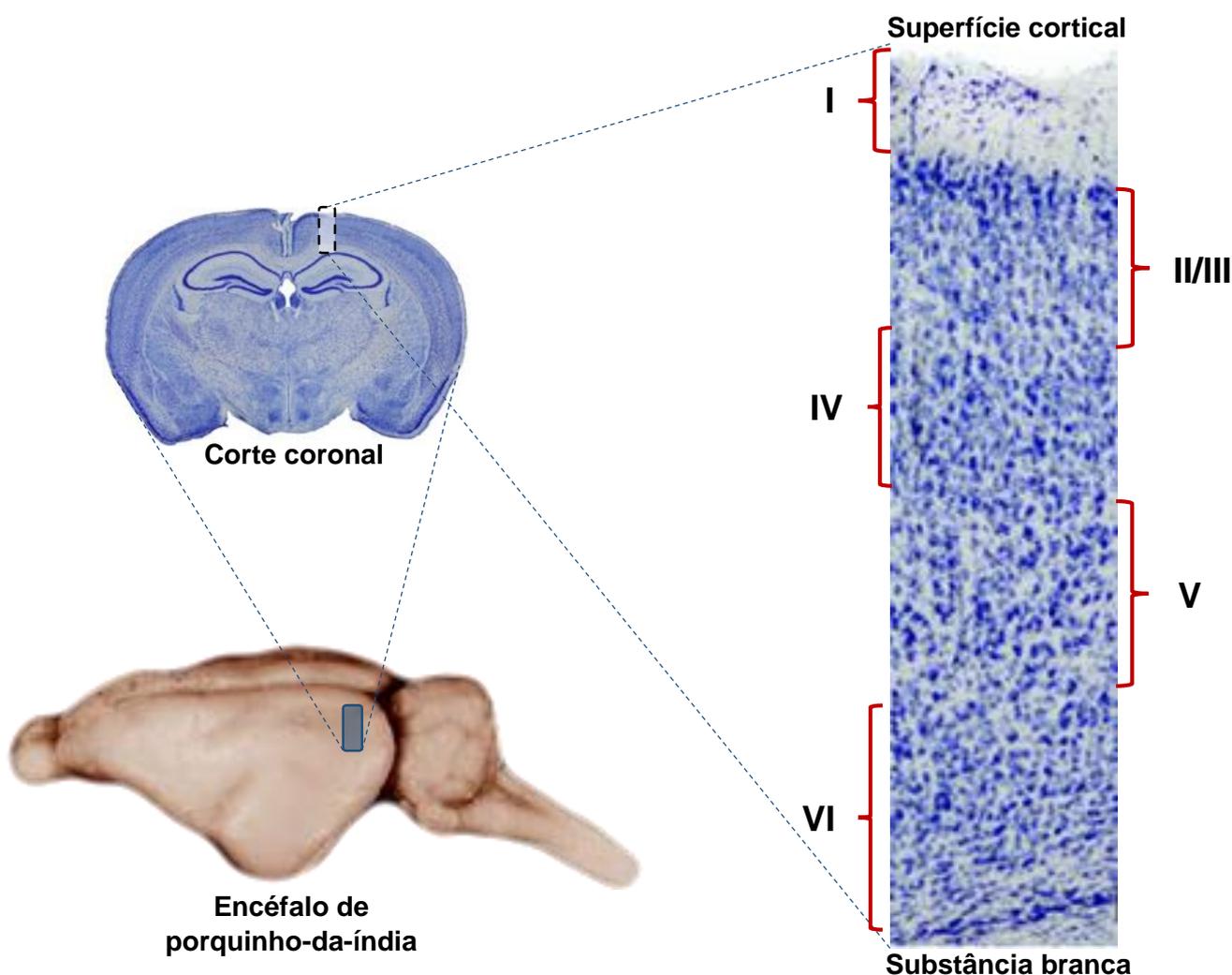


Figura 1. Ilustração mostrando os passos para a retirada do bloco cortical no plano coronal contendo a área visual primária. Notar a laminação onde a camada I possui população neuronal mais rarefeita.

A camada I foi inicialmente descrita por Magini (1888) em cérebros de fetos humanos e, posteriormente, mais investigada e detalhada por Martinotti (1890), Cajal (1891) e Retizius (1893). Esta camada também recebe o nome de camada plexiforme e tem como característica principal a baixa quantidade de neurônios e uma alta densidade de fibras nervosas (SPREAFICO et al., 1999; ZECEVIC e RAKIC, 2001; NOCTOR et al., 2002).

As pesquisas envolvendo a camada I ainda são tímidas, mas existem muito trabalhos importantes que demonstram o envolvimento dos neurônios locais nos sinais de atenção (ZHU e ZHU, 2004), aprendizado, memória, desenvolvimento e plasticidade neuronal (VOGT, 1991), a ação de interneurônios em neurônios das camadas mais profundas (LARKUM, 2013) e também descobertas de circuitos interneurais (JIANG et al., 2013) que até então eram desconhecidos. A morfologia dos neurônios da camada I ainda é pouco estudada tanto que nos estudos que avaliaram a morfologia desses neurônios não se chegou ainda a um consenso sobre as formas e funções desses neurônios, o que geralmente se encontra é uma população de neurônios altamente heterogênea pois a cada trabalho publicado há uma descrição peculiar dos neurônios encontrados.

Este estudo avaliou a morfologia dos neurônios da camada I do córtex visual de duas espécies de roedores: o porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) e o rato (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar. O porquinho-da-índia é um modelo animal muito estudado, utilizado em diversos segmentos da ciência, talvez por isso em inglês o termo *guinea pig* seja traduzido como “cobaia”. Apesar dessa espécie ser bem estudada, trabalhos na camada I desse animal são relativamente raros especialmente em relação à morfologia e eletrofisiologia dos neurônios dessa região cortical. Já no rato estudos sobre os neurônios da camada I são mais frequentes tanto em relação a morfologia quanto a eletrofisiologia.

A região do córtex visual foi escolhida por abranger uma grande área cortical o que permite um maior número de cortes coronais e aumenta as chances de que realmente se está nessa região. Além disso, avaliar esta região nas duas espécies escolhidas pode revelar diferenças nas características dos neurônios uma vez que estes roedores apresentam-se bem diferentes quanto a hábitos, o porquinho-da-índia é crepuscular e o rato noturno, por exemplo, e outra diferença já evidenciada entre essas espécies é o precoce desenvolvimento cortical do porquinho-da-índia quando comparado ao rato (SCHÜZ, 1986).

Para discriminar as possibilidades de diferenças na morfologia dos neurônios da camada I do córtex visual do porquinho-da-índia e do rato este estudo classificou esses neurônios de acordo com a trajetória de seus dendritos e analisou as medidas dendríticas utilizando a técnica de injeção intracelular de biocitina que permite a marcação dos neurônios e toda sua árvore dendrítica com nitidez. Após a classificação dos neurônios as comparações foram feitas entre os mesmos tipos celulares de cada roedor.

1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS NEURÔNIOS DO CÓRTEX CEREBRAL

No córtex cerebral, em relação a morfologia, encontramos dois tipos de neurônios: piramidais e não piramidais. Essa diferenciação é feita a partir da projeção do axônio, da forma do corpo celular, e da presença ou não de espinhas dendríticas. Os neurônios piramidais representam cerca de 80% da população neocortical, enquanto que os não-piramidais correspondem a aproximadamente 20% deles (ZHOU e HABLITZ, 1996a; MARKRAM et al., 2004).

As células piramidais podem ser encontradas da camada II a VI, se caracterizam por serem espinhosas com um grande dendrito apical que emerge e ascende verticalmente e se ramifica na camada I como se pode notar na Figura 2 que mostra um neurônio piramidal na camada III enviando seus processos até a camada I, bem como dendritos basais que se ramificam no plano horizontal e, eventualmente, podem ter seus ramos encontrados nesta camada. Seus axônios percorrem grandes distâncias e por isso são chamadas “células de projeção”, pois levam informação para áreas distantes ou até mesmo para o outro hemisfério. São células glutamatérgicas e, portanto, excitatórias (MARÍN-PADILLA, 1999; PARNAVELAS, 2000).

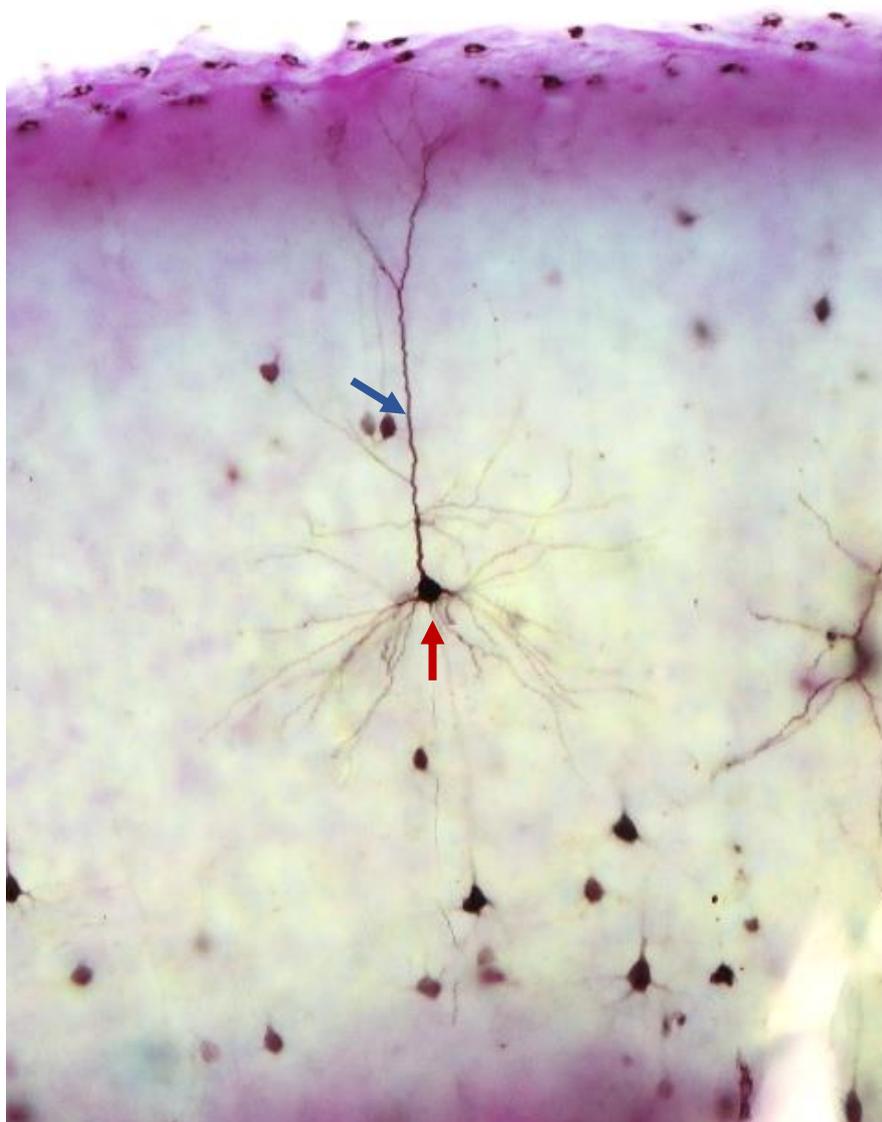


Figura 2. Célula piramidal encontrada no córtex visual do rato (seta vermelha) com seu dendrito apical se projetando até a camada I (seta azul). Aumento de 20x.

As não-piramidais, são células que podem ser encontradas em todas as camadas corticais, porém elas atuam de forma local, ou seja, não se expandem muito além de sua zona de origem. Os corpos celulares tem formatos variados e seus dendritos e axônios, são mais curtos como pode-se observar na Figura 2, salvo exceções nas quais encontramos seus axônios se projetando em várias camadas corticais. Em sua maioria possuem eferências inibitórias, tratando-se, portanto, de interneurônios cujo o principal neurotransmissor é o ácido γ -amino-butírico (GABA) (HESTRIN e ARMSTRONG, 1996; ZHOU e HABLITZ, 1996).

1.2 CARACTERÍSTICAS DOS NEURÔNIOS DA CAMADA I

Todos os neurônios da camada I são não-piramidais (BRADFORD, PARNAVELAS e LIEBERMAN, 1977; ZHU e ZHU, 2004). Até então, podemos classificar estes neurônios pelas características dendríticas, pelo perfil axonal, pelos dendritos do soma e por suas características eletrofisiológicas. Os primeiros esforços para classificar os neurônios da camada I iniciaram-se com Cajal em 1911 que identificou diversos neurônios como as células de Cajal-Retzius (CR) e as neurogliaformes as quais descreveu como “células teia de aranha” e “células anãs” (HESTRIN e ARMSTRONG, 1996). Tal classificação se dá pelas seguintes características: corpo celular pequeno, densa arborização axonal, cinco a seis dendritos primários lisos e curtos, restritos a camada I e se localizam da região medial da camada até a superfície pial.

Bradford, Parnavelas e Lieberman (1977), classificaram os neurônios da camada I como horizontais, verticais, não piramidais clássicos e células sem axônios. Nos horizontais os dendritos e axônios se estendem horizontalmente e paralelamente à superfície pial e se subclassificam em horizontais persistentes e horizontais fetais. As células horizontais persistentes estão presentes em toda a vida pós-natal (P) e, pode-se dizer, que algumas são células CR adultas por suas características semelhantes a este tipo celular. São bipolares, corpo celular fusiforme com dois dendritos primários que se estendem em sentidos opostos, podem ser espinhosas com ramos oblíquos ou verticais e seus axônios são horizontais.

As células horizontais fetais estão localizadas na metade superior da camada I e algumas vezes imediatamente sob a superfície pial. No momento do nascimento, tem largos corpos celulares, grossos dendritos com um grande número de apêndices e extensa rede axonal. Seu corpo celular tem formato triangular ou fusiforme. É bipolar e seu axônio e dendritos emergem de polos opostos no corpo celular e se organizam paralelamente à superfície cortical. Seus processos seguem em linha reta e os dendritos após percorrerem distâncias variáveis podem fazer uma curva acentuada e assumir cursos verticais. Seus dendritos são tortuosos e, por vezes, espinhosos com ramos finos que ascendem em direção à pia-máter. Os axônios se mantêm na camada I e podem fazer conexões com redes colaterais que também permanecem nesta camada.

As células verticais tem o corpo celular piramidal com a base da pirâmide voltada para a superfície cortical. Possui um grosso dendrito espinhoso que surge do ápice da pirâmide e se direciona para baixo e oblíqua ou perpendicularmente à superfície pial. O axônio surge do dendrito primário. Se localizam entre a região subpial até o meio da camada I, os ramos dendríticos são espinhosos e alguns se apresentam finos, pequenos, com espinhas e orientação horizontal.

As não-piramidais clássicas são semelhantes as encontradas em outras regiões do córtex, são arredondadas, ovoides, fusiformes e a orientação dos dendritos é altamente variável e estes possuem ou não espinhos. Já as células sem axônio são extremamente raras e foram encontradas na região superior da camada I, tem corpo celular elipsoide ou piramidal, com longos processos perpendiculares à superfície cortical. Seus dendritos são direcionados oblíqua ou perpendicularmente e apresentam algumas espinhas.

