



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**Carlos Escobar Vásquez**

**ESTUDO DOS COMPONENTES CELULARES DO NÚCLEO CORTICAL DA  
AMÍGDALA HUMANA**

**Porto Alegre**

**2017**

**Carlos Escobar Vásquez**

**ESTUDO DOS COMPONENTES CELULARES DO NÚCLEO CORTICAL DA  
AMÍGDALA HUMANA**

Dissertação submetida ao programa de  
Pós-Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul como requisito para obtenção do grau  
de Mestre

Orientador: Profa. Dra. Maria Elisa Calcagnotto

Co-orientador: Prof. Dr. Alberto A. Rasia Filho

**Porto Alegre**

**2017**

### CIP - Catalogação na Publicação

Vásquez, Carlos Escobar

Estudo dos componentes celulares do núcleo cortical da amígdala humana / Carlos Escobar Vásquez.

-- 2017.

111 f.

Orientadora: Maria Elisa Calcagnotto.

Coorientadora: Alberto Antônio Rasia-Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Complexo amigdaliano humano. 2. Amígdala humana. 3. Núcleo cortical. I. Calcagnotto, Maria Elisa, orient. II. Rasia-Filho, Alberto Antônio, coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

O brilho do olho com o regozijo de conseguir realizar objetivos continua em evidência. O tempo e a experiência transformam e moldam a maturidade. Assim, somente os anos ensinam que muitas vezes o maior agradecimento que podemos dar e que pode ir além das palavras é o sentimento traduzido e expressado em atitudes.

Meus agradecimentos e elogios à Instituição, Direção, Professores, Colegas e Funcionários que me abriram as portas da hospitalidade e me brindaram o convívio agradável nesta estada.

Agradecimentos especiais ao Professor Claudio Rosito Jung e a Roman Reberger pelo excelente trabalho na reconstrução tridimensional dos espinhos dendríticos. Igualmente minha gratidão à colega Aline Dall'Oglio pela incansável ajuda e ensinamentos nas reconstruções bidimensionais das imagens neuronais.

Aos meus orientadores que com sua sabedoria me guiaram, me proporcionaram desafios e a oportunidade de novos aprendizados.

À minha família, que é meu porto seguro, meu lastro emocional, meu fundamento e realização do meu principal objetivo de viver, participando do meu dia-a-dia, dos meus dissabores, alegrias, conquistas e vitórias.

À Deus, essa força superior que existe no âmago da nossa essência e que divinamente nos ilumina silenciosamente, dando-nos assim, consciência da sua plenitude e existência na nossa alma traduzida em pensamento e filosofia. Dessa forma, como o transcendental é invisível aos olhos, com o coração vemos o que os olhos não conseguem enxergar.

A todos, meus mais sinceros sentimentos de gratidão, reconhecimento, respeito e admiração.

“As células silenciosas no tempo estão, de alguma forma, tentando contar sua história”.

Alberto Rasia Filho

## **SUMÁRIO**

Lista de abreviaturas	6
Resumo	9
Abstract	10
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
1. O complexo amigdaliano humano	11
1.1 Divisão anatômica e conexões amigdalianas	11
1.2 Função	15
2. O núcleo da amígdala cortical	18
2.1 Anatomia	18
2.2 Tipos neuronais	22
2.3 Espinhos dendríticos	24
2.4 Células da glia: astrócitos	28
<b>II. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVAS</b>	<b>29</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
1. Objetivo geral	30
2. Objetivos específicos	30
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
1. Autorização para estudo	31
2. Amostras para estudo	31
3. Técnicas histológicas	32
3.1 Técnica da tionina	32
3.2 Método de Golgi	33
3.3 Técnica de imunohistoquímica para a proteína ácida fibrilar glial	34

4. Localização do núcleo cortical da amígdala	35
5. Reconstrução de imagens	35
<b>V. RESULTADOS</b>	38
<b>VI. DISCUSSÃO</b>	93
<b>VII. CONCLUSÕES</b>	102
<b>VIII. PERSPECTIVAS</b>	103
<b>REFERÊNCIAS</b>	104

## Lista de abreviaturas

5-HT	5-hidroxitriptamina ou Serotonina
AAA	Área da amígdala anterior
ACo	Núcleo da amígdala cortical anterior
ACoD	Parte dorsal do núcleo da amígdala cortical anterior
ACoV	Parte ventral do núcleo da amígdala cortical anterior
AHi	Área de transição amígdalo-hipocampal
AI	Núcleos intercalados da amígdala
AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
Astr	Área de transição amígdalo-estriatal
ATP	Adenosina trifosfato
BL	Núcleo basolateral
BLNG	Grupo de núcleos basolaterais
BLVM	Núcleo basolateral ventromedial
BM	Núcleo basomedial
CCK	Colecistocinina
Ce	Núcleo central
CMEA	Grupo de núcleos centromediais
CVCo	Amígdala cortical ventral caudal
CxA	Área de transição corticoamigdaliana
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DACo	Amígdala cortical anterior dorsal
DNA	ácido desoxirribonucleico

Ent	Cápsula do córtex entorrinal;
Epn	Núcleo endopiriforme
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD	Ácido glutâmico descarboxilase
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HiH	Cabeça do hipocampo
HRP	Peroxidase do rábano silvestre
icm	Feixe de fibras caudomedial intermediária
ICN	Núcleos intercalados
La	Núcleo lateral da amígdala
LaDL	Amígdala lateral dorsolateral
LiCl	Claustro limitante
LTP	Atividade potenciada de longo prazo
MeA	Núcleo medial da amígdala
nACo	Núcleo cortical da amígdala
NAOT	Núcleo do trato olfatório acessório
NGS	Soro normal de cabra
NLOT	Núcleo do trato olfatório lateral
NMDA	N-metil-D-aspartato
opt	Trato óptico
OVN	Órgão vomeronasal
PACI	Claustro periamigdaliano
PAM	Córtex periamigdaliano
PBS	Solução salina tamponada com fosfato

PCo	Núcleo cortical posterior da amígdala
PHA	Área de transição amígdalo-parahipocampal
PirT	Córtex piriforme
PL	Núcleo paralaminar
Puv	Putâmen ventral
RVCo	Amígdala cortical ventral rostral
sas	Sulco semianular
sCLR	Grupo de núcleos corticais superficiais
SOD	Região dorso lateral do núcleo supraóptico
TCI	Claustro temporal
TLV	Corno temporal do ventrículo lateral
Un	Unco do hipocampo
unc	Fascículo uncinato
VACo	Amígdala cortical anterior ventral
VCo	Amígdala cortical ventral
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo

## Resumo

**Introdução.** O complexo amigdaliano humano é formado por diversos núcleos. Pouco se sabe sobre o núcleo cortical da amígdala, o qual faz parte da denominada amígdala vomeronasal. Pouco é conhecido de seus componentes celulares, suas conexões e funções em seres humanos até o momento.

**Objetivos.** Descrever os componentes neuronais presentes no núcleo cortical da amígdala humana, buscando obter dados sobre sua morfologia, caracterizando-os pelo formato do soma, número de dendritos primários e padrão de ramificação, além da presença, distribuição, densidade e forma dos espinhos dendríticos locais.

**Materiais e métodos.** Foram estudadas peças anatômicas do lobo temporal de ambos hemisférios cerebrais obtidas de homens adultos post-mortem (N= 8, 47-68 anos) e submetidas à técnica de tionina, à técnica de imunohistoquímica para a proteína ácida fibrilar glial e à técnica de Golgi adaptada para tecido humano fixado em formol a 10% por longa data. A obtenção de imagens foi realizada empregando-se microscópio de luz acoplada a computador com programa de análise de imagem (Image-Pro Plus 7.0). Para elaboração das imagens dos neurônios e sua forma geral bidimensional foi utilizado o programa Adobe Photoshop CS3 (EUA). Para a reconstrução tridimensional dos espinhos dendríticos foi desenvolvido algoritmo de processamento de imagens.

**Resultados.** Foram observados astrócitos protoplasmáticos e identificadas 10 formas neuronais diferentes no núcleo cortical da amígdala humana, a saber: neurônios piramidal modificado (*pyramidal-like*), fusiforme, angular-esférico, triangular, retangular, poligonal-estrelado, redondo-cônico, *pear shaped*, *fork-like* e “pequeno”. Espinhos com formato fino (*thin*), achatado (*stubby*), espesso (*wide*), de tipo cogumelo (*mushroom*), ramificado (*ramified*), atípico ou de transição (*atypical or transitional*) foram observados em todos os neurônios estudados, guardadas particularidades de ramificação dendrítica de cada um deles.

**Conclusão.** O núcleo cortical da amígdala humana apresenta neurônios tipo *pyramidal-like*. Isso lhe confere características de área de transição para o allocórtex e de área de surgimento evolutivo de tais neurônios no *continuum* subcortical-allocórtex-neocórtex. Muito importante toda a diversificada celularidade encontrada neste núcleo pode significar que esta região desempenhe múltiplas funções de integração e processamento de informações em seres humanos.

## **Abstract**

**Introduction.** The human amygdaloid complex is formed by several nuclei. Little is known about the amygdala cortical nucleus which is part of the denominated vomeronasal amygdala. Little is at the moment known of its cellular components, its connections and functions in humans.

**Objetives.** We aim to describe the neuronal components present in the human amygdala cortical nucleus, seeking to obtain data about its morphology, detailing soma shape, number of primary dendrites and branching pattern, as well as the presence, distribution, density and shape of the local dendritic spines.

**Materials and methods.** Were studied anatomical pieces of the both temporal lobe of postmortem men (N = 8, 47-68 years) and submitted to tironin technique, to a glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry technique and to Golgi technique adapted for fixed human tissue in 10% formaldehyde for a long time. The imaging was performed using a light microscope coupled to a computer with the image analysis program (Image-Pro Plus 7.0). For the elaboration of the images of the neurons and their general two-dimensional form the program Adobe Photoshop CS3 (USA) was used. For a dendritic spines three-dimensional reconstruction was developed by using an image algorithm process.

**Results.** Protoplasmic astrocytes were identified and ten different neuronal forms were identified in the human cortical amygdala, one known: pyramidal modified (pyramidal-like), fusiform, angular or spherical, triangular, rectangular, polygonal-starry, round-conical, fork-like and small neurons. Thin spines, stubby, wide, mushroom shape, ramified, atypical or transitional were observed in all neurons studied, preserving the particularities of dendritic ramification of each one.

**Conclusion.** The cortical nucleus of human amygdala presents pyramidal-like neurons. This finding is a features the transition area to the allocortex and an area of evolutionary development of such neurons in the continuum subcortical-allocortex-neocortex. Very important all the cellular diversity found in this nucleus may suggest that this region performs several functions of integration and information processing in humans.