Zhou e Hablitz (1996 b, c) classificaram os neurônios da camada I a partir de suas propriedades eletrofisiológicas, estudando os potenciais de ação (PA) e as propriedades de disparos repetitivos dessas células em neocórtex de ratos jovens (P14-P21). Essa propriedade de disparos repetitivos é típica de interneurônios. Mediados por GABA, a sua função sináptica é, portanto, inibitória, e estes neurônios são chamados células *fast spiking* (FS), pela duração e, conseqüentemente, a frequência com que podem disparar PA mediante estimulação, o que as diferenciam das células piramidais que se classificam como células *regular spiking* (RS), por apresentarem PA com duração comparativamente mais longa. Um outro grupo de células com características piramidais, apresentam suas salvas de PA em rajadas agrupadas, ou trens de PA e por isso foram denominadas de *bursting*, maiores detalhes podem ser encontrados no trabalho de McCormick e Prince (1986). As células RS e *bursting*, são mediadas por glutamato ou aspartato e tem papel excitatório. Nos neurônios da camada I, foram encontradas células com pós-hiperpolarização rápida (fAHP¹), algumas com pós-hiperpolarização média (mAHP) e pós-despolarização lenta (SADP²). Outra característica marcante é a pouca ou nenhuma adaptação de frequência durante aplicação de pulsos de corrente prolongados, o que infere uma capacidade de converter sinais de entrada e de saída em um amplo espectro dinâmico.

¹ Do inglês: *fast afterhyperpolarization*

² Do inglês: *slow afterdepolarization*

Hestrin e Armstrong em 1996, também investigaram a morfologia e fisiologia de neurônios da camada I de ratos. Encontraram neurônios diversos e os classificaram em três categorias: neurogliaformes, multipolar com axônio descendente e células de CR. Em seus achados, encontraram outros neurônios que não foram classificados por não se enquadrarem em nenhum dos padrões estabelecidos. As neurogliaformes, conforme já descrita nos trabalhos de Cajal (1911), tem densa arborização axonal, cinco ou seis dendritos primários lisos e curtos, e que são restritos à camada I. Seu corpo celular é pequeno e se localizam entre o meio e a parte superior da camada. Já as células multipolares com axônio descendente se assemelham às neurogliaformes, com corpo celular pequeno e estão localizadas na região do meio para baixo, possuem quatro ou cinco dendritos primários com ramificação espaçada e podem ter espinhas. A maioria desses dendritos se estendem da parte superior para a inferior e tem algumas projeções para a parte superior da camada I. As porções distais são mais finas e possuem dendritos secundários e terciários. Seu axônio emerge do corpo celular ou do dendrito primário. Em relação as características morfológicas das células de CR temos uma orientação horizontal com um ou três processos primários, corpo celular ovoide e localiza-se na metade superior da camada I.

A forma de classificar os neurônios GABAérgicos de uma forma geral tem sido debatida desde 2008 por um grupo de pesquisadores (*The Petilla Interneuron Nomenclature Group – PING*) que se esforçam para organizar as terminologias para esse conjunto de neurônios abundantes na camada I (ASCOLI et al., 2008). Esta dificuldade em classifica-los morfofisiologicamente se deve a heterogeneidade dessa população neuronal.

A classificação morfológica utilizada neste estudo será de acordo com a trajetória dendrítica apresentada pelas células e estão definidas segundo Santos et al. (2012) da seguinte forma: células horizontais, radiais, ascendentes e descendentes. Serão classificadas como células horizontais as que apresentarem projeções dendríticas dispostas, em sua maioria, de forma horizontal em relação ao corpo celular ilustrada na Figura 3A. Em relação as ascendentes suas projeções dendríticas são voltadas para cima do corpo celular como pode ser vista no exemplo da Figura 3B, o inverso é observado nas descendentes semelhante ao desenho da Figura 4A. As radiais, por sua vez, tem seus dendritos projetados em todas as direções como mostrado na Figura 4B.

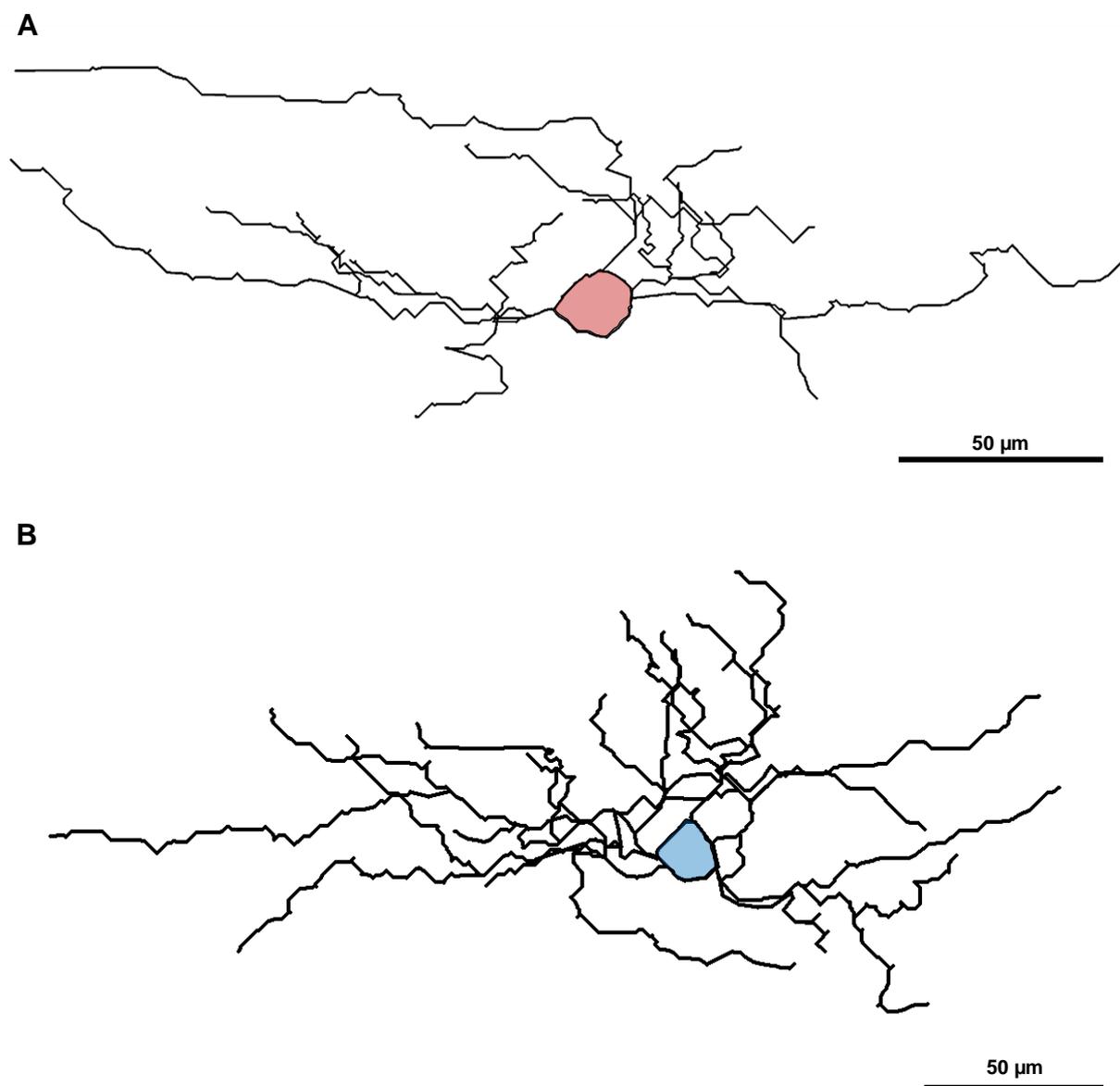


Figura 3. Desenhos de células encontradas na camada I do córtex visual dos roedores classificadas como horizontal (A) e ascendente (B). A célula horizontal (A) tem a maioria de seus dendritos surgindo em polos opostos do seu corpo celular (em vermelho) e em trajetória horizontal. A célula ascendente (B) tem a maioria de seus dendritos projetados para cima do seu corpo celular (em azul). Aumento de 40x.

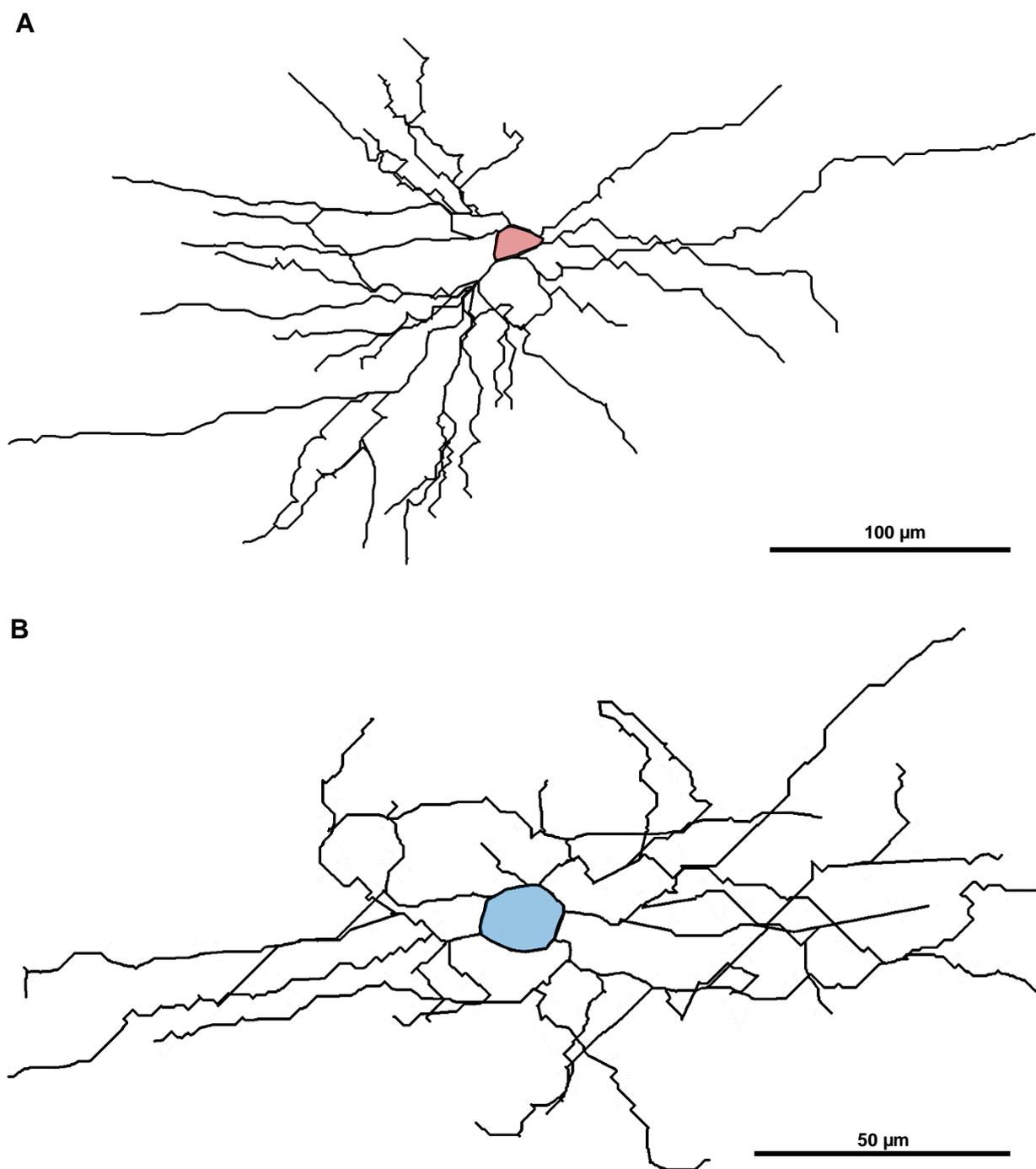


Figura 4. Desenhos de células encontradas na camada I do córtex visual dos roedores classificadas como descendentes (A) e radiais (B). A células descendente (A) tem a maioria dos seus dendritos projetados para baixo do seu corpo celular (em vermelho). A célula radial (B) tem os seus dendritos projetados para todos os lados a partir do seu corpo celular (em azul). Aumento de 20x e 40x respectivamente.

1.3 DESENVOLVIMENTO CORTICAL DO RATO

O córtex cerebral dos mamíferos durante a fase de desenvolvimento passa por várias etapas de proliferação, diferenciação e maturação celular (TVEDEN-NYBORG et al., 2012). O estabelecimento da laminação cortical, se dá pela migração de um grande número de células pós-mitóticas para as suas posições definitivas (JÍMENEZ et al., 2003) e também pelas sinapses que começam a se estabelecer entre essas células. Essa laminação é ascendente, ou seja, as camadas mais profundas são as primeiras a se formar e esse processo de migração radial, conhecido como *inside-out* (FROTSCHER, 1997; MARÍN-PADILLA, 1998), é gerenciado pelo menos em parte por algumas proteínas, dentre elas a glicoproteína relina (FROTSCHER, 1998; ZECEVIC e RAKIC, 2001) que é secretada pelas células de CR. Existem pelo menos dois tipos relina e, segundo Rakic e Zecevic, 2003 e Bielle et al. (2005), elas podem estar envolvidas na determinação das rotas de migração, destino e expressão dos marcadores moleculares das CR, sugerindo que os tipos de relina secretada pelas CR, presentes em diferentes territórios no desenvolvimento do córtex, determinam as especificidades de cada região.

As células de CR são consideradas neurônios pioneiros, são abundantes na fase embrionária (E), especialmente nos primeiros estágios da neocorticogênese (E12) (RADINIKOW et al. 2002). Em roedores, por exemplo, são frequentes principalmente na zona marginal e, posteriormente, na camada I, entretanto, se fazem mais raras a partir do fim da migração neuronal e tendem a desaparecer ou tornarem-se extremamente escassas em torno da segunda semana pós-natal (MIENVILLE, 1999). Acredita-se que isto ocorre por morte celular ou então que elas se diferenciam em outras células (ZECEVIC e RAKIC, 2001). O fato é que em adultos elas são extremamente raras, na literatura a ocorrência de CR em adultos tem sido reportada em alguns trabalhos (CONDÉ et al., 1994; MARTÍNEZ-GARCIA et al., 1994; MARÍN-PADILLA, 1998; SPREAFICO et al., 1999).

No rato, o período de formação das camadas corticais é breve e em seis dias após o nascimento (P6) elas já estão completamente definidas. No córtex visual do rato, por exemplo, em P0 observa-se apenas a subplaca, zona marginal e a placa cortical com um desenho inicial de formação das camadas V e VI (SARNAT e FLORES-SARNAT, 2002). Dois dias após, o processo avança para formar a camada

IV e em quatro dias a camada III, incluindo a camada I que surge pela transformação da zona marginal e que diferentemente das outras camadas o seu processo de laminação é tangencial (DA SILVA FILHO, 1999; SANTOS, 2006).

1.4 DESENVOLVIMENTO CORTICAL DO PORQUINHO-DA-ÍNDIA

No porquinho-da-índia a laminação é muito precoce quando comparada ao rato e os principais eventos do desenvolvimento cortical ocorrem antes dos 48 dias de vida embrionária (E). A configuração das 6 camadas corticais já ocorre em E41. Há maturação dos nucléolos neuronais entre E40-E45. Os olhos se abrem em E46 e até E48 já se observa atividade elétrica no córtex, a qual torna-se contínua a partir de E55. Após o nascimento, em aproximadamente P7 o cérebro deste mamífero já apresenta características do animal adulto (PETERS e BADMAN, 1963; DOBBING e SANDS, 1970).

Um estudo realizado por Schüz em 1981a, b e 1986 avaliou o desenvolvimento cortical pré e pós natal de porquinhos-da-índia, e demonstrou que a maioria das sinapses e espinhas dendríticas já estão desenvolvidas antes do nascimento desse animal quando comparou a densidade de espinhas dendríticas do terço superior de córtex pré-natais com córtex de porquinhos-da-índia adultos e não encontrou diferença significativa entre elas. Outro estudo realizado por Dobbing e Sands (1970), demonstrou a precocidade do desenvolvimento cortical desse mamífero, bem como sua alta maturidade neurológica ao nascer. Esse desenvolvimento precoce das camadas corticais talvez imprimam diferenças nas características morfológicas de seus neurônios.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar os aspectos morfológicos dos tipos celulares da camada I do córtex visual entre os roedores *Cavia porcellus* e *Rattus norvegicus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diferenciar os tipos celulares da camada I do córtex visual entre duas espécies de roedores através da análise das seguintes medidas dendríticas: quantidade de dendritos, comprimento dendrítico total e médio, área do campo receptor dendrítico, área total do corpo celular, distância entre os neurônios e a pia-máter e análise da distribuição de Sholl;
- Avaliar as possíveis diferenças entre as propriedades morfométricas dos neurônios da camada I de cada espécie.

3 MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 35 porquinhos-da-índia da variedade *Dunkin-Hartley* de pêlo curto (pigmentados e tricolores) de ambos os sexos com idades de 4 a 5 dias de vida pós-natal (P4-P5), provenientes do Biotério do *Neurobiology Research Center* da Universidade do Alabama em Birmingham. Quanto aos ratos, foram utilizados 30 ratos da variedade Wistar, de ambos os sexos com idades de 14 a 21 dias de vida pós-natal (P14-P21), provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas e a utilização desses animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará. Todo o manuseio de animais seguiram o Guia para Cuidados e Uso de Animais para Laboratório do *National Institute of Health (NIH Publications No. 80-23, revised 1996)*. Os resultados dos experimentos realizados nos ratos foram cedidos pelo Laboratório de Biofísica Celular provenientes de um estudo realizado em 2006.

3.2 HISTOLOGIA E ESTEREOLOGIA

3.2.1 Preparo das fatias e identificação de neurônios da camada I

Os porquinhos-da-índia foram anestesiados em um frasco desumidificador contendo 40 ml de éter etílico depositado sobre uma camada de gel de sílica (Silica gels, Sigma®) com aproximadamente 2 cm de espessura para aumentar a superfície de evaporação do anestésico. Os ratos, por sua vez, foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de Ketamina (Vetanarcol) 0,1 mg/g mais Xilazina (Kensol) 0,01 mg/g. Após profundamente anestesiados, os animais foram em seguida decapitados, sua caixa craniana aberta e seus cérebros rapidamente removidos e imersos em líquido cérebro-espinhal artificial (LCEA), pH 7,4, a 4 °C. Os hemisférios cerebrais foram separados e, com o auxílio do vibrátomo modelo Pelco 101 (EUA), realizamos, em média, seis cortes coronais com 250 µm de espessura na área visual do porquinho-da-índia e do rato ambas localizadas no lobo occipital conforme

exemplificado na Figura 5 e descrito por Choudhury (1978) e Wree, Zilles e Schleicher (1981). As fatias foram mantidas por 1 hora em cuba contendo LCEA oxigenado com fluxo contínuo da mistura dos gases O_2 a 95% e CO_2 a 5% em temperatura ambiente ($23^\circ C$). Em seguida, cada fatia foi levada à cuba de injeção intracelular (Figura 7B) adaptada no microscópio Zeiss Axioskop FS2 (Alemanha) mantendo fluxo contínuo de LCEA, pH 7,4, de aproximadamente 4 ml/min. A solução de LCEA utilizada continha NaCl 125 mM, KCl 3.5 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1.3 mM, $NaHCO_3$ 26 mM e D-glicose 10 mM.

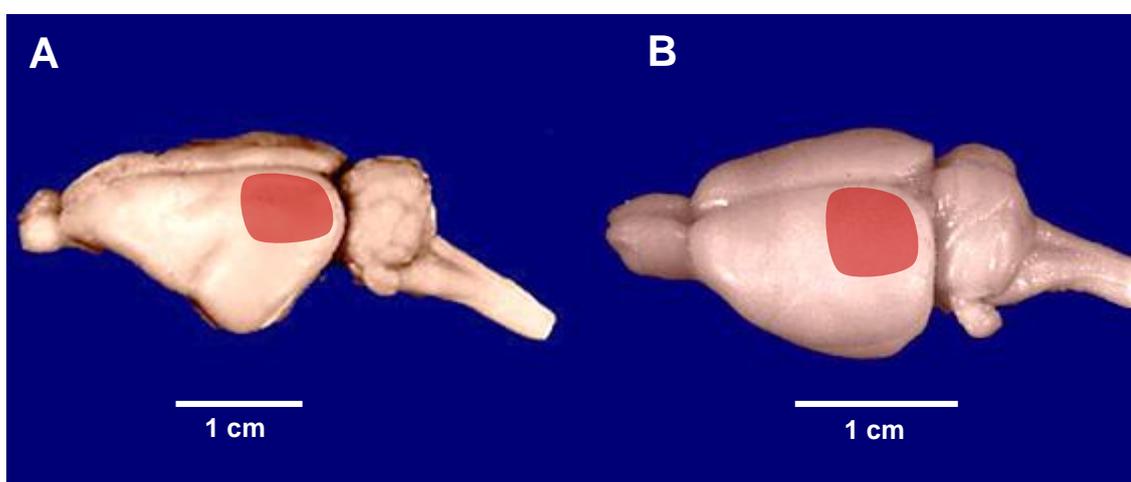


Figura 5. Fotografia em perspectiva dos encéfalos do porquinho-da-índia (A) e do rato (B). As áreas em vermelho correspondem as áreas visuais das duas espécies.

Para visualização dos neurônios da camada I utilizou-se ótica de contraste interferencial diferencial (Nomarski) com objetiva de imersão em água no aumento de 40x, mantendo 3,3 mm como distância de trabalho. A área de análise da camada I foi definida considerando toda a extensão entre a superfície pial e a borda superior da camada II exemplificado na Figura 6.

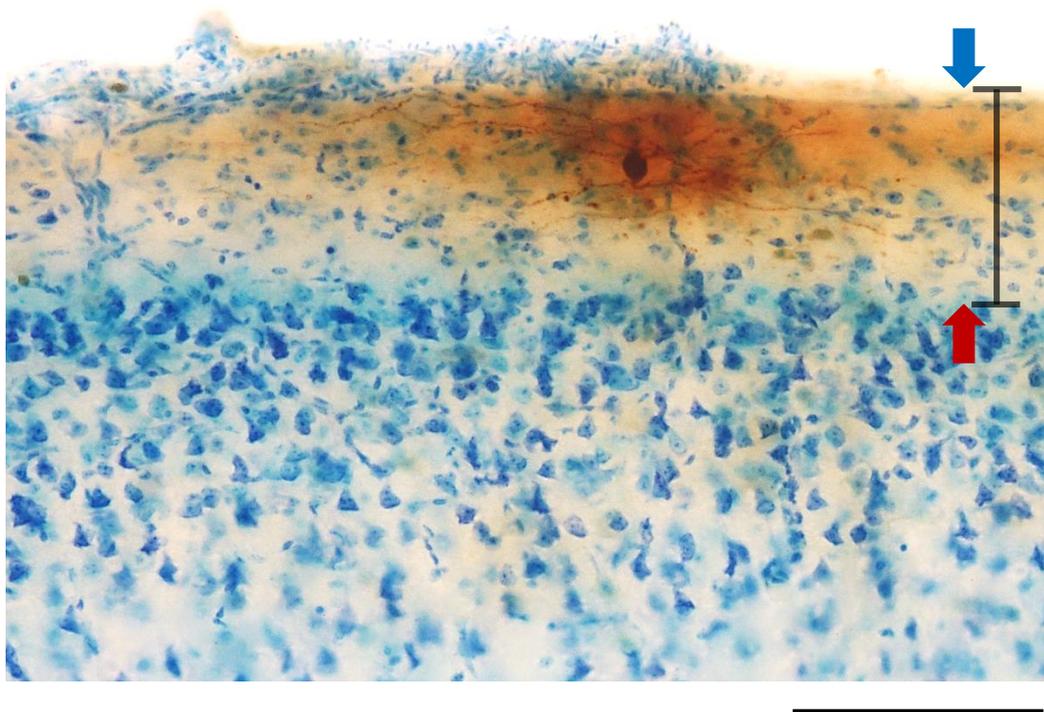


Figura 6. Área de análise representada pela barra vertical (90 μm) que abrange toda a extensão entre a superfície pial (seta azul) e a borda superior da camada II (seta vermelha) do córtex visual do porquinho-da-índia. Barra horizontal = 100 μm . Aumento de 20x.

3.2.2 Marcação de neurônios através da técnica de biocitina

Os neurônios da camada I foram marcados através da injeção intracelular de biocitina a 0,5% (Sigma®) adicionada a solução de enchimento da micropipeta (Figura 7) conforme a metodologia de Horikawa e Armstrong (1988) e Kawaguchi (1993). Para isso as células foram mantidas à -65 mV durante 10 minutos a fim de aumentar o transporte de biocitina. Após as injeções, as fatias foram fixadas num período de 24 horas a uma temperatura de 4 °C em solução contendo: tampão salina fosfato 0,1 M pH 7,4 e paraformaldeído 4%. No dia seguinte, as fatias foram lavadas em tampão sódio fosfato 0,1 M, pH 7,4 e tratadas em H_2O_2 a 1% por 2 a 3 horas. Em seguida foram incubadas durante 12 horas em soro de bloqueio contendo soro bovino 2%, albumina de soro bovino 1% e Triton X-100 0,4%. Após lavagem, as fatias foram incubadas em um complexo de avidina-biotina-peroxidase (Vectastain Elite ABC kit, 1:100, Vector Laboratories, USA) em soro de albumina 1% por 4 h. As fatias foram lavadas e coradas com 3,3-diaminobenzidina 0,05%, montadas em lâminas de vidro

revestidas com gelatina, desidratadas em álcool e cobertas com lamínula. Utilizou-se a técnica de Nissl para contracoloração e melhor diferenciação das camadas corticais.

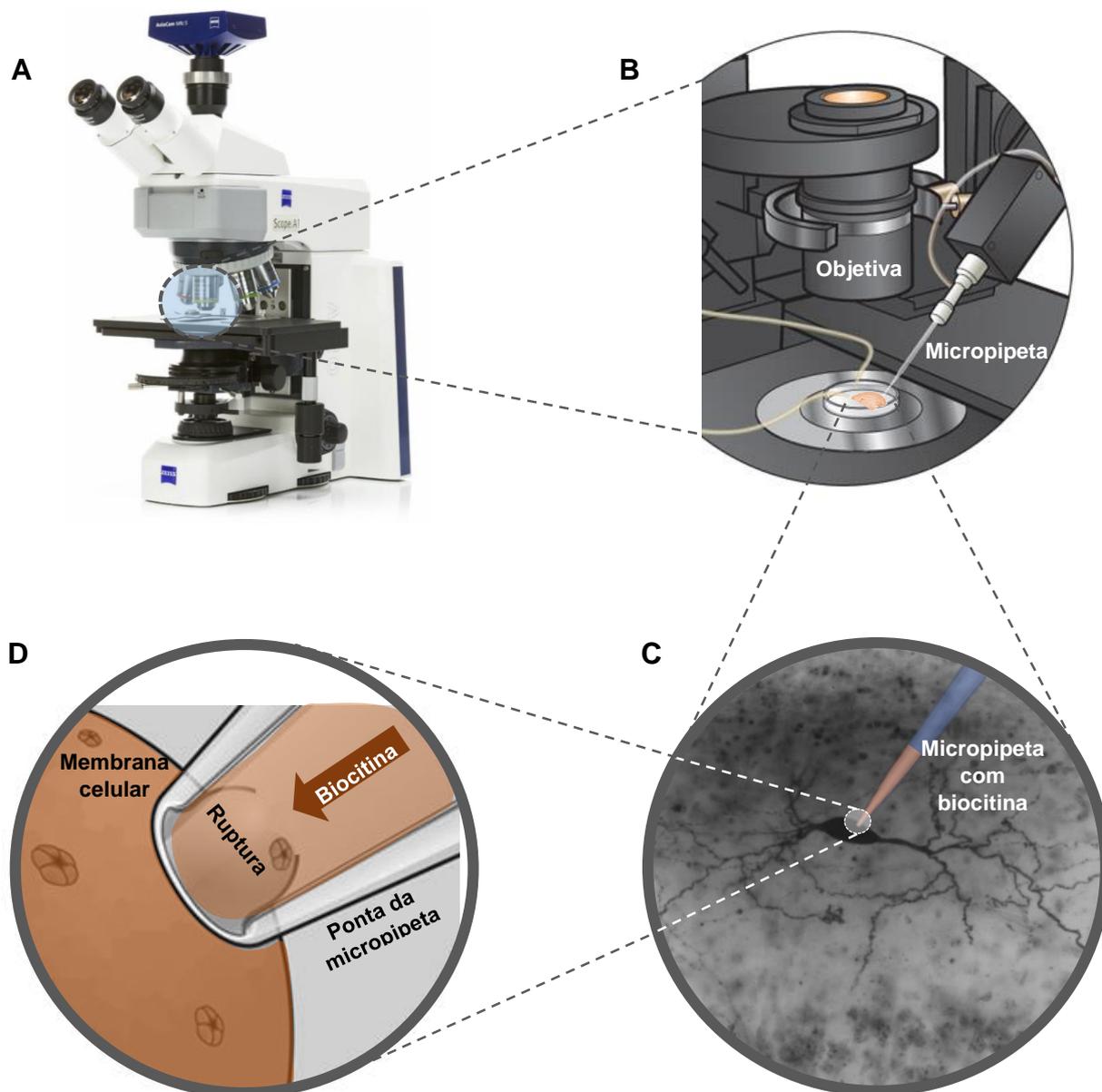


Figura 7. Desenho esquemático da técnica de injeção intracelular de biocitina. As fatias são levadas à cuba de injeção intracelular adaptada ao microscópio (A e B). Ao localizar a célula na camada I (C), a micropipeta é posicionada sobre o corpo celular e em contato com a membrana a ponta da micropipeta faz uma sucção com posterior ruptura da membrana e a biocitina foi injetada fixando o potencial do neurônio em -65 mV (D).

As micropipetas utilizadas para realização da técnica foram fabricadas a partir de tubos capilares de silicato de boro modelo TW 150-4 (WPI Inc. USA) e nas etapas de fabricação foram tomadas todas as precauções de higienização e manuseio sem contato direto com as mãos de forma a não contaminar e comprometer o processo de

puxamento do tubo, garantindo assim, micropipetas com pontas de aproximadamente 1 μm de diâmetro de acordo com os padrões estabelecidos na literatura. Utilizou-se um puxador horizontal modelo P-97 (Sutter Instruments Inc. USA) e as pontas das micropipetas foram vistoriadas em microscópio Olympus CH30 (Japão) contendo uma escala com resolução de 10 μm , e foram excluídas pontas fora do padrão e com irregularidades nas bordas.

3.3 TRATAMENTO DAS IMAGENS E MORFOMETRIA

As fotografias dos neurônios marcados foram realizadas no microscópio Nikon Eclipse 80i com o auxílio da câmera Nikon DS-Fi1c e as imagens foram capturadas em diferentes planos de secções ópticas com intervalo de 2 μm entre elas. Para a fusão dos planos fotografados utilizamos o aplicativo de edição de imagens Helicon Focus (HeliconSoft) e para as reconstruções e análises morfométricas utilizamos o *plugin* NeuronJ do programa de edição de imagens ImageJ.

Foram analisadas as seguintes medidas dendríticas: quantidade de dendritos, comprimento dendrítico total (soma dos comprimentos de todos os dendritos), comprimento dendrítico médio, área do campo receptor dendrítico, área do corpo celular neuronal e distância da pia-máter que podem ser melhor compreendidas observando a Figura 8, e análise da distribuição de Sholl.