# I. INTRODUÇÃO

## 1. O complexo amigdaliano humano

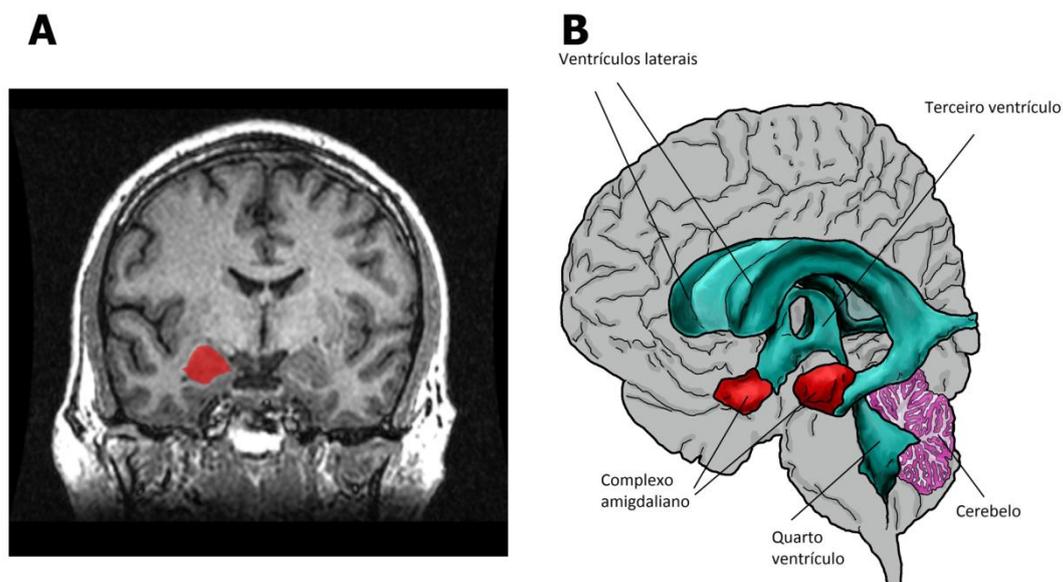
O complexo amigdaliano (amígdala ou “complexo amigdalóide”; [Gloor, 1997](#); [de Olmos, 2004](#); [Rasia-Filho e Hilbig, 2005](#)) humano é uma intrincada estrutura subcortical no telencéfalo basal importante na percepção, elaboração e consolidação de memória e aprendizado relacionados a comportamentos sociais ([Edwards et al., 1997](#); [de Olmos, 2004](#)). Dessa forma, está envolvido na modulação de funções neuroendócrinas, em mecanismos de respostas viscerais e em padrões complexos de integração de comportamentos, tais como as respostas de medo, defesa, agressividade e reprodução ([Flynn, 1967](#); [Benjamin e Jackson, 1974](#); [Beltramino e Taleisnik, 1978](#); [Carrer, 1978](#); [De Vito e Smith, 1982](#); [Fahrbach et al., 1983](#); [Fuchs e Siegel, 1984](#); [Dunn, 1987](#); [Gloor, 1997](#); [Maren, 1999](#); [Adolphs e Tranel, 2003](#)). A literatura apresenta vários estudos da amígdala em modelos animais ([Gloor, 1997](#); [Rasia-Filho et al., 1999](#); [de Olmos, 2004](#)) e mais recentemente, em seres humanos ([Dall’Oglio et al., 2013, 2015](#)).

O complexo amigdaliano é formado por diversos grupos de núcleos e subnúcleos ([Gloor, 1997](#); [Yilmazer-Hanke, 2012](#)). Compreender esta estrutura heterogênea tornou-se um desafio porque é preciso estabelecer relações filogenéticas, histogenéticas, ontogenéticas, anatômicas, histológicas e funcionais entre diferentes espécies. Estudos em seres humanos são ainda mais difíceis de realizar por todas as limitações que envolvem critérios de inclusão e exclusão de amostras para estudo, pela variabilidade que pode existir dentro de uma mesma população humana e todos os requisitos éticos necessários para sua realização. Adicionalmente, experimentos em modelos animais seguem diferentes metodologias e, quando comparado com o que está descrito para seres humanos, há poucos dados na literatura envolvendo estudos com outros primatas ou mesmo com abordagem detalhada que permita servir de referência para estudos comparativos. O objetivo desta dissertação é descrever os componentes celulares existentes em um dos núcleos amigdalianos humanos e, com isso, sugerir possibilidades de entendimento de suas funções.

### 1.1. Divisão anatômica e conexões amigdalianas

Em seres humanos, o complexo amigdaliano é formado por grupos de núcleos encontrados em ambos hemisférios cerebrais em posição subcortical na região anteromedial do lobo temporal ([Yilmazer-Hanke, 2012](#)). Apresenta um aspecto

macroscópico ovoide assemelhado a uma amêndoa, de onde vem sua nomenclatura original, mas é importante ressaltar que não possui bordos claramente definidos (Brodal, 1981; Everitt, 1995; Gloor, 1997; de Olmos, 2004; Mai et al., 2015). Antero-posteriormente mede em torno de 23mm. Sua largura chega a aproximadamente 31mm e sua dimensão dorso-ventral máxima é de 29mm (Mai et al., 2015; **Figura 1.1**).



**Figura 1.1 (A)** Corte coronal de imagem de ressonância nuclear magnética cerebral mostrando a localização anatômica bilateral do complexo amigdaliano, destacado em vermelho no lado direito. **(B)** Desenho da representação tridimensional mostrando a localização anatômica do complexo amigdaliano novamente identificado em vermelho. Ilustração realizada pelo próprio autor.

O complexo amigdaliano pode ser dividido em três grupos nucleares de acordo com sua organização citoarquitetônica, histoquímica, imunohistoquímica e hodologia (Johnston, 1923; Valverde, 1962; Everitt, 1995; Sorvari et al., 1995; Gloor, 1997; Swanson et al., 1998; Ulfing et al., 2003; de Olmos, 2004; Yilmazer-Hanke, 2012; Dall'Oglio et al., 2013; **Figura 1.2**). São eles:

(1) O grupo de **núcleos basolaterais** (BLNG), também chamado de grupo de núcleos corticais profundos, formado pelo núcleo lateral (La), núcleo basolateral (BL), núcleo basomedial (BM), núcleo paralaminar (PL) e núcleo endopiriforme (Epn).

(2) O grupo de **núcleos corticais superficiais** (sCLR) formado pelo núcleo cortical (nACo), pela área de transição amígdalo-parahipocampal (PHA) e pela área de transição amígdalo-hipocampal (AHi).

(3) O grupo de **núcleos centromediais** (CMEA), sem característica cortical, também denominado de amígdala expandida centromedial, é formado pelos núcleos central (Ce), medial (MeA), intercalados (ICN) e a área de transição amígdalo-estriatal (Astr).

Gloor (1997) considera que, nos mamíferos, o nACo e o MeA fazem parte de outro grupo, dos núcleos córtico-mediais ou também denominada de amígdala vomeronasal que seria, então, composta por outros quatro núcleos:

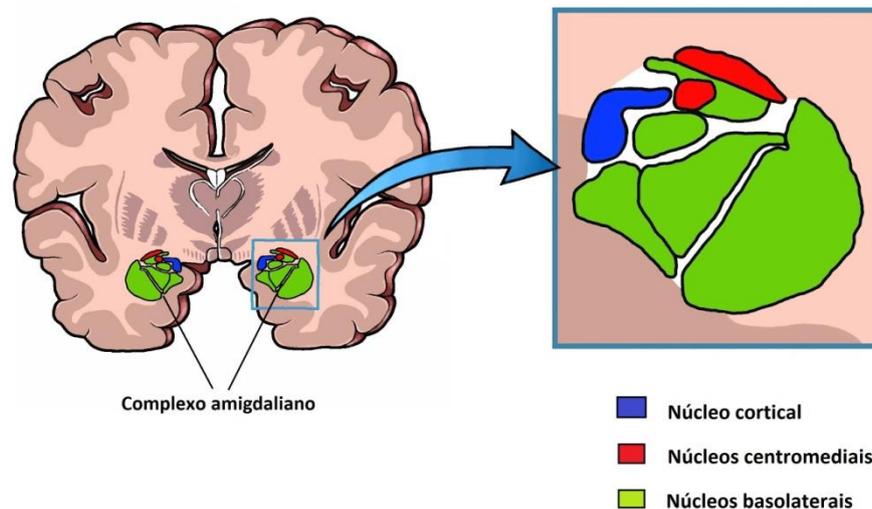
(1) o núcleo do trato olfatório lateral (NLOT), que não pode ser demonstrado em humanos.

(2) o núcleo do trato olfatório acessório (NAOT), que recebe aferências do órgão vomeronasal (OVN), que não estão presentes no cérebro humano pós-natal, mas podem ocorrer na fase embrionária.

(3) o nACo que recebe aferências que processam estímulos olfatórios via trato olfatório lateral.

(4) o MeA com aferência similar ao nACo.

Pelas suas características hodológicas, ambos nACo e MeA são denominados de “amígdala olfatória” e, pelo exposto, o grupo de núcleos córtico-mediais na espécie humana fica reduzido a somente esses dois núcleos.



**Figura 1.2** Corte coronal do cérebro humano com desenho esquemático mostrando os principais núcleos no complexo amigdaliano. O grupo de núcleos basolaterais em verde, o núcleo cortical em azul e os núcleos centromediais em vermelho. O núcleo central está em posição inferior e o núcleo medial em posição superior. Baseado em Mai et al. (2015) e Bear et al. (2016).

As conexões extrínsecas envolvem parte do complexo amigdaliano no sistema límbico. Especificamente, cada núcleo faz parte de uma elaborada circuitaria recebendo aferências principalmente do trato olfatório lateral, do neocórtex, giro hipocampal e giro cingulado. Além disso, recebem sinais oriundos de estímulos visuais, auditivos, gustativos e táteis (Bear et al., 2016).

As eferências amigdalianas são complexas. Nos mamíferos, sobretudo nos primatas, parece conectar-se reciprocamente com regiões allocorticais (pré-piriforme e hipocampal), para várias regiões mesocorticais e para outras isocorticais (Bear et al., 2016). Além disso, há conexões extensas e recíprocas dos diversos núcleos amigdalianos com as regiões que circundam o feixe prosencefálico medial, o prosencéfalo basal e a área pré-óptica no hipotálamo anterior, continuando-se a seguir pelo tronco encefálico. Também, conecta-se com áreas talâmicas e do estriado (Gloor, 1997) projetando suas eferências por dois sistemas principais de saída, a estria terminal e a via amígdalo-fugal ventral. As conexões intrínsecas ocorrem de um modo aparentemente unidirecional em sua maior parte, onde as fibras têm origem primariamente no BLNG, terminando-se no Ce e no MeA (Bear et al., 2016). Para as

sinapses elaboradas no complexo amigdaliano, de acordo com revisão de Gloor (1997), além dos neurotransmissores clássicos como glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA; [Bian, 2013](#)), estão descritos no complexo amigdaliano humano a presença de terminais colinérgicos ([Sims e Williams, 1990](#)); dopaminérgicos; adrenérgicos e serotoninérgicos. Também se descreve a presença da maioria dos peptídeos encontrados no sistema nervoso central de mamíferos, tanto nos corpos neuronais como nos terminais axonais, sendo eles: colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo, somatostatina, neuropeptídeo Y, neurotensina, substância P, encefalina e galanina. Além disso, há neurônios neste complexo que possuem receptores para hormônios esteroides, particularmente estrógenos e andrógenos ([Gloor, 1997](#); [de Olmos, 2004](#)).

## **1.2 Função**

Estudos em modelos animais mostram que cada núcleo encontra-se em circuito envolvido com uma determinada via de transmissão e função ([Amaral et al., 1992](#); [Everitt, 1995](#); [Gloor, 1997](#); [Sah et al., 2003](#); [Li et al., 2015](#); **Figura 1.3**).

Grupo	Núcleos	Aferências	Eferências	Circuitos envolvidos/ Função
BLNG	La	Visuais	Ce, MeA	Medo aprendido Memória emocional
	BL	Auditivos		
	BM	Gustativos		
	PL	Táteis		
	Epn			
sCLR	nACo	MeA, BLNG, trato olfatório lateral, OVN	MeA, BLNG, Ce	Não determinado ainda
	PHA	MeA, BLNG	MeA, BLNG	Não determinado ainda
	AHi			
CMEA	Ce	BLNG, nACo Subst cinzenta periaquedutal Hipotálamo Córtex cerebral		Reação comportamental Respostas simpáticas e parassimpáticas Experiência emocional
	MeA	BLNG, trato olfatório lateral, OVN		Elaboração de emoções Respostas aversivas olfatórias Ações centrais dos hormônios gonadais/puberdade Processos aversivos/faces de medo
	ICN	BLNG		
	Astr	BLNG		Não determinado ainda

**Figura 1.3** Resumo de aferências, eferências e funções dos núcleos do complexo amigdaliano de mamíferos. Em amarelo está o nACo, objeto deste estudo, com função ainda desconhecida em humanos. Em vermelho vias em comum entre o nACo e o MeA. **Legendas:** BLNG: grupo de núcleos basolaterais; sCLR: grupo de núcleos corticais superficiais; CMEA: grupo de núcleos centromediais; La: núcleo lateral; BL: núcleo basolateral; BM: núcleo basomedial; PL: núcleo paralaminar; Epn: núcleo endopiriforme; nACo: núcleo cortical; PHA: área de transição amígdalo-parahipocampal; AHi: área de transição amígdalo-hipocampal; Ce: núcleo central; MeA: núcleo medial; ICN: núcleos intercalados; Astr: área de transição amígdalo-estriatal; OVN: órgão vomeronasal. Baseado em: Amaral et al. (1992), Everitt (1995), Gloor (1997), Li et al. (2015).