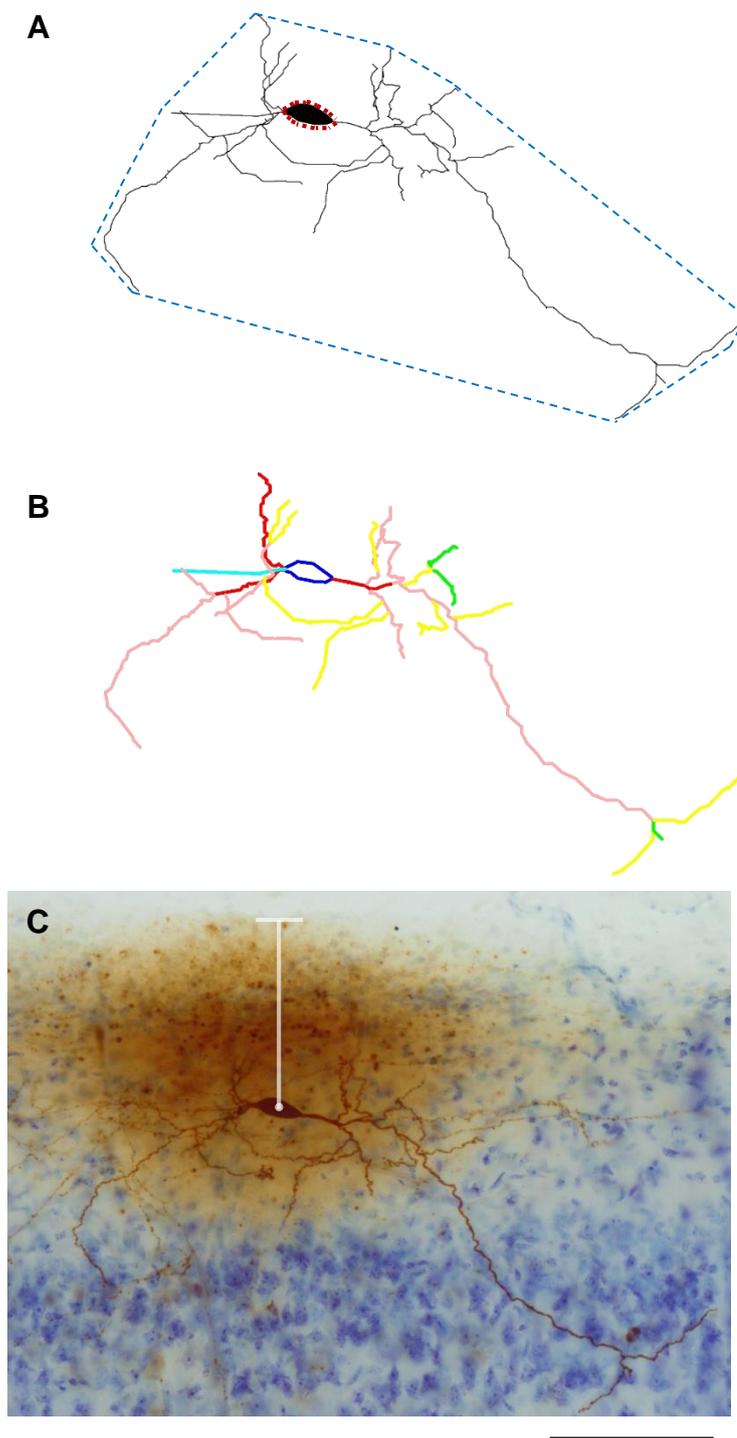


Figura 8. Desenho esquemático da metodologia aplicada nas análises das medidas dendríticas em neurônio horizontal. Os pontilhados azuis indicam a área do campo receptor dendrítico e os pontilhados vermelhos indicam a área total do corpo celular em A. Em B cada traço colorido representa um tipo de dendrito (primário a quaternário) o comprimento de cada traço foi medido e somado resultando na comprimento dendrítico total, e a média dessa soma resulta no comprimento dendrítico médio. A distância da pia-máter é medida traçando uma reta do centro do corpo celular até a altura da superfície pial como ilustrado na barra branca em C. Barra = 100 μm . Aumento de 20x.

A análise de Sholl consiste na contagem do número de interseções a partir de círculos concêntricos que partem do corpo celular distribuídos em intervalos de 10 μm em relação ao círculo anterior se distanciando do corpo celular, o que nos permite identificar o padrão de arborização dendrítica do neurônio, exemplificado na Figura 9. De forma a incluir todas as possíveis interseções, realizou-se a análise considerando 50 intervalos que vão de 10 a 500 μm de distância do corpo celular.

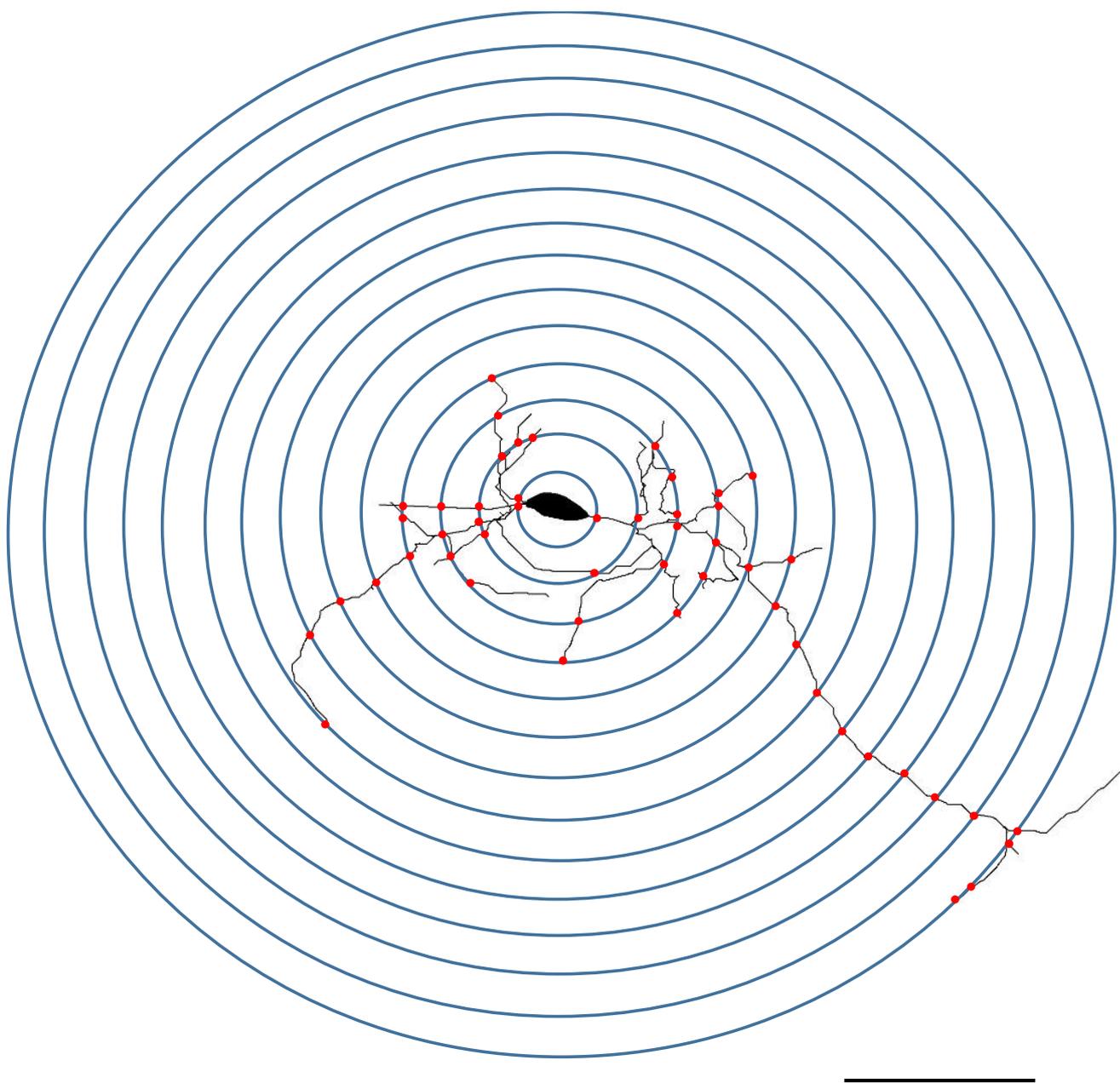


Figura 9. Desenho esquemático da metodologia da análise de distribuição de Sholl em um neurônio horizontal. Os círculos azuis são 20 μm maiores em relação ao seu antecessor. Os pontos vermelhos representam as interseções que as ramificações dendríticas fazem em cada intervalo e este resultado é plotado em função do número de interseções e a distância do centro do corpo celular. Barra = 100 μm . Aumento de 20x.

3.4 CLASSIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS DA CAMADA I

Os tipos celulares encontrados foram classificados de acordo com a trajetória dendrítica, seguindo a metodologia de Santos et al. (2012) e se diferenciam em: horizontais, ascendentes, descendentes e radiais. Classificou-se como células horizontais as que apresentaram projeções dendríticas dispostas, em sua maioria, de forma horizontal em relação ao corpo celular. As radiais, por sua vez, tem seus dendritos projetados em todas as direções. Em relação as ascendentes suas projeções dendríticas são voltadas para cima do corpo celular, o inverso é observado nas descendentes conforme já visto nas Figuras 3 e 4 das páginas 19 e 20 deste documento.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a classificação dos tipos celulares encontrados na camada I do córtex visual de cada roedor, aplicamos o teste t de *Student* para amostras independentes, adequado para o número de amostras desse estudo onde comparou-se as variáveis encontradas em cada tipo neuronal das espécies estudadas.

4 RESULTADOS

Nesse estudo foram marcadas através da técnica de injeção intracelular de biocitina 29 neurônios na camada I do córtex visual de porquinhos-da-índia e 37 neurônios na camada I do córtex visual do rato. O número reduzido de células marcadas ocorre pela tradicional baixa taxa de sucesso da técnica aplicada, que se justifica pela morte de muitas células após a retirada da micropipeta do corpo celular.

Na camada I do porquinho-da-índia 27,6% das células eram do tipo horizontal semelhante a ocorrência em ratos que foi de 27,1%. Esse tipo celular apresentou corpos celulares fusiformes e arredondados, os dendritos em sua maioria distribuídos em polos opostos do corpo celular de forma horizontal e paralelos à superfície pial como observado na Figura 10 que mostra células horizontais encontradas na camada I de porquinho-da-índia (A) e rato (B).

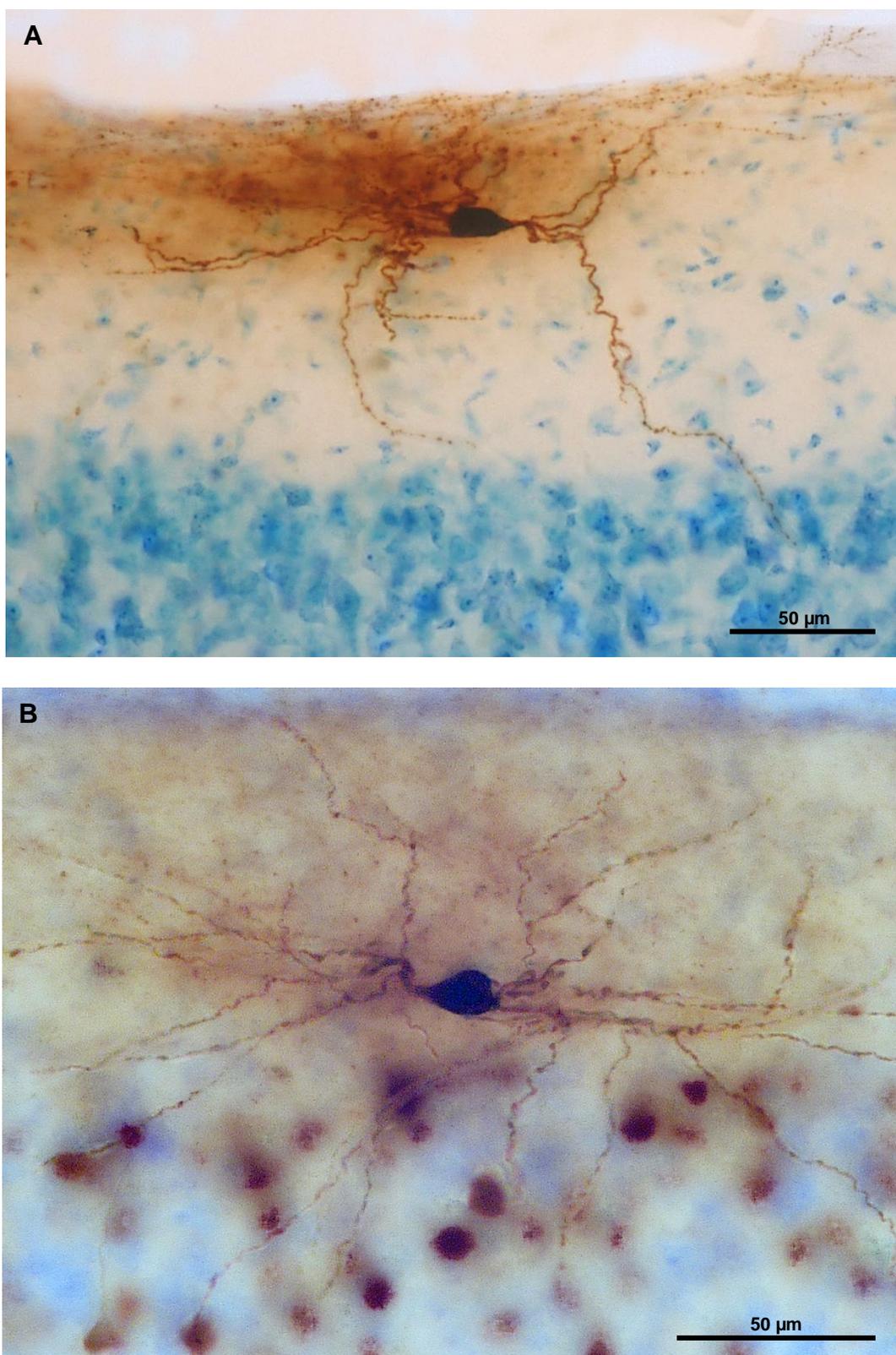


Figura 10. Células do tipo horizontal encontradas na camada I do córtex visual de porquinho-da-índia (A) e rato (B). Aumento de 40x.

No porquinho-da-índia 31% das células foram classificadas como ascendentes e no rato 24,3%. A maioria dessas células apresentaram corpos celulares arredondados, elipsoides e alguns triangulares, grande parte dos seus dendritos se projetam em direção à superfície pial como nota-se na Figura 11.