O BLNG recebe sinais de estímulos visuais, auditivos, gustativos e táteis. Está envolvido com os circuitos do medo aprendido e na memória emocional (Bear et al., 2016). Os núcleos sCLR (nACo, PHA e AHi) recebem conexões do MeA e do BLNG (Everitt, 1995; Freese e Amaral, 2009). Envia eferências para o MeA para o BLNG e o Ce. Os núcleos CMEA, em especial o MeA, conecta-se com aferência vomeronasal e pode ser que estejam envolvidos na elaboração de emoções e de respostas aversivas olfatórias. Ademais o Ce recebe aferências do BLNG e do nACo, principalmente aferências da substância cinzenta periaquedutal (implicada com a reação comportamental), do hipotálamo (implicações com respostas simpáticas e parassimpáticas) e do córtex cerebral (experiência emocional; Bear et al., 2016).

A forma indireta de buscar compreender as funções dos diversos núcleos da amígdala é relacioná-los com patologias do sistema nervoso central (SNC). Os primeiros casos relatados foram com pacientes que tiveram necessidade de realizar amigdalectomia ou retirada dos terços anteriores dos lobos temporais. Esses pacientes apresentaram a síndrome de Kluver–Bucy com atenuação de emoções, agnosia visual e tendência à exploração de objetos com a boca, dentre outros achados (Hayman et al., 1998; Carroll et al., 1999). Na rara síndrome genética de Urban-Wiethe existe atrofia amigdaliana e diminui a capacidade de reconhecer o medo nas expressões faciais (Staut e Naidich, 1998; Conti e Arnoni, 2015). Nos exames de ressonância nuclear magnética funcional observa-se ativação amigdaliana induzida por medo ou após visualizarem-se expressões faciais zangadas, o que sugere a elaboração de resposta emocional inconsciente principalmente no Ce (Hamann et al., 1999; Bear et al., 2016). Já o BL está implicado com modulação da função visceral, dado o aumento da frequência cardíaca e a elevação da pressão arterial como resposta aprendida a estímulos emocionais. Tal ação também ocorre ao ser visualizada imagem de tema assustador (Breiter et al., 1996).

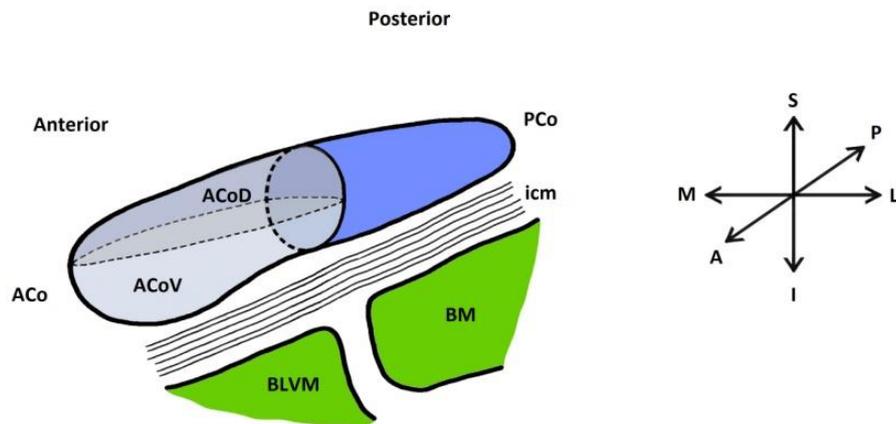
Por fim, o complexo amigdaliano também tem sido relacionado em algumas patologias degenerativas do SNC, como no caso da Doença de Alzheimer (Benzing et al., 1992), na Coreia de Huntington (de Olmos, 2004), na epilepsia do lobo temporal (Pitkänen et al., 1998), em alguns distúrbios psiquiátricos como no transtorno bipolar (Garrett e Chang, 2008), em comportamentos agressivos e defensivos, geralmente associados a depressão, no transtorno do estresse pós-traumático (Protopopescu et al., 2005; Rasia-Filho e Hilbig, 2005; Aust et al., 2014), no autismo (Zirlinger e Anderson, 2003; Schumann e Amaral, 2006; Amaral et al., 2008) e na esquizofrenia (Fudge e Emiliano, 2003).

## 2. O núcleo da amígdala cortical

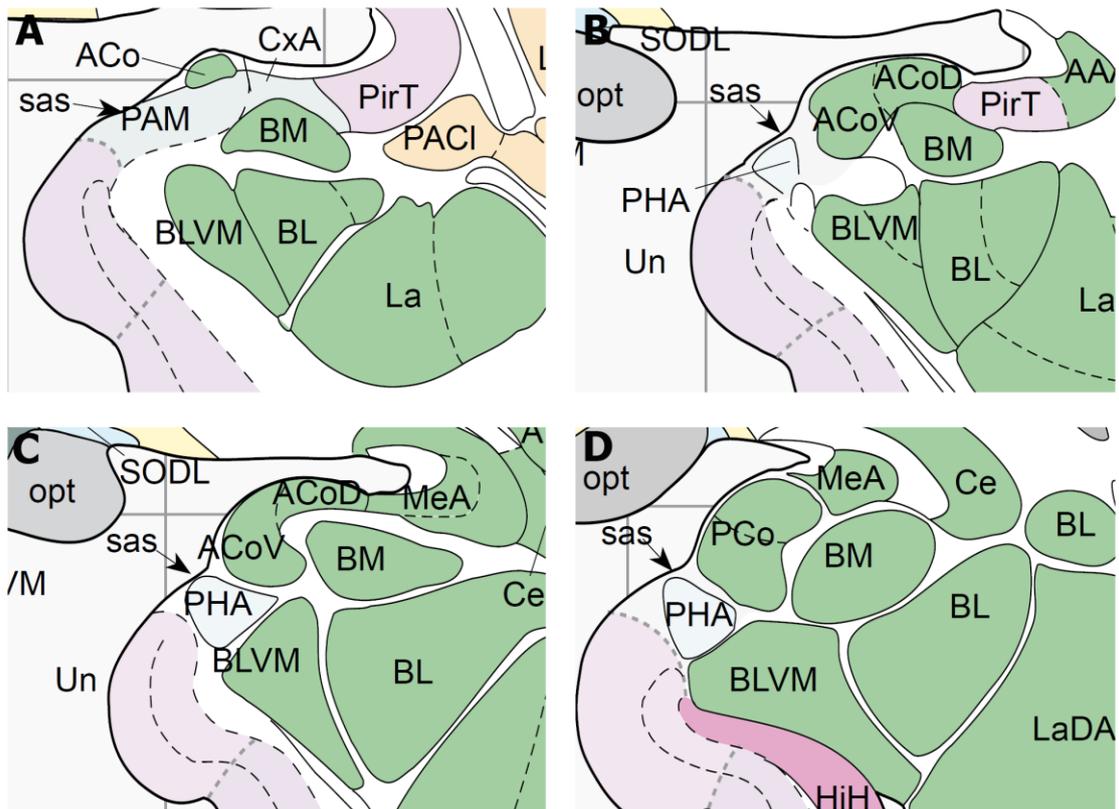
### 2.1 Anatomia

O nACo, assim como o PHA e AHi, faz parte do sCLR. O nACo está localizado de forma superficial medial na porção superior do complexo amigdaliano, lateralmente ao sulco semianular do lobo temporal, superior aos núcleos que compõem o BLNG sendo separado pelo feixe de fibras caudomedial intermediária (icm) e, medialmente ao MeA (de Olmos, 2004; Yilmazer-Hanke, 2012). Possui formato alongado que se estende ao longo da maior parte do eixo anteroposterior deste complexo medindo em torno de 11,3mm, com largura mediolateral de aproximadamente 5mm em sua maior porção e altura próximo de 4,5mm (Mai et al., 2015).

O nACo humana pode ser dividido em duas partes no plano coronal: o núcleo da amígdala cortical anterior (ACo), que correspondente aos primeiros 5,7mm de extensão e e o núcleo da amígdala cortical posterior (PCo), ocupando os 5,6mm restantes. A ACo pode ser subdividida adicionalmente em duas outras regiões. A parte dorsal do núcleo da amígdala cortical anterior (ACoD) em posição superior e a parte ventral do núcleo da amígdala cortical anterior (ACoV) em posição inferior (Mai et al., 2015; Figuras 1.4 e 1.5). Tais delimitações necessitam, no entanto, de maior embasamento metodológico que as justifiquem e, cautelosamente, considera-se que os bordos precisos do nACo e de cada subnúcleo necessitam de estudos adicionais baseados na citoarquitetura local, marcadores celulares, hodologia e funções elaboradas.



**Figura 1.4** Representação tridimensional do núcleo da amígdala cortical e suas subdivisões. **Legendas:** ACo: amígdala cortical anterior; ACoD: amígdala cortical dorsal; ACoV: amígdala cortical ventral; BLVM: núcleo basolateral ventromedial; BM: núcleo basomedial; icm: *intermediate caudomedial fiber system*; PCo: amígdala cortical posterior. Coordenadas: S: superior; I: inferior; M: medial; L: lateral; A: anterior; P: posterior. Baseado em Mai et al. (2015).



**Figura 1.5.** Desenho esquemático dos componentes do núcleo cortical da amígdala humana em cortes coronais sequenciais no sentido ântero-posterior. (Em **A**, 1,3mm; em **B**, 2,7mm; em **C**, 4,0mm; e, em **D**, 6,7mm posterior a plano de corte arbitrário na altura da comissura anterior). **Legenda:** AAA: área da amígdala anterior; ACo: amígdala cortical anterior; ACoD: amígdala cortical dorsal; ACoV: amígdala cortical ventral; AI: ilha da amígdala; AStr: área de transição amígdalo-estriatal; BL: basolateral; BLVM: basolateral ventromedial; BM: basomedial; Ce: amígdala central; CxA: área de transição corticoamigdaliana; Ent: cápsula do córtex entorrinal; La: lateral; LaDL: amígdala lateral dorsolateral; LiCl: claustró limitante; HiH: cabeça hipocampal; opt: tracto óptico; MeA: amígdala medial; PACI: claustró periamigdaliano; PAM: córtex periamigdaliano; PCo: amígdala cortical posterior; PHA: área de transição da amígdala parahipocampal. PirT: córtex piriforme; Puv: putamen ventral; sas: sulco semianular; SODL: região dorso lateral do núcleo supraóptico; TCl: claustró temporal; TLV: corno temporal do ventrículo lateral; Un: uncus; unc: fascículo uncinato. Adaptado de Mai et al. (2008) e conferido na versão do atlas de Mai et al. (2015).

Existe, além disso, uma urgente necessidade de unificar a terminologia anatômica empregada para descrever o nACo humana. De fato, a terminologia usada na literatura é inconsistente e por vezes contraditória (**Figura 1.6**).

Gloor (1997)	de Olmos (2004)		Mai et al. (2015)
Dorsolateral (dorsal)	ACo	DACo	ACoD
Ventromedial (ventral)		VACo	ACoV
	VCo	RVCo	PCo
		CVCo	

**Figura 1.6** Correlação de divisão anatômica dos núcleos da amígdala cortical humana conforme os principais autores. **Legenda:** ACo: amígdala cortical anterior; VCo: amígdala cortical ventral; DACo: amígdala cortical anterior dorsal; VACo: amígdala cortical anterior ventral; RVCo: amígdala cortical ventral rostral; CVCo: amígdala cortical ventral caudal; ACoD: amígdala cortical anterior dorsal; ACoV: amígdala cortical anterior ventral; PCo: amígdala cortical posterior. Baseado em Gloor (1997), de Olmos (2004), Mai et al. (2015).

As diferentes terminologias e subdivisões propostas até o momento refletem a complexidade em localizar os subnúcleos do nACo (Gloor, 1997; de Olmos, 2004; Mai et al., 2015) e dificuldades nas tentativas de simplificar critérios para delimitação nuclear somente baseados na interpretação da citoarquitetura desse núcleo. Adicionalmente, de Olmos (2004), baseado em extensa revisão de literatura e achados em vários mamíferos, dividiu cada subnúcleo cortical em camadas, relacionando-as com o achado de metais pesados e neurotransmissores encontrados em cada região. Segundo tais critérios todos os subnúcleos do nACo apresentam três camadas com componentes e densidades celulares características, a saber:

**a) Parte dorsal do núcleo da amígdala cortical anterior (ACoD):** localizada anteriormente e em posição dorsolateral no nACo, apresenta-se com uma distribuição homogênea de fibras nervosas em sua estrutura. Suas camadas são razoavelmente bem estruturadas. Sua separação com os núcleos basomediais é feita de forma evidente pelo icm. Três camadas ocorrem da seguinte forma:

Primeira camada: ampla camada molecular com grande quantidade de células da glia. Apresenta grande quantidade de pequenos neurônios fusiformes e poucos neurônios grandes tipo *pyramidal-like*.

Segunda camada: campo com distribuição de neurônios homogênea.

Terceira camada: campo com distribuição de neurônios igualmente homogênea.

**b) Parte ventral do núcleo da amígdala cortical anterior (ACoV):** localizada anteriormente e em posição ventromedial no nACo, apresenta-se com uma distribuição randômica de fibras nervosas. Suas camadas são bem mais estruturadas

em comparação com a ACoD. Sua separação dos núcleos basomediais é feita pelo icm de forma bem evidente.

Primeira camada: pequena camada molecular que apresenta moderada quantidade de células da glia. Observam-se neurônios fusiformes e neurônios tipo *pyramidal-like*. Camada pobre em fibras.

Segunda camada: ocorrem neurônios fusiformes difusamente agrupados. Camada pobre em fibras.

Terceira camada: neurônios fusiformes difusamente agrupados. Camada rica em fibras.

**c) Núcleo da amígdala cortical posterior (PCo):** localizada posteriormente ao núcleo da amígdala cortical anterior (ACoD e ACoV), sua separação com os núcleos basomediais é feita pelo icm mas os limites não são claros.

Primeira camada: Observamos densidade acentuada de células tipo *fork-like*.

Segunda camada: densidade menos acentuada de células tipo *fork-like* em comparação com a primeira camada. Presença de neurônios de forma angular.

Terceira camada: pouca densidade de células tipo *fork-like* em comparação com a segunda camada. Presença de neurônios de forma angular.

De acordo com de Olmos (2004), o nACo apresenta baixa quantidade zinco em vesículas sinápticas em comparação com os demais núcleos do complexo amigdaliano. Há pequena concentração deste metal nas primeiras camadas deste núcleo, aumentando a concentração progressivamente até sua terceira camada. Esses neurônios contendo zinco são glutamatérgicos (Frederickson et al., 1992, 2000). O nACo recebe conexões da MeA e do BLNG e envia eferências para a MeA, para o BLNG e para a Ce (Everitt, 1995; Freese e Amaral, 2009). Essas interrelações de conexões podem relacionar esta estrutura com a função do órgão vomeronasal em humanos (Casas et al., 1998; Monti-Bloch et al., 1998; Meredith, 2001).

## 2.2 Tipos neuronais

A classificação dos tipos de neurônios no complexo amigdaliano humano foi feita inicialmente assumindo-se a existência de três tipos morfológicos principais identificados de acordo com estudos imunohistoquímicos para calretinina e

parvalbumina (Sims et al., 1990; Sorvari et al., 1995, 1996; Spiga et al., 2011). São eles:

(a) Tipo 1 – Neurônios **multipolares** com soma **esférico**, de onde surgem de três até onze dendritos primários, geralmente com espessuras similares e que tipicamente se ramificam em diversos ramos secundários ainda próximos ao corpo celular.

(b) Tipo 2 – Neurônios **multipolares** com soma de aspecto **estrelado** ou multiangulares de onde surgem ramos dendríticos primários que dão origem a diversos ramos colaterais.

(c) Tipo 3 – Neurônios **multipolares** cujos corpos celulares **fusiformes** dão origem a dendritos em polos opostos e que podem se ramificar tanto perto do soma como a longas distâncias deste.

Não obstante, em estudo mais recente da MeA humana foram encontrados cinco tipos morfológicos neuronais nesse núcleo (Dall'Oglio et al., 2013). Com isso, utilizando-se a técnica de Golgi, os autores fizeram nova classificação dos neurônios encontrados na MeA, de acordo com sua forma, número de dendritos primários e padrão de ramificação dendrítica (Dall'Oglio et al., 2013, 2015), como segue:

**(1) Neurônios fusiformes:** com tamanhos pequeno e grande e dois dendritos primários.

**(2) Neurônios com soma angular:** com três dendritos primários sem definição basal ou apical evidente e com pouca ramificação.

**(3) Neurônios em forma de pera (*pear-shaped*):** com dois dendritos primários surgindo de corpo celular com formato característico.

**(4) Neurônios de forma ovoide (*Ovoid cell body* ou *stellate neurons*):** pequenos neurônios com mais de quatro dendritos primários com vários ramos pequenos e finos.

**(5) Neurônios com soma retangular:** com tamanho variando de pequeno a grande, com quatro dendritos primários simetricamente posicionados e com ramificação esparsa.

Essa descrição morfológica serviu como referência para orientação de estudo e comparação com os tipos morfológicos neuronais encontrados no nACo.

Adicionalmente, células de forma piramidal foram descritas no MeA humano por Sims e Williams (1990), o que é contrário aos achados de Dall'Oglio et al. (2013). Provavelmente os neurônios com soma angular poderiam se assemelhar as características de células piramidais ou *pyramidal-like* o que poderia provocar esta confusão (Dall'Oglio et al., 2013). Isso porque um típico neurônio piramidal tem soma triangular ou cônico e dendrito apical único característico e que se estende até uma superfície reconhecível. Apresenta dendritos basais que surgem e se ramificam na base do soma. Seus espinhos dendríticos cobrem as porções mais distais dos dendritos nos seus ramos primários, ramos secundários e ramos terciários (Jones e Peters, 1984).

### 2.3 Espinhos dendríticos

Espinhas dendríticas são estruturas especializadas que estabelecem conexões com aferências sinápticas. A densidade de espinhas dendríticas reflete o aporte sináptico que o neurônio recebe (Toni et al., 1999). As diferentes morfologias dos espinhas dendríticos apresentando formas, tamanhos, densidades e diversos graus de complexidade sugerem modulações diferenciais na atividade sináptica, variando desde amplificações de respostas até compartimentalização de eventos bioquímicos e biofísicos sem afetar a voltagem do dendrito adjacente (Alvarez et al., 2007; Arellano et al., 2007; Dall'Oglio et al., 2008a, b, 2015; Arpini et al., 2010; Brusco et al., 2010).

Em estudo realizado na MeA de humanos com a técnica de Golgi, espinhas dendríticas foram observados nos dendritos, desde os ramos primários até os ramos mais distais. Alta e baixa densidade de espinhas dendríticas foram achados ao longo de ramos dendríticos no mesmo neurônio. A densidade de espinhas dendríticas também variou entre tipos neuronais diferentes. Os neurônios de formato ovoide apresentaram particularmente alta densidade de espinhas dendríticas em toda a extensão dos ramos dendríticos, independentemente do tamanho dos seus ramos (Dall'Oglio et al., 2015).

A classificação dos espinhas dendríticos baseia-se em detalhes de sua forma (Valverde, 1962; Peters e Kaiserman-Abramof, 1970; Woolley e McEwen, 1993; Wearne et al., 2005; Arellano et al., 2007; Kim et al., 2007; Brusco et al., 2008, 2010; Dall'Oglio et al., 2010, 2013) considerando:

- (1) o comprimento total do espinho,
- (2) o comprimento do pedúnculo ou pescoço,
- (3) o diâmetro do pescoço,

- (4) o formato e diâmetro do bulbo ou cabeça, e
- (5) o número de protrusões a partir do pescoço.

Os espinhos dendríticos apresentam formas, distribuição e densidades características a cada tipo neuronal (Jones e Powell, 1969; Peters e Kaiserman-Abramof, 1970; Jones e Peters, 1984; Gonzales-Ramirez et al., 2014). Estes têm como função primária ser a estrutura modulatória da atividade pós-sináptica da célula (Yuste, 2013). As diferentes formas e tamanhos dos espinhos dendríticos envolvem variações na superfície da membrana celular, que disponibilizam à densidade pós-sináptica, receptores para transmissores químicos produzindo respostas aos processos sinápticos aferentes (Segal, 2005, 2010; Ivenshitz e Segal, 2010; Tonnensen et al., 2014). Peters e Kaiserman-Abramof (1970) classificam inicialmente os espinhos dendríticos em tipo fino (*thin*), tipo achatado ou espesso (*stubby/wide*) e espinhos dendríticos tipo cogumelo (*mushroom*). Baseados nos dados publicados por Brusco et al., (2010) em ratos e Dall'Oglio et al., (2015) em humanos (**Figura 1.7**), os autores complementam a classificação dos espinhos dendríticos com base nos principais achados estruturais considerando sua morfologia da seguinte maneira:

**(1) Espinhos finos:** apresentam um formato com pescoço relativamente longo e fino terminando em uma cabeça de pequeno diâmetro (Jones e Powell, 1969; Jones e Peters, 1984).

Os espinhos dendríticos com grandes bulbos ou cabeças podem aumentar a compartimentalização bioquímica (Shepherd, 1996; Nimchinsky et al., 2002; Segal, 2005). Espinhos dendríticos finos, com seus pescoços compridos e de pouco diâmetro, podem gerar maior resistência à difusão iônica após a ativação sináptica na cabeça do espinho (Yuste, 2013; Tonnensen et al., 2014). Como espinhos finos e longos são notáveis em neurônios humanos, é possível que este tipo morfológico represente uma proporção de espinhos que pode modificar sua forma de acordo com a demanda sináptica, servindo assim como modulador da função neuronal com alto grau de plasticidade (Yuste, 2013).

**(2) Espinhos achatados ou espessos:** têm por característica serem curtos, grossos, amplos e achatados. Tem superfície com projeções rugosas e ausência de um pedúnculo notável (Jones e Peters, 1984).

De uma forma geral, os espinhos dendríticos espessos ou amplos, por não apresentar um pescoço evidente, estão mais sujeitos a inter-relações de voltagem com seu dendrito adjacente e, basicamente, podem gerar respostas eletrofisiológicas mais

intensas e menos moduladas que as feitas nos demais espinhos (Segal, 2005, 2010; Ivenshitz e Segal, 2010). As respostas pós-sinápticas mediadas por espinhos achatados podem ser rápidas para sustentar a excitabilidade dendrítica por mais tempo (Tonnessen et al., 2014) e gerar potenciais somáticos de menor amplitude, mas de duração maior (Yuste, 2013).

**(3) Espinhos tipo cogumelo (*Mushroom spine*):** caracteriza-se por apresentar um bulbo terminal grande e um pedúnculo mais grosso do que o do espinho fino (Peters e Kaiserman-Abramof, 1970).

Estes espinhos são morfológicamente heterogêneos, tem maior densidade pós-sináptica e podem aumentar fortemente a sua sinalização reforçando a presença de maior número de receptores de tipo AMPA para o glutamato (Van der Zee, 2015). A força sináptica desses espinhos pode ser progressivamente maior nos dendritos distais (Gulledge et al., 2012; Harnett et al., 2012).