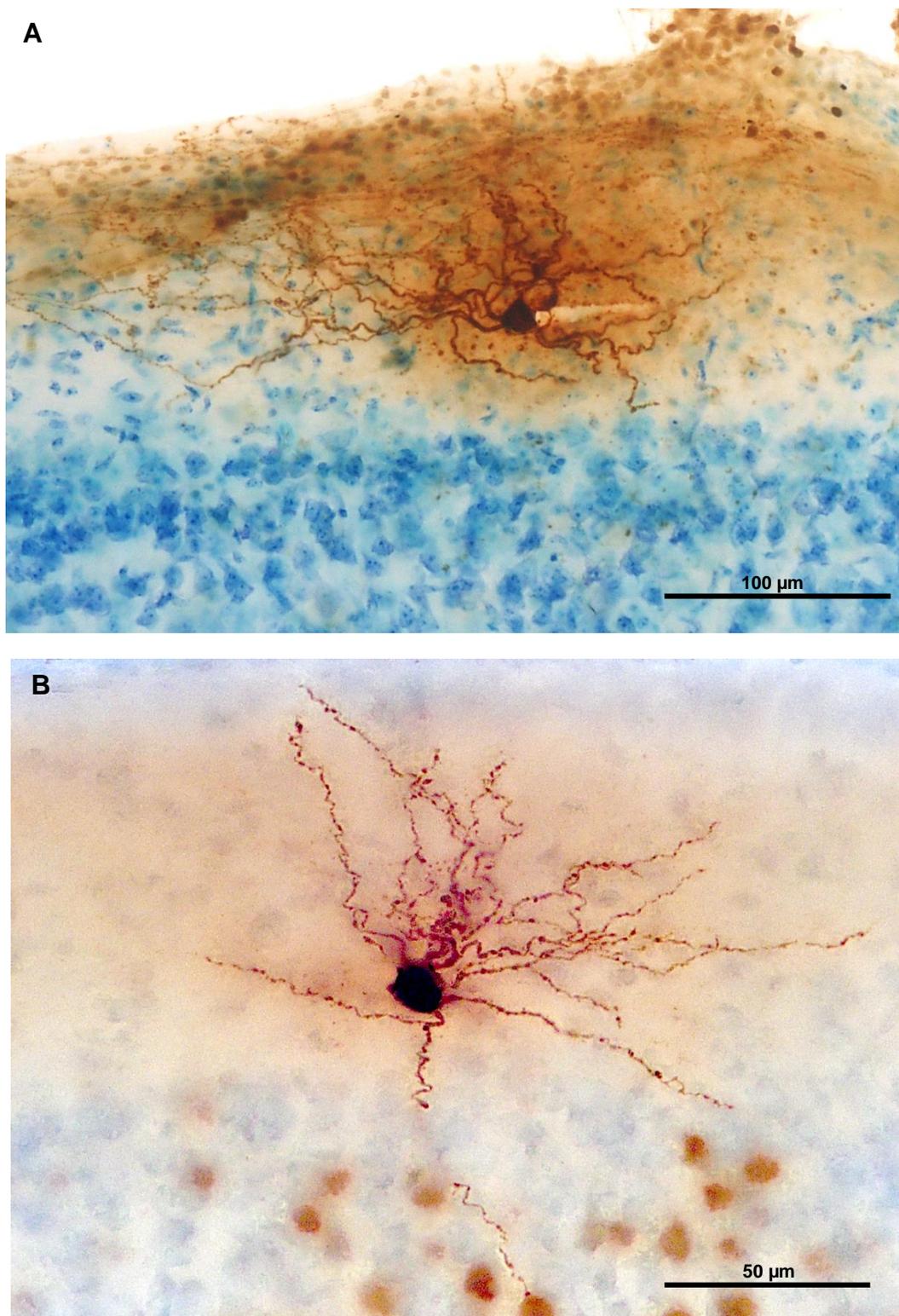


Figura 11. Células do tipo ascendente encontradas na camada I do córtex visual do porquinho-da-índia (A) e do rato (B). Aumento de 20x e 40x respectivamente.

As células descendentes representaram 13,8% das células encontradas na camada I do porquinho-da-índia e 16,2% das encontradas no rato. Essas células apresentaram um corpo celular fusiforme ou piramidal, dentre as que apresentavam corpo celular em forma de pirâmide, a base estava voltada para a superfície cortical e do ápice emerge um dendrito grosso se projetando para baixo de forma oblíqua ou perpendicular ao corpo celular, deste dendrito apical saem várias ramificações laterais apresentando ou não espinhas. Algumas dessas células no rato estavam localizadas imediatamente abaixo da superfície pial, já no porquinho-da-índia não foram encontradas células descendentes com essa característica. Na Figura 12A pode-se notar uma célula descendente com dendritos espinhosos encontrada na camada I do porquinho-da-índia, já na Figura 12B uma célula descendente encontrada no rato localizada imediatamente abaixo da superfície pial.

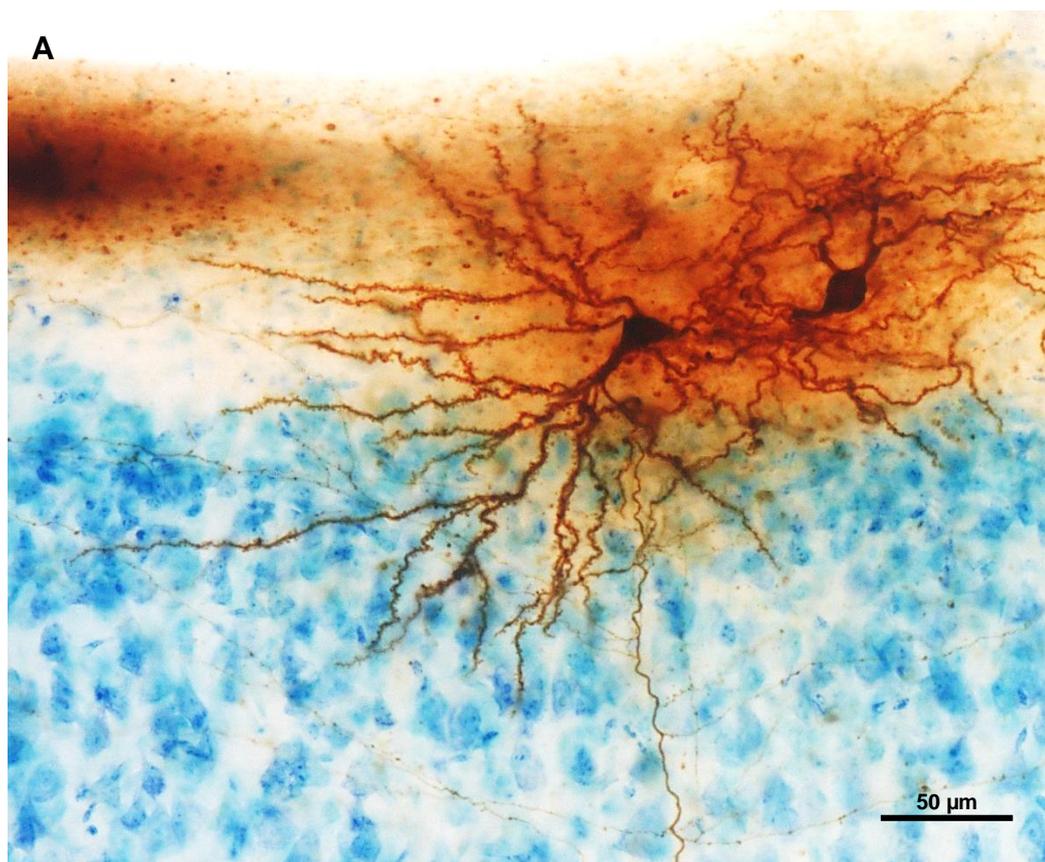


Figura 12. Células do tipo descendente encontradas na camada I do córtex visual de porquinho-da-índia (A) e rato (B). Aumento de 40x.

As células radiais representaram 27,6% das células encontradas na camada I do porquinho-da-índia e 32,4% das células da camada I do rato. Os corpos celulares desse tipo neuronal apresentaram formatos diversos, muitos dendritos projetados em todas as direções e algumas células apresentaram uma densa arborização axonal. A Figura 13A mostra uma célula radial encontrada na camada I do córtex visual do porquinho-da-índia que apresenta dendritos projetados em todas as direções e com uma densa arborização axonal, Cajal (1988) e Hestrin e Armstrong (1996) descrevem em seus estudos células chamadas neurogliaformes que tem características muito semelhantes a desta figura: pequeno corpo celular, cinco a seis dendritos primários curtos e lisos, além da densa arborização axonal. Já a Figura 13B mostra uma célula radial encontrada na camada I do rato, com corpo celular mais arredondado e dendritos primários projetados em todas as direções.

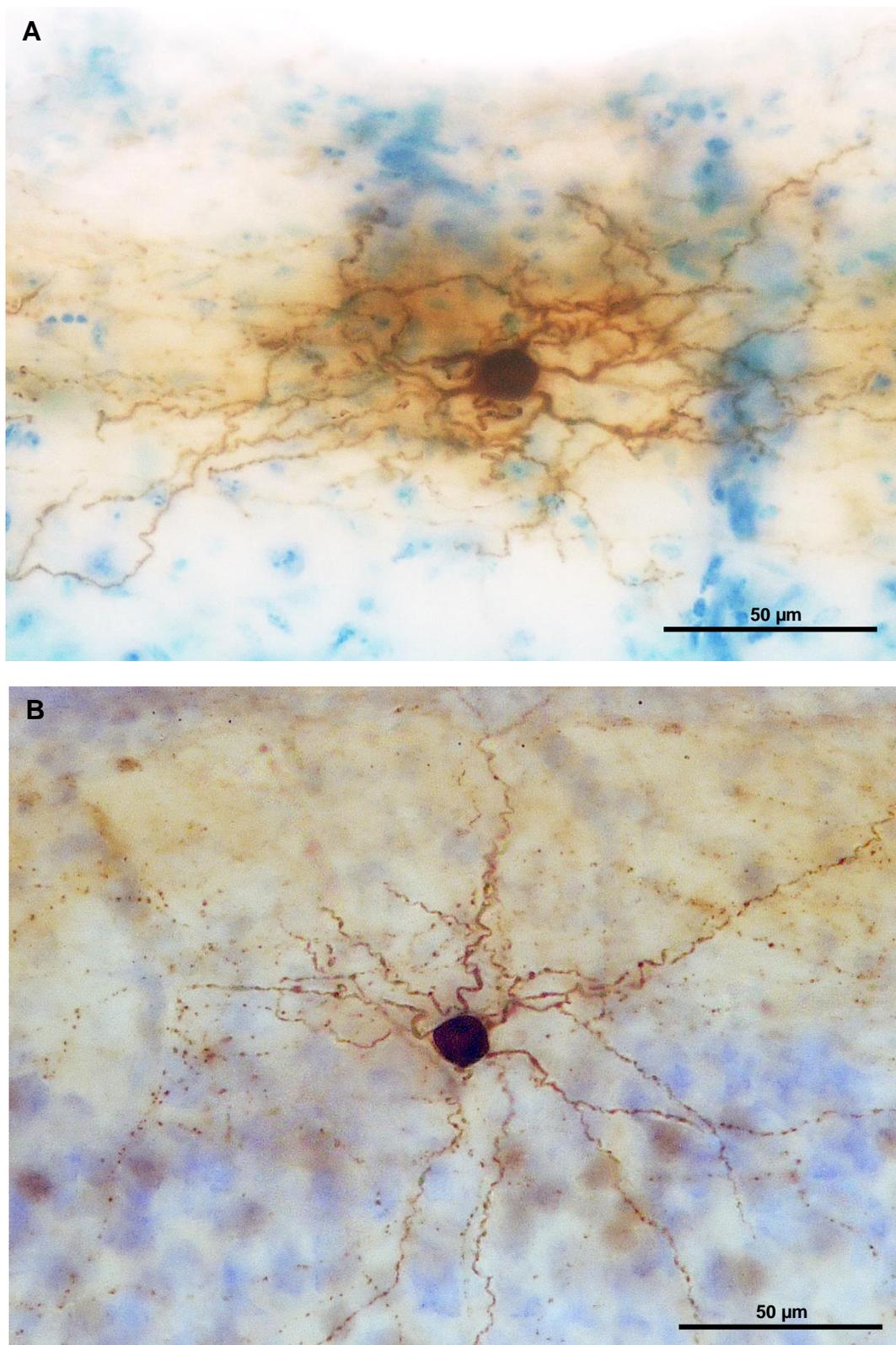


Figura 13. Células do tipo radial encontradas na camada I do córtex visual de porquinho-da-índia (A) e rato (B). Aumento de 40x.

A espessura da camada I do córtex visual das duas espécies foi aferida de modo a avaliar se existem diferenças que possam comprometer os resultados relacionados, por exemplo, à distância da pia-máter e também para compor o conjunto de dados encontrados nessa região cortical. Não houve diferença entre a espessura das camadas que se mostram bem semelhantes.

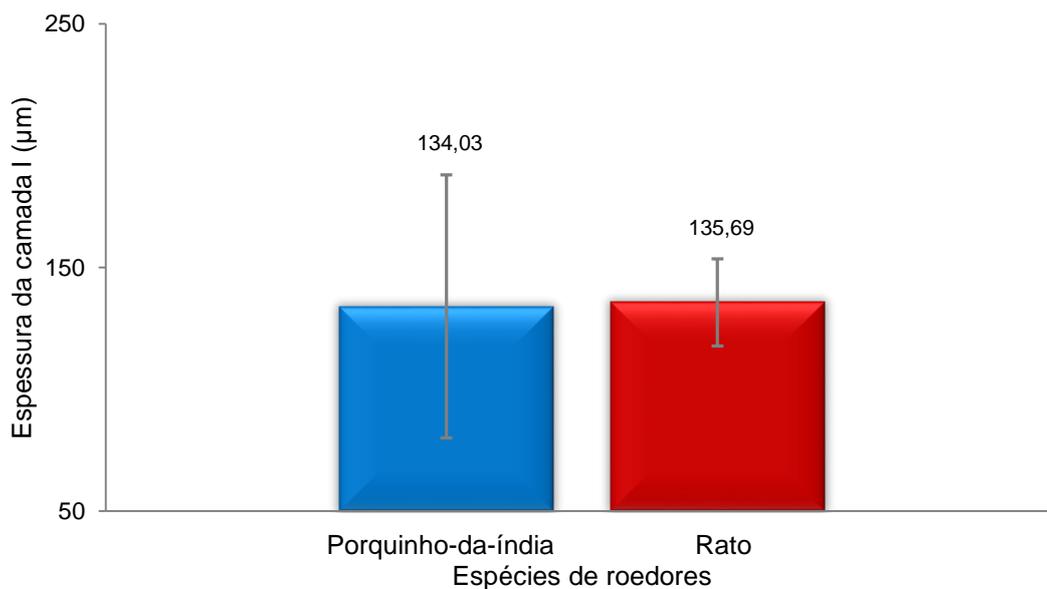


Figura 14. A espessura da camada I do córtex visual do porquinho-da-índia e do rato apresentou resultados muito semelhantes entre as duas espécies de roedores.

Foram encontradas diferenças significativas em todos os parâmetros avaliados entre os dois roedores em um ou mais tipos celulares. A Tabela 1 mostra o resumo dos resultados encontrados ao avaliar as propriedades morfométricas em cada espécie e nos tipos celulares detectados com as médias e respectivos desvios-padrão para cada morfotipo bem como os valores de p que foram considerados significativos sempre que $\leq 0,05$.

Tabela 1 Resumo das propriedades morfométricas dos tipos celulares encontrados na camada I do córtex visual de porquinho-da-índia e rato

Parâmetro	Horizontal (H)		Ascendente (A)		Descendente (D)		Radial (R)		Valor de <i>p</i>			
	Porquinho-da-índia N = 8	Rato N = 10	Porquinho-da-índia N = 9	Rato N = 9	Porquinho-da-índia N = 4	Rato N = 6	Porquinho-da-índia N = 8	Rato N = 12	H	A	D	R
Dendritos (unidades)	18,75 ± 3,62	18,2 ± 9,03	24,67 ± 9,53	20,33 ± 9,6	33,25 ± 16,5	17,67 ± 11,64	25,13 ± 8,25	15,5 ± 3,9	n/s	n/s	n/s	0,001
Comprimento dendrítico total (µm)	1.035,25 ± 344,41	93.431 ± 604,32	1.257,49 ± 462,84	743,96 ± 259,75	1.559,36 ± 1.206,55	493,06 ± 254,98	1.131,35 ± 443,81	646,7 ± 221,81	n/s	0,005	0,03	0,002
Comprimento dendrítico médio (µm)	55,82 ± 17,69	51,06 ± 17,36	52,82 ± 13,07	40,08 ± 13,25	48,21 ± 33,42	35,01 ± 26,95	44,69 ± 8,46	42,96 ± 15,01	n/s	0,02	n/s	n/s
Área total do soma (µm²)	172,13 ± 68,19	96,26 ± 33,18	169,3 ± 42,2	93,77 ± 25,02	170,02 ± 35,81	87,61 ± 18,3	143,57 ± 35,9	93,43 ± 22,24	0,003	0,0001	0,001	0,001
Área do campo receptor (µm²)	22.252,09 ± 16003,55	14.132,89 ± 10.714,19	15.684,32 ± 5.756,86	7.849,56 ± 4.393,24	23.794,35 ± 24.028,92	4.838,07 ± 4.904,28	14.822,63 ± 6936,82	8.864,56 ± 5.170,75	n/s	0,003	0,04	0,02
Distância da pia-máter (µm)	77,3 ± 23,23	73,43 ± 27,94	112,85 ± 47,21	77,67 ± 25,94	90,57 ± 24,73	21,03 ± 7,25	128,38 ± 60,21	86,22 ± 11,93	n/s	0,01	0,001	n/s

O valor de *p* é considerado significativo se ≤ 0.05 . Número de células (N); Não significativo estatisticamente (n/s).