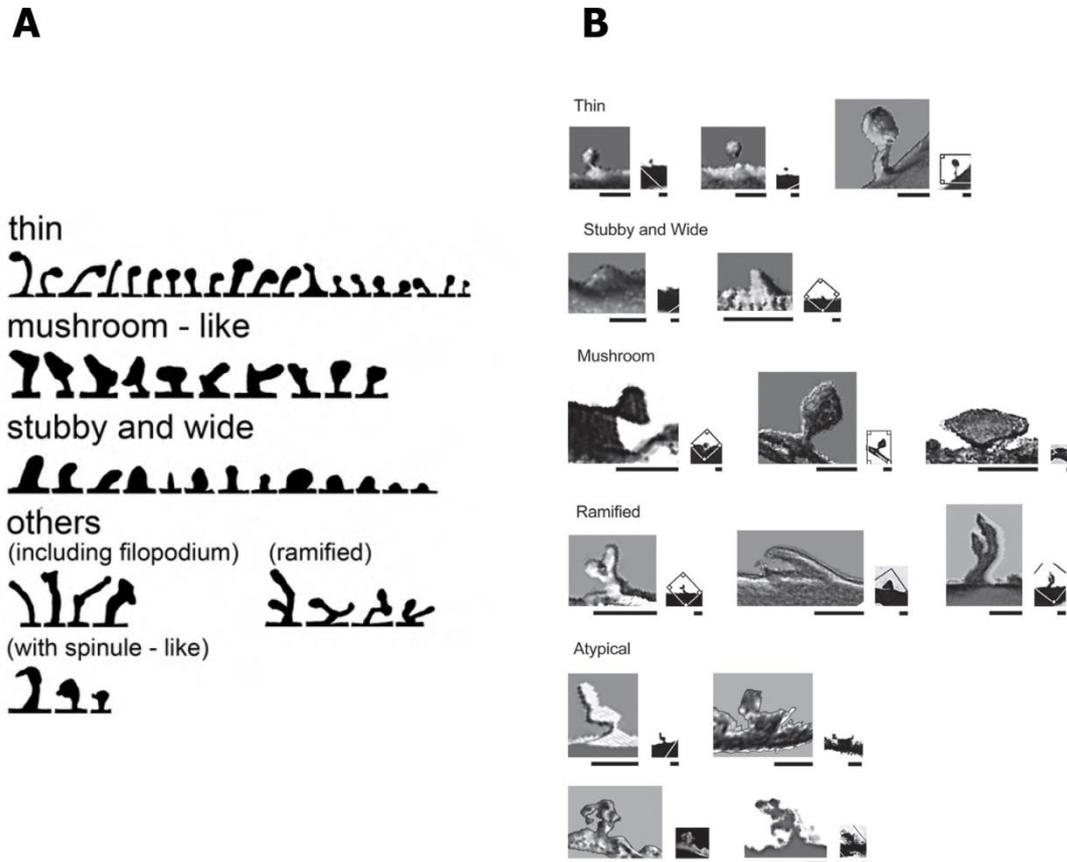
**(4) Espinhos ramificados:** parecidos aos espinhos finos, porém apresentam um pedúnculo inicial que se divide em dois ramos e cada ramo forma distalmente um bulbo terminal (Gonzales-Ramirez et al., 2014).

Teoricamente, os espinhos dendríticos ramificados podem ter sinapses em cada cabeça, separadamente, cuja compartimentalização nestes espinhos poderia conferir especificidade temporal e espacial em microdomínios para cada contato (Chen e Sabatini, 2012).

**(5) Espinhos atípicos ou de transição:** existem diversas e complexas formas de apresentação. Os espinhos dendríticos atípicos podem representar formas transitórias entre os outros tipos ou aspecto não classificável classicamente. Ou seja, como nos demais tipos, esta classificação sugere que os espinhos estejam em um *continuum* dinâmico de formas e tamanhos a se refletir na plasticidade sináptica e no processamento de informação (Garcia-Lopez et al., 2010).

A presença de espínulas reforça essa proposição. Essas pequenas protruções na membrana celular do espinho dendrítico podem se relacionar com a passagem de macromoléculas e/ou com o acoplamento elétrico entre elementos pré- e pós-sinápticos (Tarrant e Routtenberg, 1977; Stewart et al., 2014). Adicionalmente, as espínulas podem ocorrer durante o crescimento e remodelamento de membranas sinápticas (Matus, 2000; Stewart et al., 2014). Pode ser indicativo do aumento de atividade sináptica local (Tao-Cheng et al., 2009), assim como ocorre após

potenciação da atividade neuronal de longa duração ou para aumentar a mobilidade e o deslocamento do espinho no neurópilo (Matus, 2000; Stewart et al., 2014).



**Figura 1.7** Reconstruções de imagens de microscopia de luz representativas das diferentes morfologias de espinhos dendríticos impregnados pela técnica de Golgi. **(A)** Estudo realizado na amígdala medial em ratos. Adaptado de Brusco et al. (2010). **(B)** Estudo realizado na amígdala medial em humanos. Adaptado de Dall'Oglio et al. (2015).

Existem limitações técnicas para o estudo de espinhos dendritos envolvendo tecido humano pós-morte que são susceptíveis a anóxia, distúrbios autolíticos e edema que levam a alterações relativas no número e na forma dos espinhos dendríticos (Fiala et al., 2002; García-López et al., 2007). Guardados os cuidados em se proceder a este tipo de estudo, pode-se determinar se os neurônios em uma área de interesse apresentam espinhos e qual os aspectos gerais de sua distribuição, densidade e forma.

## 2.4 Células da glia: astrócitos

As células glia ou neuroglia são células não neuronais classificadas em dois grupos principais: microglia e macroglia (células endimárias, células de Schwann, oligodendroglia e astroglia). A astroglia refere-se a uma população heterogênea onde estão incluídos os astrócitos (Garcia-Segura e McCarthy, 2004). Guardadas as propriedades individuais, as células glia mantêm a homeostase iônica modulam a transmissão sináptica em todas suas etapas, formam a bainha de mielina, participam da resposta imunológica local e remoção de fragmentos celulares além de fornecer suporte metabólico para neurônios (Picker e Goldring, 1982; Araque et al., 1999; Halassa e Haydon, 2010; Dityatev e Rusakov, 2011). Dentre as células da glia, os astrócitos são os mais numerosos no córtex cerebral (Vaughan e Peters, 1974; Pope, 1978; O’Kusky e Colonnier, 1982). Observam-se dois tipos de astrócitos: os fibrosos são mais encontrados na substância branca e os protoplasmáticos na substância cinzenta (Vaughan, 1984; Emsley et al., 2006; Sofroniew et al., 2010). São também, as maiores células da neuroglia apresentando corpo celular com formato arredondado ou oval com vários processos que se irradiam do soma (Takato e Goldring, 1979; Vaughan, 1984). A extensa distribuição de seus ramos é consistente com a proposta de que elas estão implicadas na manutenção da composição do líquido extracelular no parênquima nervoso (Varon e Somjen, 1979; Gardner-Medwin, 1981). Além disso, estudos de eletrofisiologia demonstram que os astrócitos são acoplados eletricamente a outros astrócitos por *gap-junctions*, as quais permitem a passagem de íons e pequenas moléculas livremente de uma célula a outra (Revel e Karnovsky, 1967; Brightman et al., 1969).

Em recente descrição sobre a MeA humana, há maior número de células gliais em relação a neurônios (cerca de  $\frac{3}{4}$  das células são gliais) e utilizando-se a técnica imunohistoquímica para detecção da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), filamento intermediário componente do citoesqueleto, observaram-se tanto astrócitos com aspecto fibroso quanto protoplasmático (Dall’Oglio et al., 2013, 2015). Esses astrócitos estavam isolados ou em agrupamentos e exibiam um padrão de ramificação profuso e complexo no neurópilo (Dall’Oglio et al., 2013). Até o momento, não existem estudos onde estejam descritos a distribuição e o aspecto dos astrócitos no nACo humano.

## II. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVAS

Devido a posição anatômica que o nACo humana ocupa, com possível característica transicional para o allocórtex, surge a hipótese de que os neurônios no nACo humana sejam similares aos piramidais, sem organização colunar ou em várias camadas celulares.

A descrição detalhada dos componentes celulares (neurônios e astrócitos) especificamente no nACo humana ainda é ausente na literatura. O conhecimento detalhado da citoarquitetura deste núcleo poderá fornecer informações e subsídios importantes para a compreensão e funcionalidade desta complexa estrutura.

### III. OBJETIVOS

#### 1. Objetivo geral

Descrever os componentes celulares, neurônios e astrócitos, presentes no núcleo da amígdala cortical humana, buscando obter dados sobre sua morfologia. Para neurônios, estudar e classificar tais células de acordo com o aspecto do soma, presença e número de dendritos e seu padrão de ramificação, conjuntamente com a identificação da presença, distribuição, densidade e formas dos espinhos dendríticos em cada tipo identificado. Para astrócitos, descrever a presença, distribuição e padrão de ramificação dos prolongamentos desse tipo glial em cada uma das áreas do núcleo de interesse.

#### 2. Objetivos específicos

**Objetivo 1** - Estudar e classificar, de acordo com o aspecto morfológico geral, os neurônios no núcleo da amígdala cortical humana em tecido *post-mortem* de homens adultos com amostras de tecido submetidas à técnica de tionina e à técnica de Golgi adaptada para tecido humano fixado em formol a 10% por longa data.

**Objetivo 2** – Estudar e descrever a presença, distribuição, densidade e classificação morfológica dos espinhos dendríticos no núcleo da amígdala cortical humana em *tecido post-mortem* de homens adultos com amostras de tecido submetidas à técnica de Golgi adaptada para tecido humano fixado em formol a 10% por longa data.

**Objetivo 3** – Estudar e descrever características morfológicas de astrócitos no núcleo da amígdala cortical humana em tecido *post-mortem* de homens adultos com amostras de tecido submetidas à técnica de tionina, à técnica de imunohistoquímica para a proteína ácida fibrilar glial e à técnica de Golgi adaptada para tecido humano fixado em formol a 10% por longa data.

## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Autorização para estudo

Para esta pesquisa que envolve humanos foram seguidas todas as recomendações das instâncias que regulam e normatizam os conceitos médico-legais e os relacionados aos Comitês de Ética e Pesquisa. Portanto, todos os experimentos foram realizados de acordo com as leis nacionais em vigor (Diretrizes e Normas do Sistema Nacional de Informações sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos - SISNEP e do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP/resolução 196/96, ambos vinculados ao Conselho Nacional de Saúde – CNS, Ministério da Saúde – MS, Brasil; <http://portal2.saude.gov.br/sisnep/>) para trabalho científico com seres humanos. Este material foi originalmente coletado e processado de acordo com normas e requisitos legais das seguintes instituições:

- Comitê de Ética do Departamento de Medicina Forense (“Instituto Geral de Perícias”, Cidade de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul. Processo nº 03 / 08);
- Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA, Processo nº 541 / 07); e
- Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, Processo nº 20080 / 09).

Todos os documentos comprobatórios encontram-se no Anexo I da presente dissertação.

### 2. Amostras para estudo

As amostras utilizadas para o estudo morfológico, alvo desta dissertação, foram feitas com lâminas contendo cortes histológicos de tecido cerebral humano previamente processados pelas técnicas de Nissl, Golgi e imunohistoquímica para GFAP (publicados em [Dall’Oglio et al., 2013, 2015](#)). A coleta deste tecido humano para o estudo foi realizada no período de 2007 a 2010 e o material foi mantido para posterior estudo. O número total de casos estudados foi de 8 doadores com idades compreendidas entre 47 a 75 anos de idade, todos do sexo masculino (**Figura 4.1**). Como critério de exclusão, os doadores não deveriam ter histórico de doenças

nerológicas e/ou psiquiátricas. Estas informações foram colhidas junto aos familiares no momento do recebimento do material para pesquisa.

Casos	Idade (anos)	Tempo Óbito	Causa da Morte	Data Coleta	Técnicas
1	47	8h	Insuficiência respiratória	Jul.2007	Golgi/Nissl
2	68	6h	Insuficiência cardio-respiratória	Ago.2007	Golgi
3	56	6h	Infarto Agudo do Miocárdio	Set.2007	Golgi/Nissl/GFAP
4	52	10h	Infarto Agudo do Miocárdio	Mai.2008	Golgi/GFAP
5	68	8h 30min	Edema Agudo de Pulmão	Out.2008	Golgi/Nissl/GFAP
6	52	8h	Pneumonia	Ago.2009	Golgi/GFAP
7	75	12h 15min	Pneumonia bilateral	Jan.2010	Golgi/Nissl
8	51	12h	Infarto Agudo do Miocárdio	Jan.2010	Golgi/Nissl

**Figura 4.1** Características dos casos em estudo. Adaptada de Dall'Oglio et al. (2015).

Nas amostras processadas pela técnica de Golgi, foram estudados o hemisfério direito de 5 doadores e o esquerdo na totalidade dos casos (N= 8). Pela técnica da tionina, foram estudados o hemisfério direito de 4 doadores e o esquerdo de 5 doadores. Pela técnica imunohistoquímica para GFAP, foram estudados o hemisfério direito de 3 doadores e o esquerdo de 1 doador.

### 3. Técnicas histológicas

As imagens dos corpos neuronais obtidas pela técnica da tionina foram comparadas com as imagens obtidas pela técnica de Golgi. Os espinhos dendríticos foram observados com as imagens obtidas pela técnica de Golgi. No caso de células da glia, além dessas duas comparações pelas técnicas da tionina e Golgi, procedemos a mais uma observação comparativa pela técnica imunohistoquímica para GFAP.

#### 3.1 Técnica da tionina

A técnica utilizada foi a descrita por Dall'Oglio et al. (2013, 2015) onde realizaram os seguintes procedimentos:

As peças foram coletadas com 6 - 12h *post-mortem* e imersas em solução a 10% de formaldeído não tamponado para preservação, sendo mantidas e estocadas em temperatura ambiente no Laboratório de Anatomia da UFCSPA. Foram retirados gradativamente amostras da área a ser estudada medindo ao redor de 1,5cm<sup>3</sup>.

A partir destes blocos de tecido, secções de 50 µm foram obtidas em vibrátomo e colocadas em lâminas gelatinizadas e deixadas para secar em temperatura ambiente por 24 h. Foram, então, imersos em solução de paraformaldeído 4% em PBS por 7 dias a 4°C protegidos da luz. A seguir, os cortes foram colocados em lâminas histológicas e secos em temperatura ambiente. No dia seguinte, as lâminas foram colocadas em solução de etanol 70% por 24 h, imersas em soluções com concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol absoluto, em concentrações decrescentes de etanol e enxaguadas com água destilada. Procedeu-se, então, à coloração por imersão em solução de tionina (Merck, Alemanha) a 0,25% por 3 min. O excesso de corante foi removido e as lâminas foram imersas em concentrações crescentes de etanol, em solução de etanol 95% e ácido acético 1% e xilol absoluto 4%, cobertas com bálsamo do Canadá sintético e lamínula (Dall'Oglio et al., 2013, 2015).

### **3.2 Método de Golgi**

Das amostras obtidas, conforme descrito anteriormente, parte foi destinada à técnica de Golgi para identificação dos tipos celulares na área de interesse. Para tanto, a partir de blocos de tecido mantidos como descrito acima, cada amostra foi imersa em 50ml de uma solução de fixação contendo paraformaldeído a 4% e ácido pícrico a 1,5% diluídas em tampão fosfato (PBS; 0,1 M; pH= 7,4) durante 30 dias, protegidas da luz e em temperatura ambiente. Após esta fixação foram levadas ao vibrátomo (1000S; Leica, Wetzlar, Germany) onde foram realizados cortes coronais seriados de 200 µm de espessura.

Os melhores resultados foram obtidos quando os cortes foram submetidos a um passo adicional de pós-fixação, acima descrito. Cada corte então foi imerso em 3 ml desta solução por mais 72 h protegidos da luz e em temperatura ambiente. Depois de pós-fixados, foram lavados em PBS durante 2 min e transferidos a uma solução de tetróxido de ósmio a 0,1% (*Sigma Chemicals Co*, EUA) diluído em PBS. Cada corte foi imerso em 3 ml desta solução e mantidos por 20 min, em agitação contínua e protegidos da luz. Após, foram lavados em PBS durante 2 min. Em seguida, os cortes foram imersos em solução de dicromato de potássio a 3% (Merck, Alemanha) diluída em água destilada e mantidos no escuro a 4°C por 48 h. Após isso, cada corte foi lavado com água destilada durante 2 min, colocado entre duas lamínulas e colados os bordos, imerso em solução de nitrato de prata a 1,5% (Merck, Alemanha) diluída em água destilada por 24 h em temperatura ambiente. A seguir, as lamínulas foram quebradas e os cortes foram removidos, lavados com água destilada durante 2 min,

removidos os excessos de cristais como precipitados inespecíficos no tecido, colocados em lâminas histológicas gelatinizadas, secos em temperatura ambiente, imersos em água destilada durante 3 min, desidratados em concentrações ascendentes de etanol (de 70% até 100% durante 3 min), diafanizados em solução de xilol e etanol 100% (na proporção de 1:1 durante 3 min e na proporção de 2:1 durante mais 3 min) e somente xilol absoluto por 3 min. Finalmente as lâminas foram cobertas com bálsamo do Canadá sintético, colocada lamínula e deixado secar durante 24h em temperatura ambiente (Dall'Oglio et al., 2010, 2013).

Para serem estudados, os neurônios deveriam estar bem impregnados pela prata e obedecer os seguintes critérios de seleção:

- (1) Apresentar corpo celular localizado dentro dos limites do nACo,
- (2) Estar relativamente isolado de células vizinhas para que se conseguisse individualizar cada neurônio e evitar emaranhados de dendritos de outras células vizinhas,
- (3) Apresentar ramos dendríticos com bordos bem definidos e,
- (4) Os espinhos dendríticos, quando presentes, deveriam estar claramente distinguíveis ao logo do eixo "z".

Para estudo do padrão de ramificação dendrítica foi empregada a técnica dos círculos concêntricos de Sholl (1956).

### **3.3 Técnica de imunohistoquímica para a proteína ácida fibrilar glial**

Das amostras obtidas, outra parte foi destinada à técnica imunohistoquímica para GFAP, adaptada de protocolos publicados anteriormente (Xavier et al., 2005; Martinez et al., 2006; de Castilhos et al., 2009). Para tanto, a partir de blocos de tecido mantidos como descrito acima, secções de 50 µm foram pós-fixadas com paraformaldeído diluído em PBS e mantidos no escuro a 4°C durante 7 dias. Após, os cortes foram lavados em PBS a 4°C e cada secção foi colocada com Triton X 0,01% (PBS-Tx; Sigma Chemicals Co., EUA) sob agitação, imersa em metanol 10% por 5 min, em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% por 5 min e com soro de cabra (NGS) 1,5% por 60 min. As secções foram incubadas durante uma noite com anticorpo primário monoclonal anti-GFAP diluído em NGS 1,5% e PBS-Tx a 4°C e, a seguir, com anticorpo secundário biotilado anti-coelho (ambos Sigma Chemicals Co., EUA) diluído a 1:200 por 40 min, com o complexo peroxidase avidina-biotina (Dako, Dinamarca) diluído em 1:100 a temperatura ambiente por 60 min, com 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemicals Co., EUA) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,01% em PBS por 10 min. Após lavagem com PBS gelado, os cortes

foram colocados em lâminas gelatinizadas, secos em temperatura ambiente, desidratados com etanol, diafanizados com xilol, aplicado *Entellan* (Merck, Alemanha) como meio de inclusão e colocadas lamínulas.

#### **4. Localização do núcleo cortical da amígdala**

A localização do nACo foi realizada comparando-se cada secção realizada com imagens de atlas elaborado por Mai et al. (2008) e conferidas na versão do atlas de Mai et al. (2015). O giro semilunar, o trato óptico e o sulco semianular serviram como principais referências anatômicas para localização do nACo (Gloor, 1997; de Olmos, 2004). Com isso, o núcleo de interesse foi identificado no eixo ântero-posterior entre 1,3mm a 12mm em relação ao centro da comissura anterior. A nomenclatura, medidas e as abreviaturas utilizadas nesta dissertação são baseadas igualmente nesta mesma referência (Mai et al., 2008) e conferidas na versão do atlas de Mai et al. (2015).

#### **5. Reconstrução de imagens**

As reconstruções bidimensionais de imagens dos neurônios e dos astrócitos encontrados no nACo e a reconstrução tridimensional dos espinhos dendríticos foram realizadas com a seguinte abordagem metodológica:

Cada secção contendo a área de interesse foi estudada utilizando-se microscópio de luz Olympus BX-61 (Japão) que permite aumento de 2000x (lente objetiva Olympus UplanSApo x100 planapocromática; 1,4 de abertura numérica e com emprego de óleo de imersão; e, lente ocular x20) e, em paralelo, com aumento de 1300x com imagem captada por câmara de alta resolução (CCD DP72, Olympus, Japão) acoplada a computador com programa de análise e reconstrução de imagem (Image-Pro Plus 7.0, Media Cybernetics, EUA).

Para aquisição de imagens de neurônios e de astrócitos identificados pela expressão de GFAP utilizamos lente objetiva Olympus UplanSApo x20 planapocromática, 0,6 de abertura numérica e aquisição seriadas de imagem (avanço no eixo "z" de até 0,5  $\mu$ m para cada imagem adquirida) com resolução de 2070 x 1548 pixels. As imagens obtidas foram submetidas à deconvolução logo quando coletadas.

A reconstrução de cada neurônio para identificação de sua morfologia geral foi feita, segmento por segmento de imagem nas coordenadas espaciais, somando-se as imagens onde se encontravam os bordos celulares mais nítidos ao longo do soma e

de todo o comprimento e ramificações de todos os ramos dendríticos. Todos os dados foram obtidos desde seus ramos dendríticos proximais até os mais distais. Para tanto, foi utilizado o programa Adobe Photoshop CS3 (EUA). Pequenos ajustes de brilho e contraste de fundo foram feitos utilizando-se tal programa, tendo-se o cuidado de não alterar qualquer dado morfológico real. O mesmo procedimento foi realizado para as imagens dos astrócitos observados pela técnica imunohistoquímica para GFAP, ambos demonstrados a seguir.

As imagens de espinhos dendríticos foram obtidas com lente objetiva Olympus UplanSApo x100 planapocromática, 1,4 de abertura numérica e com emprego de óleo de imersão, aquisições seriadas de imagem (avanço no eixo “z” de 0,1  $\mu\text{m}$ ) e resolução de 2070 x 1548 pixels. As imagens dos espinhos dendríticos obtidas tiveram aumento final de 1300x e submetidas à deconvolução logo quando coletadas. A observação direta ao microscópio após a reconstrução no computador serviu para dissipar dúvidas e ter certeza que as imagens observadas eram as originalmente amostradas em cada porção dendrítica.

Após realizada a captura de imagens, procedeu-se à reconstrução tridimensional dos espinhos dendríticos. Foi desenvolvido algoritmo de processamento de imagens (R. Reberger e C.R. Jung, Departamento de Informática, UFRGS; comunicação pessoal, dados ainda não publicados). O algoritmo foi implementado no ambiente de programação Matlab R2105b (The MathWorks, EUA) por propiciar rápida elaboração e análise dos resultados. Uma breve descrição do algoritmo é fornecida a seguir (Rasia-Filho et al., 2016): (1) Inicialmente, o algoritmo pré-processou o volume adquirido ao longo do eixo ‘z’ para redução do ‘ruído’ empregando-se filtro da mediana e o filtro ‘morfológico’ do tipo “*bottom-hat*” (Serra, 1982) foi aplicado em cada fatia de imagem bidimensional obtida transversalmente ao eixo ‘z’ para correção de iluminação do tecido a ser analisado. (2) Então, as imagens foram processadas com outro filtro para identificar bordas visualizáveis na imagem, do tipo “*edge-aware*”, o que reduziu o ‘ruído’ espacial sem borrar seus contornos para, a seguir, as estruturas das imagens serem realçadas usando-se filtro do tipo “*unsharp masking*” (Gonzalez e Woods, 2002). (3) As imagens resultantes foram binarizadas a cada profundidade do eixo ‘z’ de modo independente para que fosse feito processamento com base na distância dos componentes conexos detectados próximos ao dendrito selecionado, removendo-se elementos mais distantes dos bordos de interesse e que eram precipitados de prata inespecíficos inerentes ao emprego da técnica de Golgi. (4) O volume 3D de ramo dendrítico e espinhos foi formado pela concatenação das fatias binárias processadas com o emprego de filtro “kernel” Gaussiano ao longo do eixo ‘z’. Após, as imagens

foram novamente binarizadas visando conectar porções do dendrito que eventualmente poderiam não ter sido visualizadas corretamente nas etapas anteriores. (5) Finalmente, para a visualização 3D do volume final dos espinhos dendríticos, empregou-se o programa 'ImageJ', aplicativo 3D - "Volume Viewer", com ajuste de cor e direcionamento da luz incidente nos elementos reconstruídos (Rasband, 1997-2015). Ao final, as formas de todos os espinhos amostrados foram conferidas e confirmadas comparando-as com as imagens microscópicas originais. Toda vez que um espinho pareceu incompleto, principalmente por não apresentar um pescoço visível após sua reconstrução, isso ocorreu porque a própria imagem original estava no limite da resolução do microscópio de luz. Pequenos ajustes finais de contraste e brilho foram feitos com o programa Adobe Photoshop CS3 (EUA), sem alterar qualquer dado morfológico real. Foram obtidos dados referentes à presença, distribuição, número e tipo dos espinhos dendríticos em cada tipo neuronal identificado no nACO humano.