Os neurônios da camada I do porquinho-da-índia tendem a ter mais unidades de dendritos que os neurônios do rato como mostra o gráfico da Figura 15, com exceção dos neurônios horizontais que praticamente se igualam nesse parâmetro. No entanto, apesar dessa tendência, encontramos diferenças estatisticamente significativas ($p=0,001$) somente entre os neurônios classificados como radiais (Porquinho-da-índia: $25,13 \pm 8,25$; Rato: $15,5 \pm 3,9$).

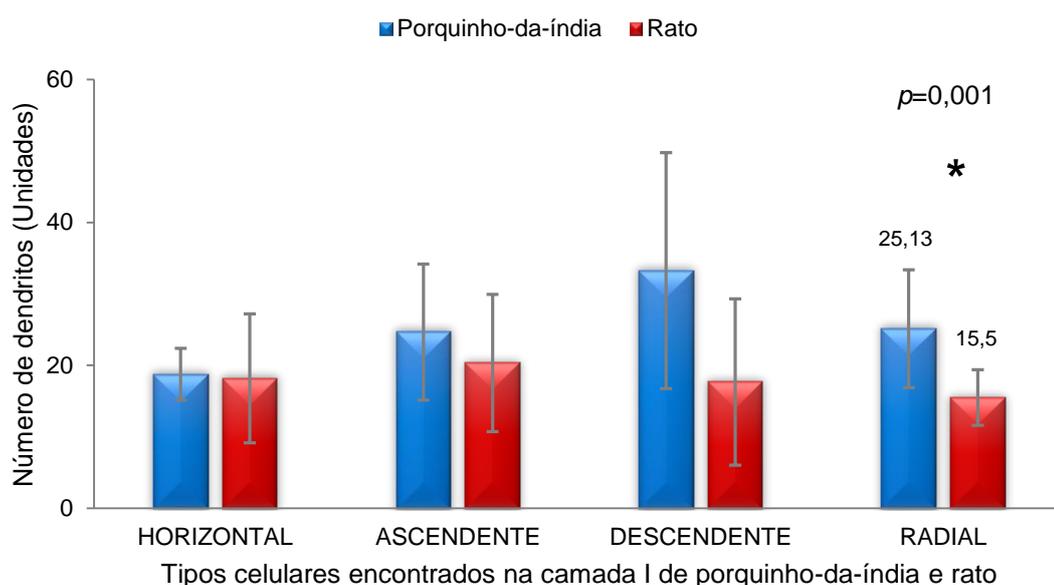


Figura 15. Avaliação do número total de dendritos detectados em cada tipo celular encontrados na camada I do córtex visual do porquinho-da-índia e rato, com destaque para os neurônios radiais das duas espécies que apresentaram diferença significativa, mostrando que os neurônios radiais do porquinho-da-índia possuem um número maior de dendritos que os neurônios radiais do rato.

Em relação ao comprimento dendrítico total, calculado pela soma do comprimento de todos os dendritos de cada célula, encontrou-se diferenças significativas em três tipos celulares: ascendentes, descendentes e radiais. Os neurônios do porquinho-da-índia têm dendritos significativamente mais longos e que possivelmente conseguem estabelecer mais conexões que os neurônios do rato. Observando o gráfico apresentado na Figura 16 percebe-se melhor essa tendência em todos os tipos celulares, discreta mais uma vez entre as células horizontais, porém expressiva entre os três tipos celulares restantes. (Em μm . Porquinho-da-índia: ascendentes: $1.257,49 \pm 462,84$, descendentes: $1.559,36 \pm 1.206,55$, radiais: $1.131,35 \pm 443,81$; Rato: ascendentes: $743,96 \pm 259,75$, descendentes: $493,06 \pm 254,98$, radiais: $646,7 \pm 221,81$. Valores de $p=0.005$, $0,03$ e $0,002$ respectivamente).

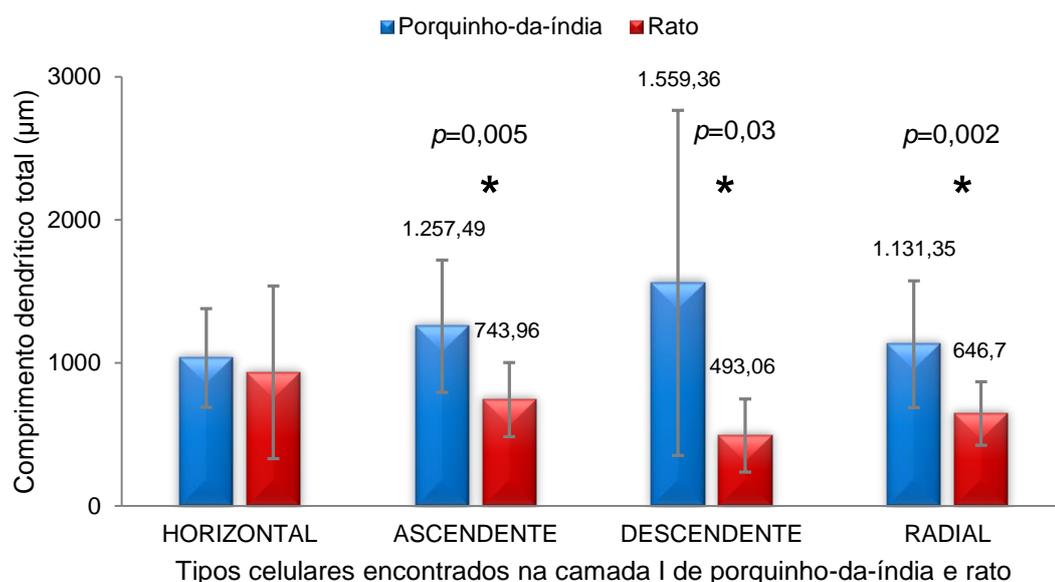


Figura 16. Diferenças no comprimento dendrítico total encontradas em três tipos celulares das duas espécies estudadas. As células ascendentes, descendentes e radiais do porquinho-da-índia possuem um comprimento dendrítico maior quando comparadas aos mesmos tipos celulares encontrados na camada I do rato.

Ao avaliar o comprimento dendrítico médio, a superioridade numérica das células do porquinho-da-índia se mantém como pode-se notar na Figura 17, contudo, só observa-se diferença estatisticamente significativa entre as células ascendentes (Em μm . Porquinho-da-índia: $52,82 \pm 13,07$; Rato: $40,08 \pm 13,25$. $p=0,02$).

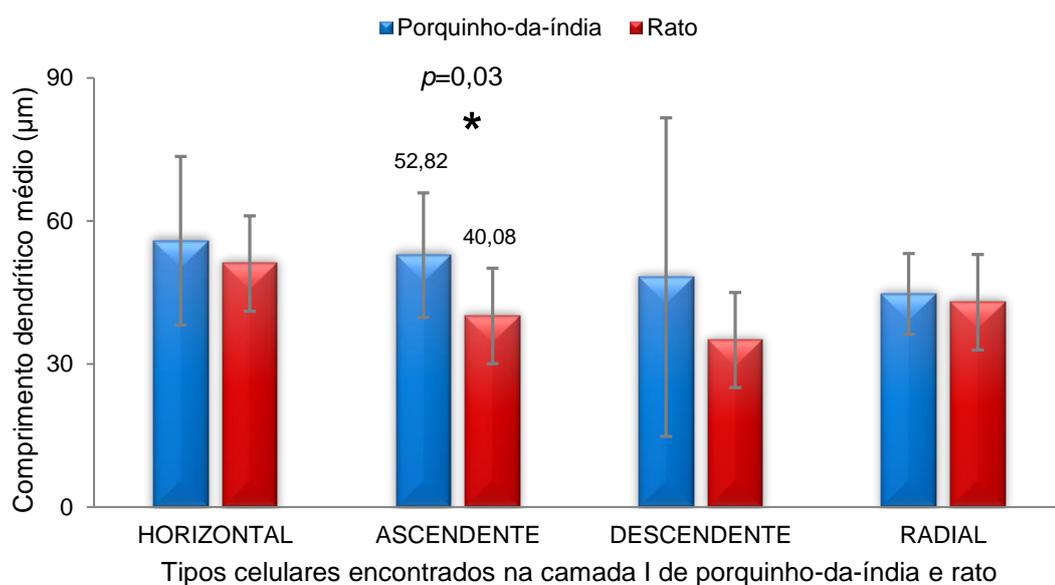


Figura 17. Células ascendentes encontradas na camada I do córtex visual do porquinho-da-índia possuem o comprimento dendrítico médio significativamente maior que as células com a mesma classificação encontradas na mesma região cortical do rato.

Um resultado interessante é a diferença estatisticamente significativa em todos os tipos celulares quando avaliou-se a área total do corpo celular. Os neurônios do porquinho-da-índia apresentam um corpo celular mais robusto que os neurônios do rato. Entre as células ascendentes das duas espécies de roedores essa diferença chegou ao valor de $p=0.0001$. O gráfico da Figura 18 ilustra essa expressiva diferença entre as áreas dos corpos celulares das células encontradas na camada I.

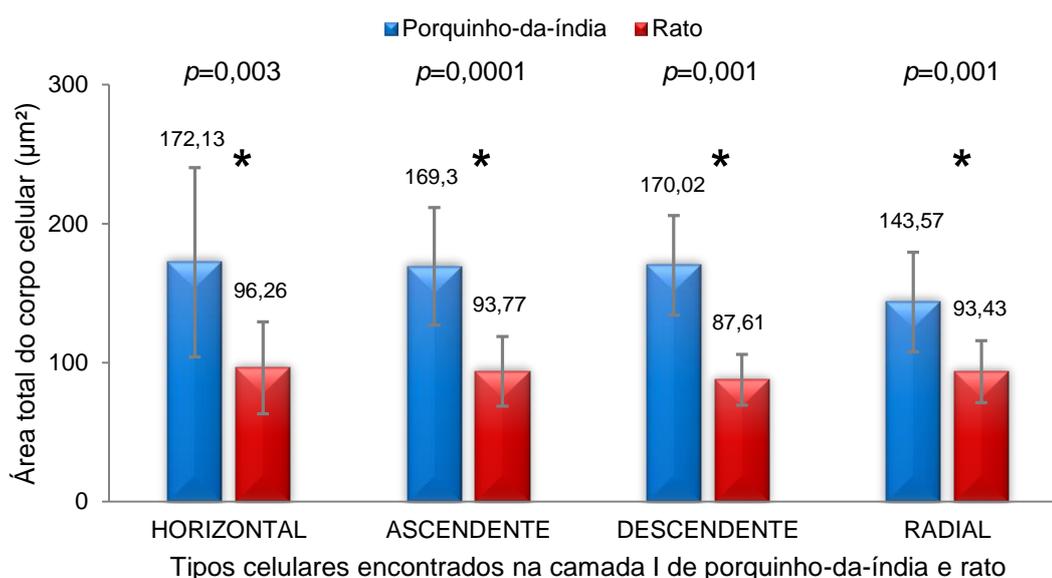


Figura 18. A área total do corpo celular de todos os tipos de neurônios encontrados na camada I do córtex visual do porquinho-da-índia é estatisticamente maior que os encontrados na mesma área cortical do rato.

A área do campo receptor dos neurônios do porquinho-da-índia segue a tendência dos resultados anteriores e também se mostra maior que nos neurônios do rato. Na Figura 19 nota-se essa tendência e as diferenças estatisticamente significativas nas células ascendentes, descendentes e radiais (Em μm^2 . Porquinho-da-índia: ascendentes: $15.684,32 \pm 5.756,86$, descendentes: $23.794,35 \pm 24.028,92$, radiais: $14.822,63 \pm 6.936,82$; Rato: ascendentes: $7.849,56 \pm 4.393,24$, descendentes: $4.838,07 \pm 4.904,28$, radiais: $8.864,56 \pm 5.170,75$. Valores de $p=0,003$, $0,04$ e $0,02$ respectivamente). Esse resultado corrobora com os resultados encontrados ao avaliar o comprimento dendrítico total que apresentou diferenças nos mesmos tipos celulares.

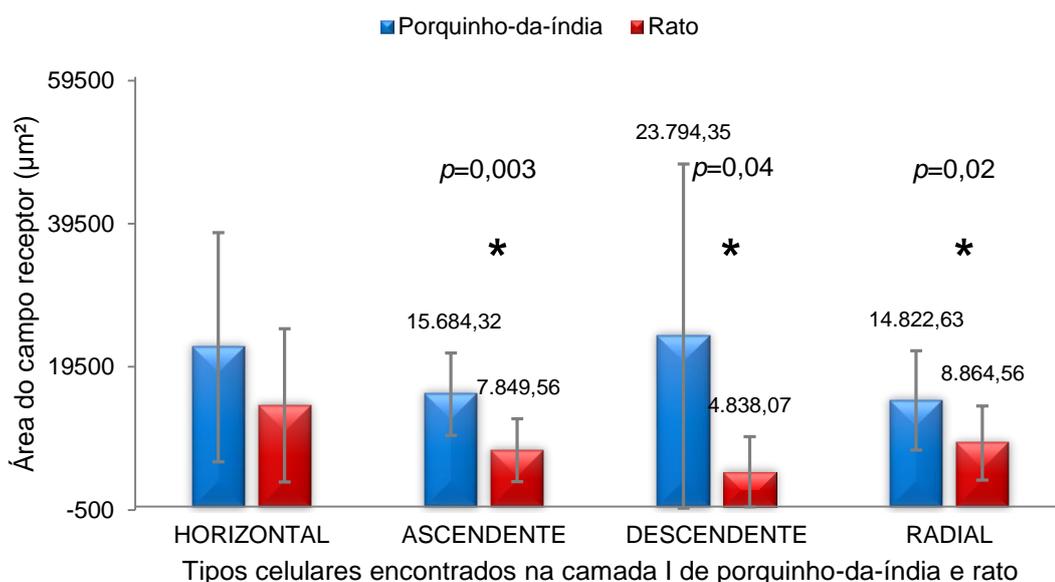


Figura 19. Diferenças encontradas na extensão da área do campo receptor dos tipos celulares detectados nos dois roedores estudados. As células ascendentes, descendentes e radiais apresentam resultados estatisticamente significantes mostrando que as células do porquinho-da-índia têm uma área de recepção de conexões maior que as células do rato.

Outro parâmetro avaliado em que encontrou-se diferenças significativas foi na distância entre a localização do corpo celular e a pia-máter nas células ascendentes e descendentes dos roedores. Na Figura 20 percebe-se essa grande diferença, especialmente entre as células descendentes das espécies. (Em µm. Porquinho-da-índia: ascendentes $112,5 \pm 47,21$, descendentes: $90,57 \pm 24,73$; Rato: ascendentes: $77,67 \pm 25,94$, descendentes: $21,03 \pm 7,25$. Valores de $p=0,01$, $0,001$, respectivamente).