Subsequentemente às reconstruções de imagem, a análise dos resultados foi feita e sua elaboração foi realizada de forma descritiva, como consta no texto a seguir. Para tanto, os espinhos dendríticos foram classificados em finos, achatados, espessos, em formato de cogumelo, ramificados, com aspecto transicional ou atípicos. A presença de espínulas foi igualmente avaliada em cada espinho estudado.

## V. RESULTADOS

### Técnica de Tionina

Tanto na parte anterior quanto na posterior do nACo foram identificados 10 tipos neuronais classificados de acordo com o formato do corpo celular (**Figura 5.1**). A nomenclatura adotada para sua classificação corresponde à existência de:

1. Neurônio Piramidal Modificado (*Pyramidal-like*),
2. Neurônio Fusiforme,
3. Neurônio Angular-Esférico,
4. Neurônio Triangular,
5. Neurônio Retangular,
6. Neurônio Poligonal-Estrelado,
7. Neurônio Redondo-Cônico,
8. Neurônio *Pear Shaped*,
9. Neurônio *Fork-like* e,
10. Neurônio Pequeno.

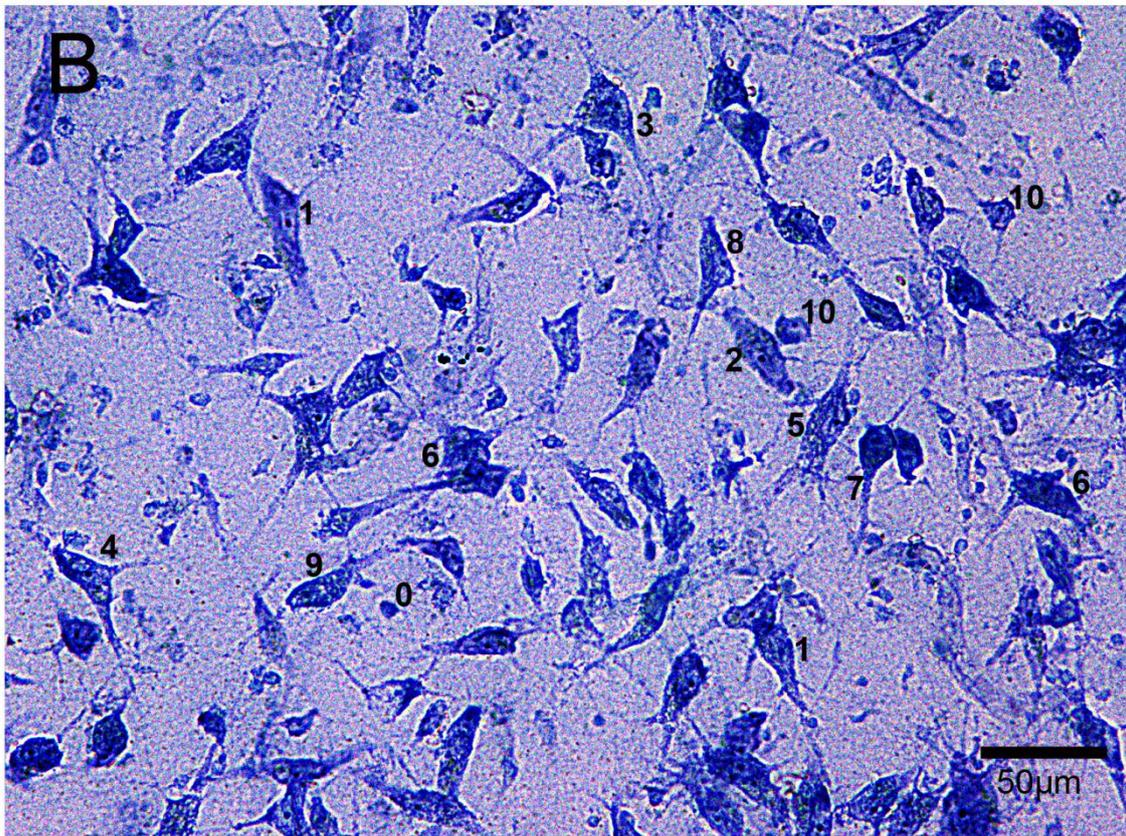
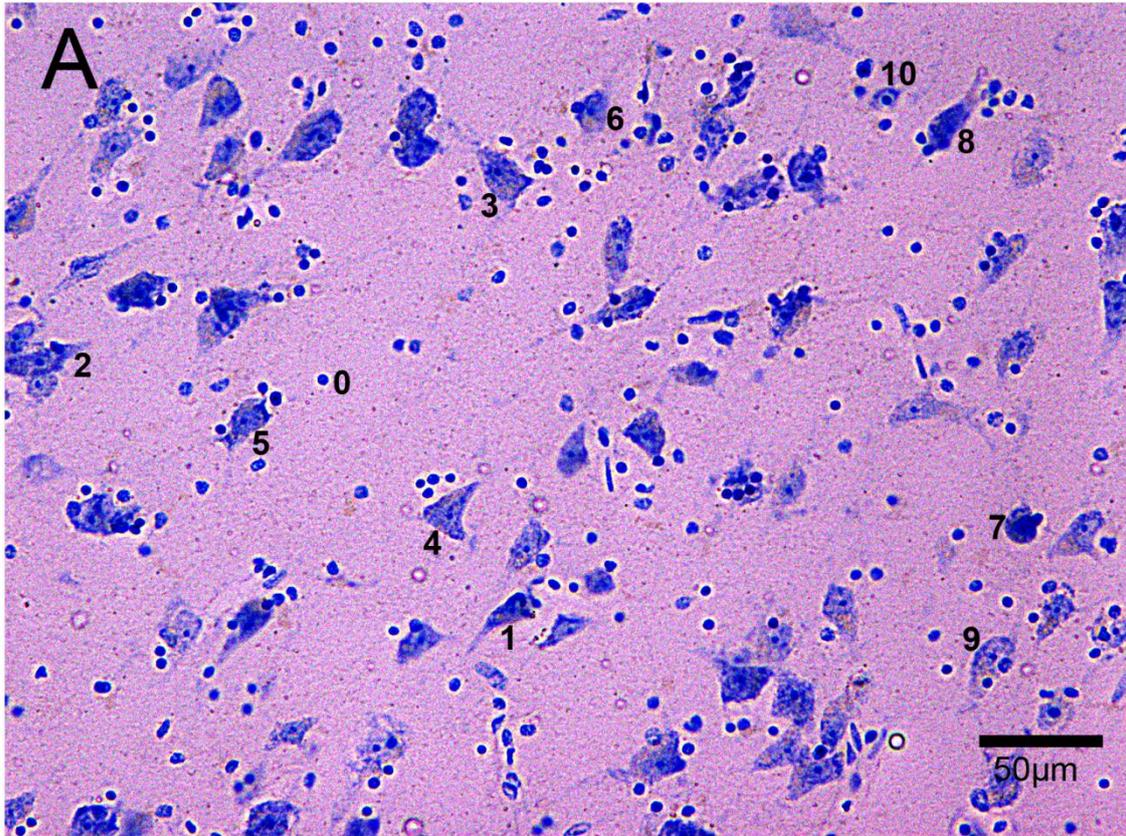


Figura 5.1

**Figura 5.1** Imagem microscópica do parênquima da região anterior (A) e posterior (B) do núcleo cortical da amígdala humana corado pela técnica da tionina. Foram observadas células da glia (0) e neurônios classificados como do tipo *pyramidal-like* (1), fusiforme (2), angular-esférico (3), triangular (4), retangular (5), poligonal-estrelado (6), redondo-cônico (7) *pear shaped* (8), *fork-like* (9) e pequeno (10).

## Técnica de Golgi

Através da técnica de Golgi corroboramos os achados celulares no nACo identificando e fazendo comparativos com as correspondentes formas celulares encontradas na técnica de tionina, onde foram identificados os 10 tipos neuronais de acordo com o aspecto morfológico do corpo celular e o padrão de surgimento e ramificação dendrítica.

**1. Neurônio Piramidal Modificado (*Pyramidal-like*).** Este tipo neuronal foi encontrado em todo o território do nACo. Este neurônio tem características que muito se assemelham a neurônios piramidais clássicos de córtex cerebral, porém são menores e apresentam 1 ramo apical que se ramifica próximo do corpo celular em seu trajeto à superfície pial. O soma tem formato triangular, 2 ramos dendríticos basais, 1 ramo dendrítico apical principal ou até 4 a 5 dendritos que surgem principalmente dos seus vértices. Todos os ramos ramificam-se em ramos colaterais de comprimentos variáveis (**Figura 5.2**). Pela técnica de Sholl, sugere-se que o padrão de ramificação dendrítico é mais proximal ao soma e menor com o aumento da distância de distribuição dos ramos no neurópilo (**Figura 5.3**). Os neurônios do tipo *pyramidal-like* apresentaram densidade alta de espinhos dendríticos em toda a extensão dos dendritos basais e apical, mas com baixa densidade próximo ao corpo celular. Foram observados espinhos isolados ou formando agrupamentos tanto nos ramos dendríticos basais como no apical e seus colaterais. Os espinhos eram de todos os tipos, formando um *continuum* de formas e tamanhos, com notável presença de aspectos de transição ou atípicos (**Figura 5.4**).