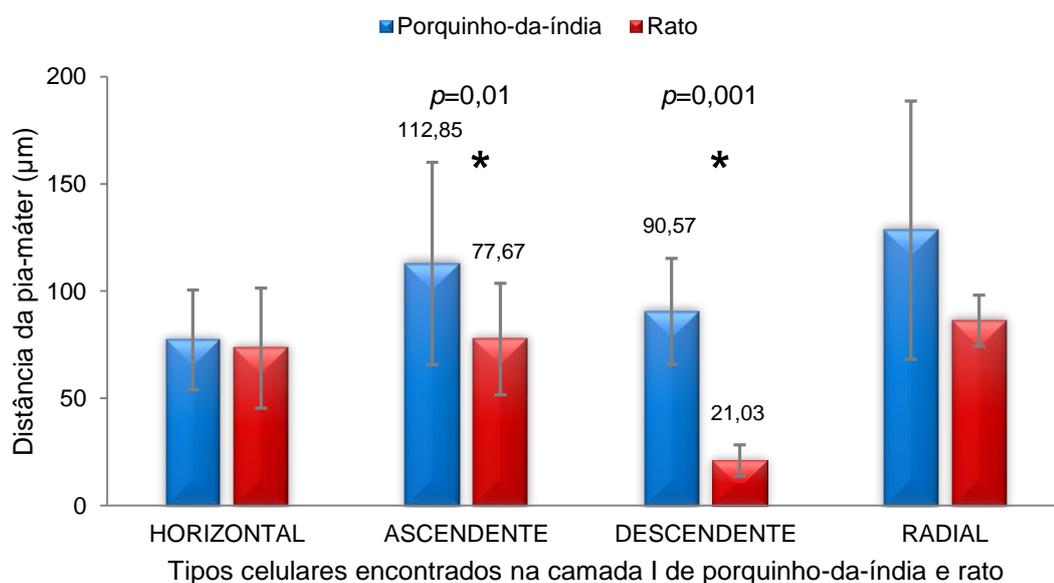


Figura 20. As distâncias encontradas entre o corpo celular e a pia-máter dos tipos celulares de cada espécie revelam diferenças significativas nas células ascendentes e descendentes.

A análise da distribuição de Sholl traz uma melhor visualização para os resultados encontrados em relação a área do campo receptor e o comprimento dendritico total pois mostra a extensão que os dendritos conseguem alcançar num raio de até 500 μm de distância do corpo celular. Foram encontradas diferenças significativas ao avaliar o raio máximo que os tipos celulares de cada espécie consegue alcançar que pode ser observado na Figura 21. Em todas as células avaliadas houve uma diferença estatisticamente significativa com valores de $p < 0,0001$. As células da camada I do porquinho-da-índia têm dendritos que se prolongam a distâncias expressivamente maiores que os dendritos das células do rato.

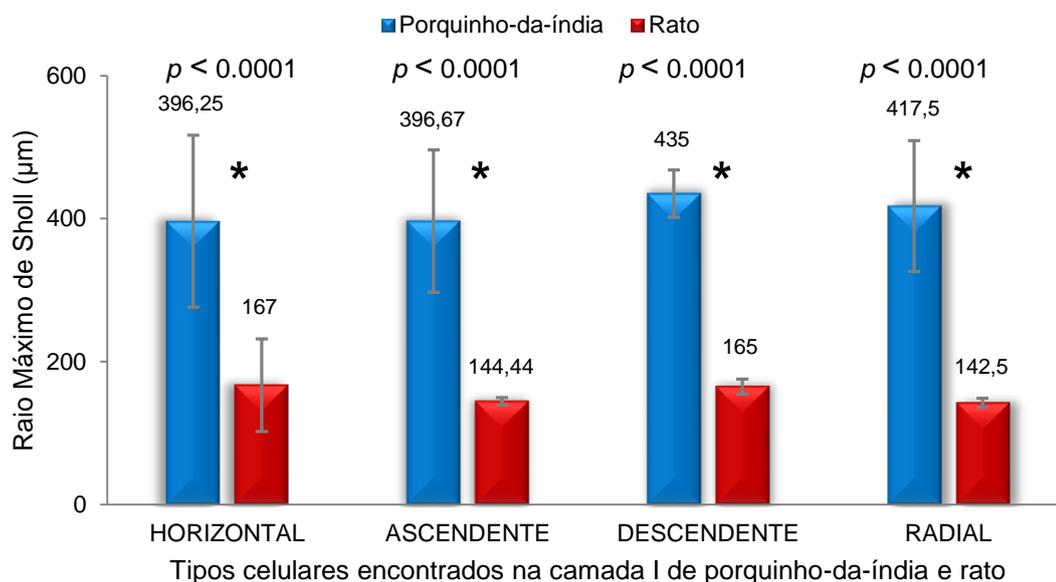


Figura 21. Diferenças do raio máximo de Sholl atingido pelas células da camada I dos roedores.

A distribuição dendrítica das células horizontais apresentou um comportamento semelhante entre as espécies assim como notou-se nos gráficos da área do campo receptor e comprimento dendrítico total não apresentando diferenças significativas nas duas análises. No entanto, nota-se que as células horizontais do rato não se prolongam além do raio de 350 μm , enquanto que as células do porquinho-da-índia têm seus dendritos alcançando o raio de 500 μm . Os picos de interseções em ambas são semelhantes e acontecem no raio de 40 μm .

O gráfico das células ascendentes mostra os resultados para o rato alcançando o raio máximo de 150 μm e o número máximo de interseções ($11,56 \pm 2,88$) no raio de 30 μm do corpo celular. No porquinho-da-índia, os dendritos das células ascendentes conseguem se estender até 500 μm de distância do corpo celular e seu pico de interseções ocorre também no raio de 30 μm ($13,78 \pm 4,6$).

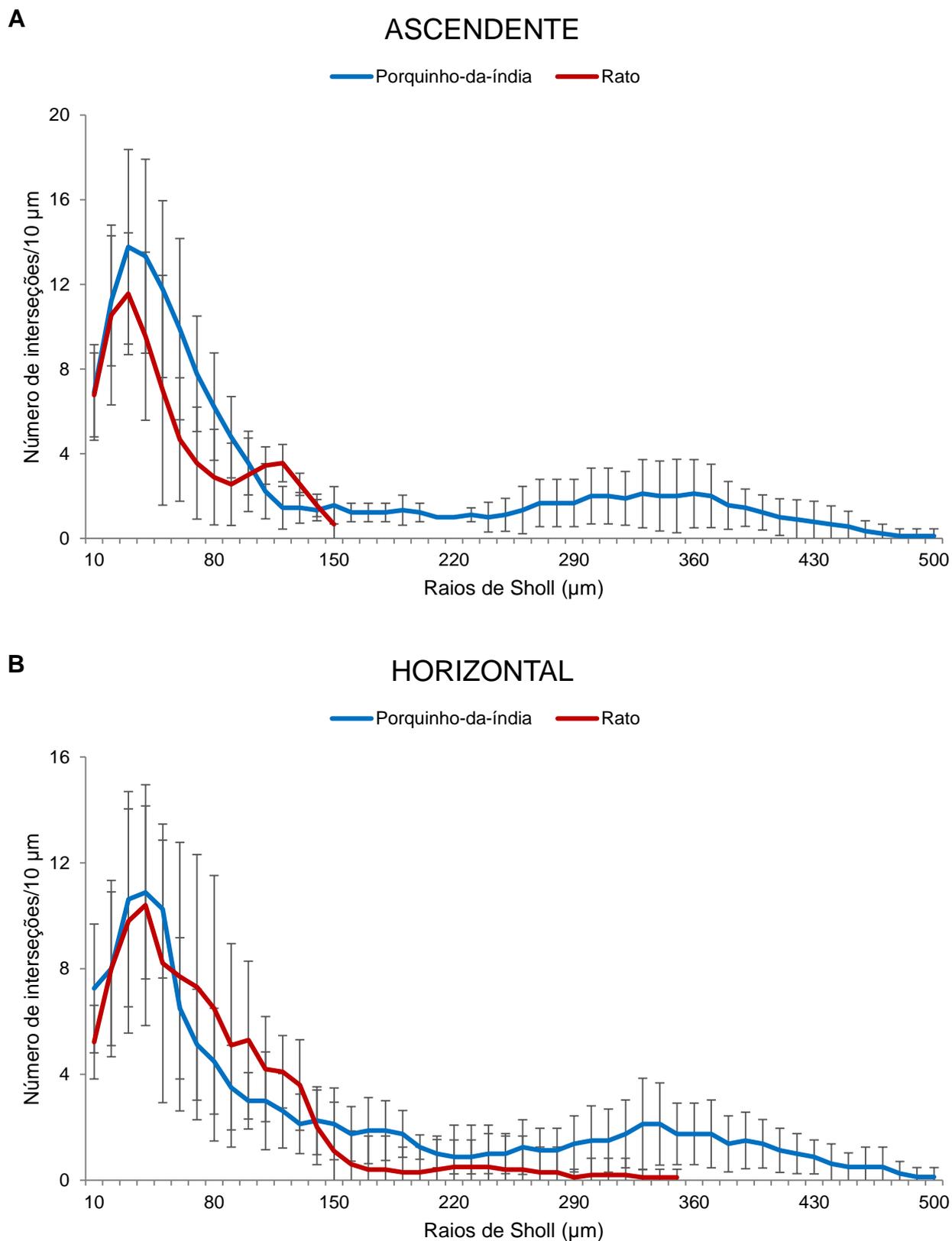


Figura 22. Análise da distribuição de Sholl dos neurônios horizontais (A) e ascendentes (B) da camada I do córtex visual do porquinho-da-índia e do rato que mostra que os dendritos das células do porquinho-da-índia alcançam uma distância maior do que os dendritos das células da camada I do rato.

As células descendentes apresentam essa mesma tendência de dendritos das células do porquinho-da-índia percorrendo distâncias mais longas a partir do corpo celular que os dendritos das células do rato. Os dendritos dos neurônios das células descendentes do porquinho-da-índia alcançam o raio de 480 μm e um pico de $16,75 \pm 7,37$ interseções no raio de 30 μm . Já as células do rato têm seus dendritos atingindo o raio máximo de 180 μm e com o pico de $6,83 \pm 4,4$ interseções também no raio de 30 μm .

As células radiais apresentaram resultados semelhantes às células anteriores quanto a extensão do alcance dendrítico dos neurônios do porquinho-da-índia que é muito maior que a dos neurônios do rato. Na Figura 23B observa-se o alcance máximo da célula radial do rato até o raio de 150 μm e um pico de interseções no raio de 20 μm com $11 \pm 2,41$ interseções, enquanto que na radial do porquinho-da-índia esse raio máximo chega aos 500 μm com seu pico de interseções nos raios de 30 e 40 μm com $14 \pm 3,62$ interseções.

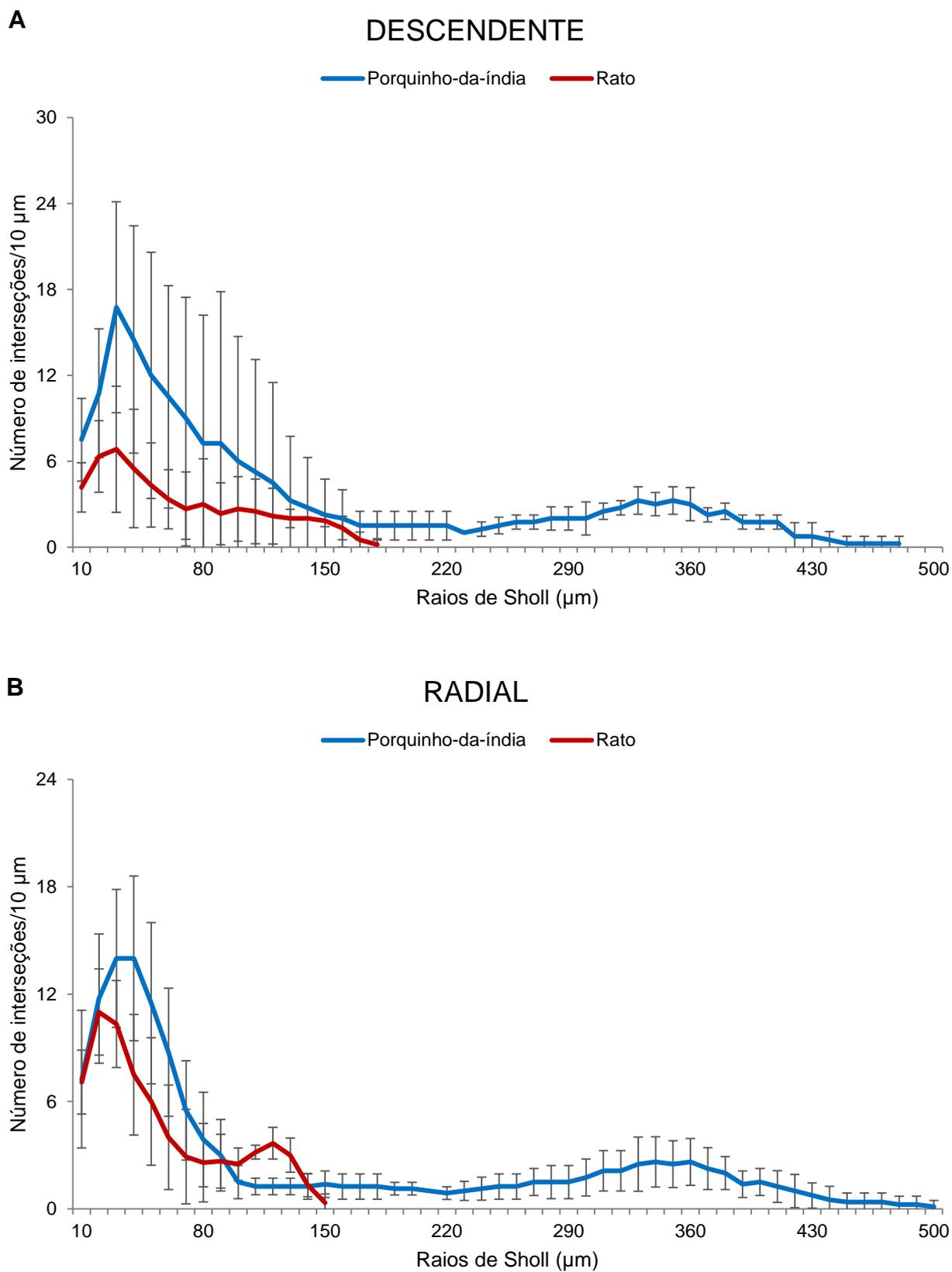


Figura 23. Análise da distribuição de Sholl dos neurônios descendentes (A) e radiais (B) da camada I do córtex visual do porquinho-da-índia e do rato que mostra que os dendritos das células do porquinho-da-índia alcançam uma distância maior do que os dendritos das células da camada I do rato.

5 DISCUSSÃO

Segundo a literatura a maioria dos neurônios da camada I são interneurônios (HESTRIN e ARMSTRONG, 1996; ZHOU e HABLITZ, 1996), a morfologia dos interneurônios é altamente variável (MARKRAM et al., 2004) e isso pode ter impacto profundo sobre o processamento da informação (CALLAWAY e BORREL, 2011) e o principal achado deste trabalho são as diferenças existentes na árvore dendrítica das células das espécies estudadas, principalmente em relação a extensão dessas células.

Os dendritos dos neurônios do porquinho-da-índia alcançam distâncias mais longas a partir do corpo celular, como visto na análise de Sholl, e este resultado é compatível com as diferenças encontradas tanto em relação ao comprimento dendrítico total quanto a área do campo receptor ao compará-los com os resultados encontrados no rato. Essa superioridade da arborização dendrítica dos neurônios do porquinho-da-índia sobre a dos neurônios do rato pode ocorrer por receberem um maior número de conexões como reflexo de um maior estímulo visual ou por uma característica inata do porquinho-da-índia, ou até mesmo pelo comportamento dessas espécies em seu habitat, uma vez que porquinhos-da-índia são roedores crepusculares (NOONAN, 1994; TERRIL e CLEMONS, 1997), ou seja, tendem a preferir o amanhecer e o entardecer, já os ratos tendem a preferir a noite e locais escuros. Entretanto, são necessárias maiores investigações que expliquem as possíveis relações da morfologia dendrítica com esses parâmetros fisiológicos.

Outro resultado interessante encontrado neste trabalho é o tamanho dos corpos celulares que no porquinho-da-índia são maiores do que no rato. Talvez esse achado possa ser justificado por uma maior taxa metabólica dos neurônios do porquinho-da-índia devido seu maior número de dendritos e por seus dendritos serem mais longos, o que exige uma maior síntese proteica para manutenção de toda estrutura celular.

5.1 CÉLULAS HORIZONTAIS

As células horizontais na camada I já foram descritas por alguns autores (BRADFORD, PARNAVELAS e LIEBERMAN, 1977; ZHOU e HABLITZ, 1996;

SANTOS et al., 2012) e a morfologia das células encontradas neste estudo são semelhantes as descritas por eles. Dentre todos os tipos celulares analisados, as células horizontais foram as que mais se assemelharam nos resultados apresentados pelas duas espécies e só detectou-se diferenças em relação ao tamanho do corpo celular e ao raio máximo de distância dos dendritos em relação ao centro do corpo celular. Embora o número de células marcadas com sucesso nas duas espécies tenha sido pequeno, a frequência do tipo celular horizontal foi semelhante nas duas espécies com 27,6% na camada I do porquinho-da-índia e 27% no rato. Não foram encontradas células de CR, provavelmente pela idade em que os animais foram analisados, os ratos com 14 a 21 dias e os porquinhos-da-índia com 4 a 5 dias. Em ratos as células de CR diminuem drasticamente após a primeira semana pós-natal (BRADFORD, PARNAVELAS e LIEBERMAN, 1977) e nos porquinhos-da-índia essa ocorrência de células de CR é provavelmente mais precocemente diminuída uma vez que não encontrou-se esse tipo celular na camada I deste roedor e há estudos que demonstram que embora com poucos dias de nascidos os porquinhos-da-índia apresentam uma alta maturidade neuronal ao nascer quando comparado ao rato (DOBBING e SANDS, 1970; KALANDARISHVILI et al., 2012).

5.2 CÉLULAS ASCENDENTES

A classificação neuronal pela trajetória dendrítica é pouco comum, principalmente quando se trata de interneurônios, que têm uma morfologia altamente variável (MARKRAM et al., 2004; JIANG, 2013), variabilidade relatada desde os trabalhos de Cajal no século passado (ZHOU e HABLITZ, 1996). Existem poucos trabalhos com os quais se possa comparar os resultados aqui apresentados, em especial as células ascendentes. Neste estudo, as células ascendentes foram as únicas que apresentaram diferença significativa em relação ao comprimento dendrítico médio, sendo as do porquinho-da-índia com um comprimento maior que as do rato. Esse resultado é compatível com o que se observa na análise de Sholl, onde o raio máximo alcançado pelos dendritos das ascendentes do porquinho-da-índia é 3,33 vezes maior que o do rato. Além disso, as ascendentes do porquinho-da-índia são mais distantes da pia-máter que as do rato. O trabalho de Santos et al. (2012) avaliou as células da camada I de ratos e as classificou de acordo com a trajetória

dendrítica, seus resultados são semelhantes aos encontrados neste estudo em relação as medidas dendríticas do rato.

5.3 CÉLULAS DESCENDENTES

Algumas células classificadas como descendentes são semelhantes as descritas e ilustradas nos trabalhos de Bradford, Parnavelas e Lieberman (1977) e de Zhou e Hablitz (1996) com um corpo celular piramidal tendo a base da pirâmide voltada para a superfície pial e com um grosso dendrito espinhoso que parte do ápice da pirâmide e se direciona para baixo. Em relação a distância dessas células da pia-máter as células do porquinho-da-índia encontram-se mais distantes da superfície pial que as células do rato. Os resultados do trabalho de Santos et al. (2012) são semelhantes aos encontrados no presente estudo quando comparados aos resultados do rato e mostram que esse tipo celular costuma se posicionar na parte superior da camada, por vezes imediatamente abaixo da superfície pial, é relativamente raro na zona medial e inexistente na zona inferior da camada I. Já quando comparado ao resultado do porquinho-da-índia tem-se uma diferença importante já que as células descendentes dessa espécie apresentam-se 4,3 vezes mais distante da pia-máter. Isso implica dizer que, considerando que a espessura da camada I das duas espécies são semelhantes, as células descendentes do porquinho-da-índia aparecem em regiões diferentes da camada I e não só na zona superior ou medial como no rato. Entretanto, como o número de células desse tipo encontradas foi o menor em relação aos outros, seria necessário uma investigação mais aprofundada com um número bem maior de animais e cortes histológicos aumentando assim as chances de se encontrar mais células descendentes para melhor análise.

5.4 CÉLULAS RADIAIS

As células radiais foram as únicas que apresentaram diferença significativa em relação ao número de dendritos e agregando esse resultado com os encontrados nas

análises do comprimento dendrítico total, área do campo receptor e raio máximo de Sholl pode-se dizer que as células radiais do porquinho-da-índia estabelecem um maior número de interações neuronais na região em que esteja localizada pois seu raio de recepção de sinais é 3,33 vezes maior que o das células radiais do rato. Segundo Santos et al. (2012) talvez esse tipo celular, que no rato apresenta um comprimento dendrítico e alcance do raio máximo de Sholl significativamente maior que os outros tipos celulares, exerça um papel de atividade integradora de informações.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram encontradas diferenças morfológicas entre as populações de neurônios da camada I do rato e do porquinho-da-índia. Porém, as mais sensíveis foram a extensão dos ramos e o tamanho do corpo celular que no porquinho-da-índia foram maiores. Isso sugere que nessa espécie um maior número de microcircuitos neurais podem ser estabelecidos, e por conseguinte maior taxa metabólica, justificada pelo maior tamanho do corpo celular.

REFERÊNCIAS

- ASCOLI, Giorgio. A et al. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. **Nature Reviews Neuroscience**. v.9, p. 557–568, julho. 2008.
- BIELLE, Franck et al. Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. **Nature Neuroscience**. v. 8, p. 1002-1012, julho. 2005.
- BRADFORD, R.; PARNAVELAS, J.G.; LIEBERMAN, A. R et al. Neurons in layer I of the developing occipital cortex of the rat. **Journal of the Comparative Neurology**. v. 176, p. 121-132, novembro. 1977.
- CAJAL, Santiago R. **Histologie du System Nerveux de l'Homme et des Vertébrates**. Paris: A. Mailone, 1911. Traduzido para o inglês por N. Swanson & L.W. Swanson como *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates*. New York: Oxford University Press, 1995.
- CAJAL, Santiago R. Sur la structure de l'écorce cérébrale de quelques mammifères. **La Cellule**. v. 7, p. 125-176. 1891.
- CALLAWAY, Edward M.; BORREL, Victor. Developmental sculpting of dendritic morphology of layer 4 neurons in visual cortex: influence of retinal input. **Journal of Neuroscience**. v. 31, p. 7456-7470, maio. 2011.
- CHOUDHURY, B. P. Retinotopic organization of the guinea pig's visual cortex. **Brain Research**. v. 144, p. 19-29, abril. 1978.
- CONDÉ, Françoise et al. Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. **Journal of Comparative Neurology**. v. 341, p. 95-116, março. 1994.
- DA SILVA FILHO, Manoel. **Forma e função de neurônios da substância branca do córtex visual primário do rato**. 1999. Belém, Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular) - UFPA, Pará.
- DOBBING, John; SANDS, Jean. Growth and development of the brain and spinal cord of the guinea pig. **Brain Research**. v. 17, p. 115-123. 1970.
- FROTSCHER, Michael. Cajal-Retzius cells, reelin, and the formation of layers. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 8, p. 570-575. 1998.
- FROTSCHER, Michael. Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. **Cell & Tissue Research**. v. 290, p. 315-322. 1997.
- HESTRIN, Shaul; ARMSTRONG, William E. Morphology and physiology of cortical neurons in layer I. **Journal of Neuroscience**. v. 16(17), p. 5290-5300, setembro. 1996.

HORIKAWA, K.; ARMSTRONG, W. E. A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 25, p. 1-11. 1988.

JIANG, Xiaolong; Wang, Guangfu; Lee, Alice J.; Stornetta, Ruth L.; Zhu, Julius J. The organization of two new cortical interneuronal circuits. **Nature Neuroscience**. v. 16(2), p. 1908, fevereiro. 2013.

JIMÉNEZ, David et al. Origin of the cortical layer I in rodents. **Developmental Neuroscience**. v. 25, p. 105-115. 2003.

KALANDARISHVILI, E. L.; BUKIIA R. D.; TAKTAKISHVILI A. D.; CHICHINADZE G. V.; KHAREBAVA I. G. Postnatal neurogenesis and regenerative capabilities of the central nervous system (review). **Georgian Medical News**. v. 206, p. 67-72, maio. 2012.

KAWAGUCHI, Y. Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. **Journal of Neurophysiology**. v. 69(2), p. 416-431, fevereiro. 1993.

LARKUM, Matthew E. The yin and yang of cortical layer 1. **Nature Neuroscience**. v. 16(2), p. 114-115, fevereiro. 2013.

MAGINI, J. Nouvelles recherches, histologique sur le cerveau du foetus. **Archives Italiennes de Biologie**. v. 10, p. 384–387. 1888.

MARÍN-PADILLA, Miguel. Cajal–Retzius cells and the development of the neocortex. **Trends in neurosciences**. v. 21, p. 64-71, fevereiro. 1998.

MARÍN-PADILLA, Miguel. The development of the human cerebral cortex. A cytoarchitectonic theory. **Revista de Neurologia**. v. 29(3), p. 208-216, agosto. 1999.

MARKRAM, Henry et al. Interneurons of the neocortical inhibitory system. **Nature Reviews**. v. 5, p. 793-807, outubro. 2004.

MARTÍNEZ-GARCIA, F.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T.; MARTÍNEZ-MILLÁN L. Pyramidal and nonpyramidal callosal cells in the striate cortex of the adult rat. **Journal of comparative neurology**. v. 350(3), p. 439-451, dezembro. 1994.

MARTINOTTI, C. Beitrag zum Studium der Hirnrinde und dem Centralursprung der Nerven. **Int. Monatsschr. Anat. Physiol.** v. 7, p. 69–90. 1890.

MCCORMICK, David A.; PRINCE, David A. Mechanisms of action of acetylcholine in the guinea-pig cerebral cortex in vitro. **Journal of Physiology**. v. 375, p. 169-194, junho. 1986.

MIENVILLE, Jean-Marc. Cajal-Retzius cell physiology: Just in time to bridge the 20th century. **Cerebral Cortex**. v. 9, p. 776-782, 1999.

NOCTOR, Stephen C et al. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. **Journal of Neuroscience**. v. 22(8), p. 3161-3173, abril. 2002.

NOONAN, Denise. The guinea pig (*Cavia porcellus*). **Anzcart News**. v. 7(3), p. 1-8, setembro. 1994.

PARNAVELAS, John G. The origin and migration of cortical neurones: new vistas. **Trends in Neuroscience**. v. 23(3), p. 126-131. 2000.

PETERS, H. G.; BADEMAN H. The form and growth of stellate cells in the cortex of the guinea-pig. **Journal of Anatomy**. v. 97(1), p. 111-117. 1963.

RADINIKOW, Gabriele; FELDMEYER, Dirk; LÜBKE, Joachim. Axonal projection, input and output synapses, and synaptic physiology of cajal–retzius cells in the developing rat neocortex. **Journal of Neuroscience**. v. 22(16), p. 6908-6919, agosto. 2002.

RAKIC, Sonja; ZECEVIC, Nada. Emerging complexity of layer I in human cerebral cortex. **Cerebral Cortex**. v. 13, p. 1072-1083, outubro. 2003.

RETZIUS, G. Die Cajalschen zellen der großhirnrinde beim menschen und bei säugetieren. **Biol Unters Neue Folge**. v. 5, p. 1-8. 1893.

SANTOS, Daniel Valle Vasconcelos et al. Relationships between dendritic morphology, spatial distribution and firing patterns in rat layer 1 neurons. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 45(12), p. 1221-1233, dezembro. 2012.

SANTOS, Daniel Valle Vasconcelos. **Propriedades eletrofisiológicas passivas e ativas de neurônios da camada I no córtex visual do rato**. 2006. Belém, Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) – UFPA, Pará.

SARNAT, Harvey B.; FLORES-SARNAT, Laura. Cajal-Retzius and subplate neurons: their role in cortical development. **European Journal of Paediatric Neurology**. v. 6, p. 91-97. 2002.

SCHÜZ, A. Comparison between the dimensions of dendritic spines in the cerebral cortex of newborn and adult guinea pigs. **Journal of Comparative Neurology**. v. 244(3), p. 277-285, fevereiro. 1986.

SCHÜZ, A. Prenatal development and postnatal changes in the guinea pig cortex: microscopic evaluation of a natural deprivation experiment. I. Prenatal development. **Journal für Hirnforschung**. v. 22(1), p. 93-11. 1981a.

SCHÜZ, A. Prenatal development and postnatal changes in the guinea pig cortex: microscopic evaluation of a natural deprivation experiment. II. Postnatal changes. **Journal für Hirnforschung**. v. 22(1), p. 113-127. 1981b.

SPREAFICO, Roberto et al. Development of layer I of the human cerebral cortex after midgestation: architectonic findings, immunocytochemical identification of neurons and glia, and in situ labeling of apoptotic cells. **Journal of Comparative Neurology**. v. 410, p. 126-142. 1999.

TERRIL, Elizabeth A.; CLEMONS, Donna J. **The laboratory guinea pig**. New York: CRC Press, 1997. p. 23-26.

TVEDEN-NYBORG, Pernille et al. Maternal vitamin C deficiency during pregnancy persistently impairs hippocampal neurogenesis in offspring of guinea pigs. **Plos One**. v. 7(10), p. 1-9, outubro. 2012.

VOGT, Brent Alan. The role of layer I in cortical function. In **Cerebral cortex: Normal and altered states of function**. Springer, 1991. v. 9, p. 49-80.

WREE, Andreas; ZILLES, Karl; SCHLEICHER, Axel. A quantitative approach to cytoarchitectonics. VII. The areal pattern of the cortex of the guinea pig. **Anatomy and Embryology**. v. 162, p. 81-103. 1981.

ZECEVIC, Nada; RAKIC, Pasko. Development of layer I neurons in the primate cerebral cortex. **Journal of Neuroscience**. v. 21(15), p. 5607-5619, agosto. 2001.

ZHOU, Fu-Ming; HABLITZ, John J. Layer I neurons of the rat neocortex. II. Voltage-dependent outward currents. **Journal of Neurophysiology**. v. 76(2), p. 668-681, agosto. 1996c.

ZHOU, Fu-Ming; HABLITZ, John J. Morphological properties of intracellularly labeled layer I neurons in rat neocortex. **Journal of Comparative Neurology**. v. 376, p. 198-213. 1996.

ZHOU, Fu-Ming; HABLITZ, John J. Postnatal development of membrane properties of rat neocortical layer I neurons. **Journal of Neuroscience**. v. 16, p. 1131-1139, fevereiro. 1996a.

ZHOU, Fu-Ming; HABLITZ, John J. Rat neocortical layer I neurons. I. Action potential and repetitive firing properties. **Journal of Neurophysiology**. v. 76(2), p. 651-667, agosto. 1996b.

ZHU, Yinghua; ZHU, J. Julius. Rapid arrival and integration of ascending sensory information in layer 1 nonpyramidal neurons and tuft dendrites of layer 5 pyramidal neurons of the neocortex. **Journal of Neuroscience**. v. 24(6), p. 1272-1279, fevereiro. 2004.