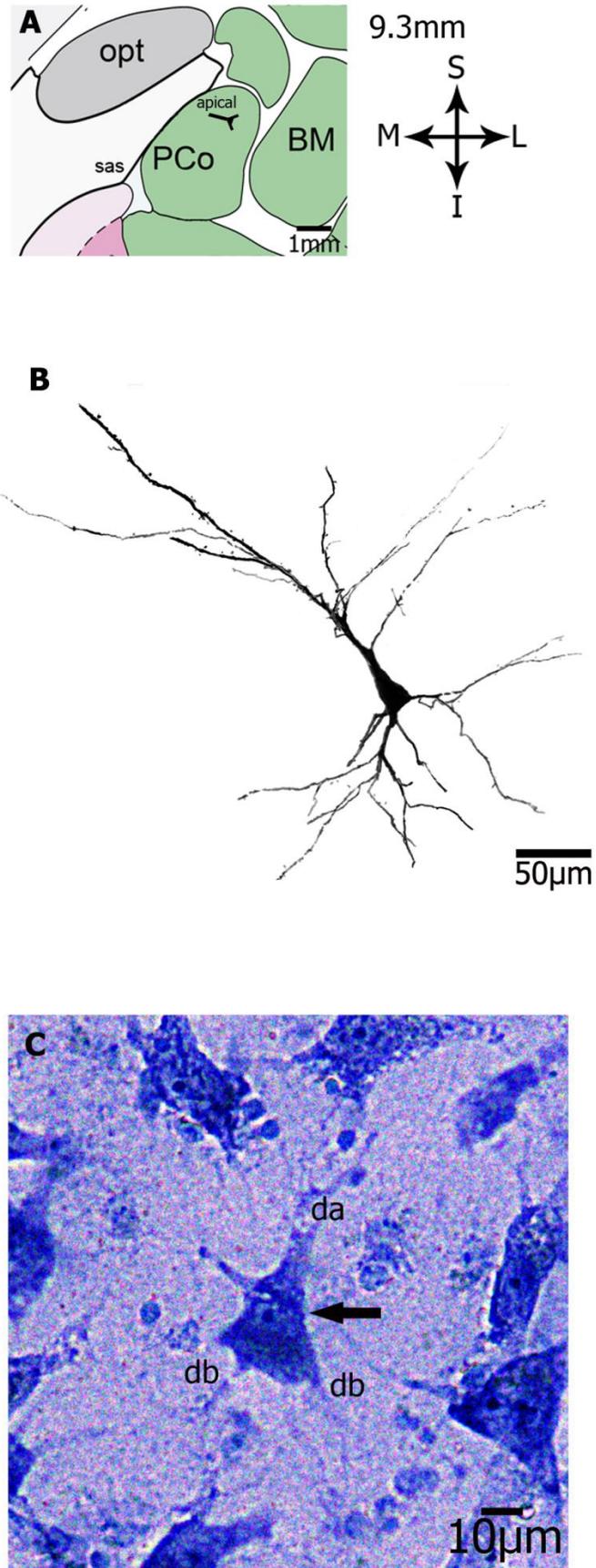
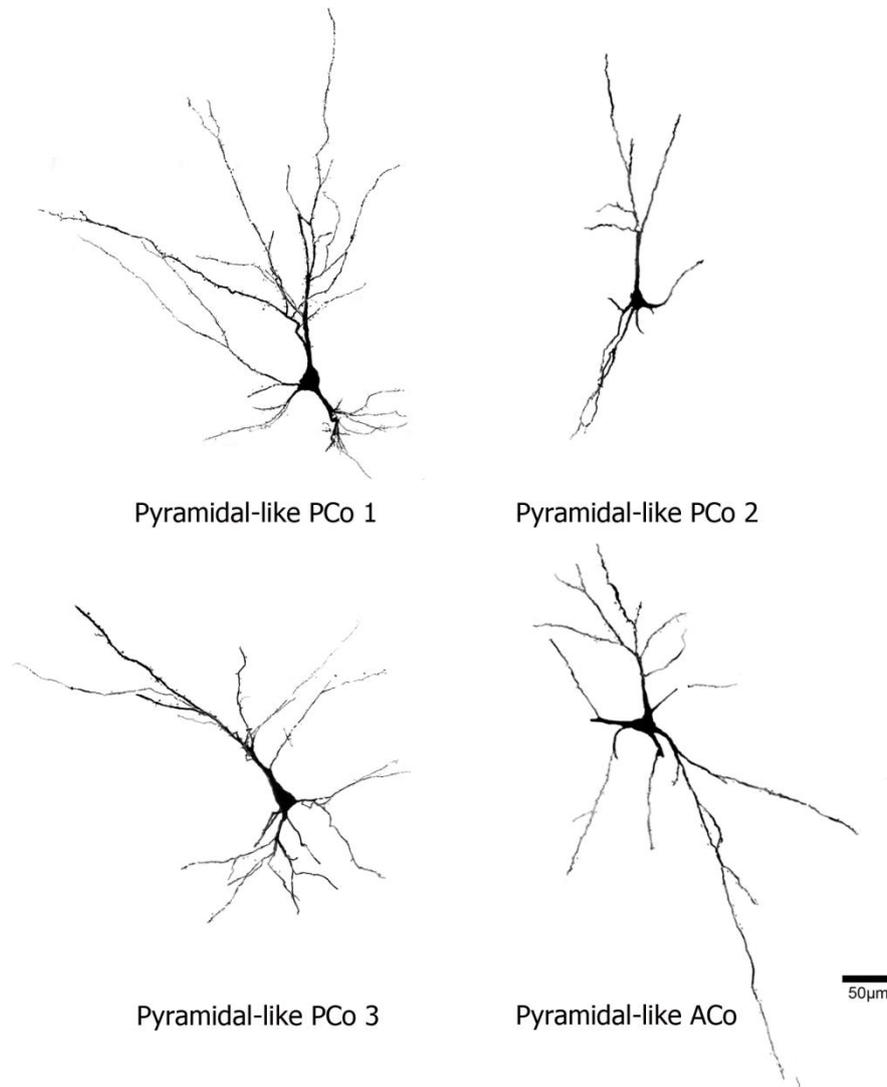
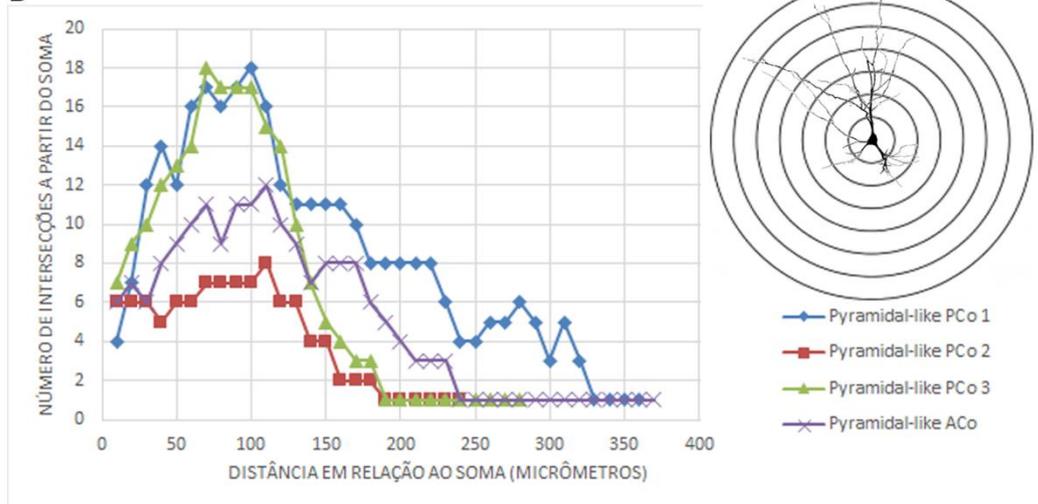


Figura 5.2

**Figura 5.2 Neurônio do tipo *pyramidal-like*.** (A) Desenho esquemático de secção coronal do cérebro adulto humano com a localização do núcleo cortical posterior da amígdala (PCo; 9,3 mm posterior ao ponto médio da comissura anterior; baseado no atlas de Mai et al. (2008). A localização do nACo foi conferida e confirmada na versão do atlas de Mai et al. (2015)), onde foi observado neurônio do tipo *pyramidal-like* e a disposição espacial do corpo celular e ramos dendríticos. Observe que o dendrito apical vai em direção a superfície pial. (B) Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensionalmente de neurônio *pyramidal-like* impregnado pela técnica de Golgi e visualizado por microscopia de luz. (C) Imagem microscópica do corpo neuronal (seta) e dos ramos dendríticos basal (db) e apical (da) de neurônio *pyramidal-like* no núcleo de estudo corado pela técnica da tionina. **Legenda:** BM: núcleo amigdaliano basomedial; sas: sulco semianular; opt: trato óptico; PCo: núcleo amigdaliano cortical região posterior. Coordenadas: S: superior; I: inferior; M: medial; L: lateral.

**A****B****Figura 5.3**

**Figura 5.3 (A)** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensionalmente de neurônios do tipo *pyramidal-like* impregnados pela técnica de Golgi e visualizados por microscopia de luz encontrados na amígdala cortical posterior (PCo) e amígdala cortical anterior (ACo). **(B)** Análise do padrão de ramificação dendrítica empregando-se a técnica dos círculos concêntricos de Sholl (A distancia entre cada círculo concêntrico é de 50 $\mu$ m como ilustrado na parte superior direita da imagem). No gráfico são apresentadas medidas a cada 10 $\mu$ m. Note-se a relação entre o número de ramos dendríticos que passam pelos bordos dos círculos à medida que se estendem pelo neurópilo como indicativo da região dendrítica de predominância de ramificações.

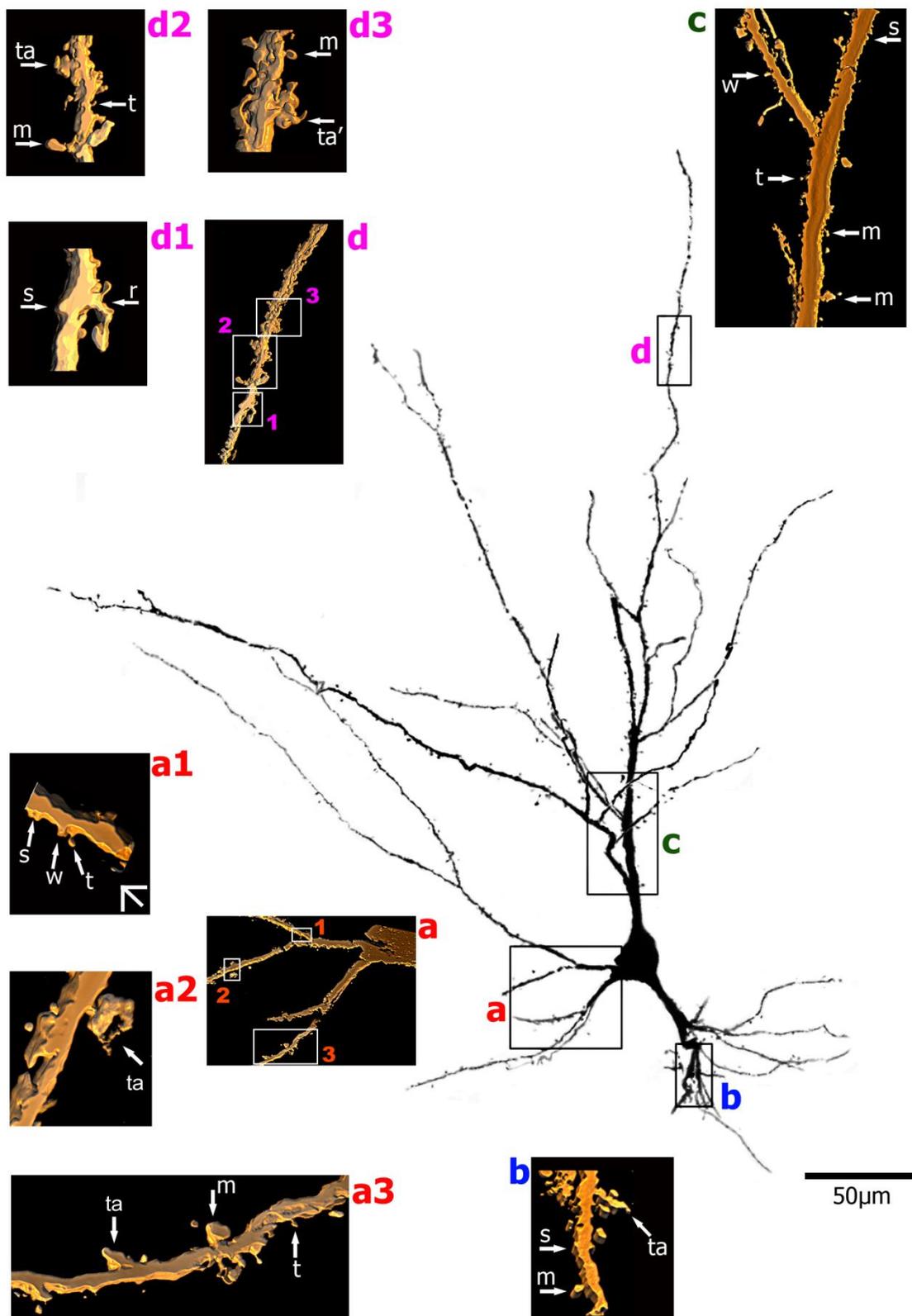


Figura 5.4

**Figura 5.4** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída tridimensionalmente para demonstrar os detalhes morfológicos dos espinhos dendríticos deste mesmo neurônio. A partir da localização do neurônio do centro da figura, as imagens correspondentes às áreas selecionadas (indicadas pelas letras 'a', 'b', 'c' e 'd') estão indicadas de forma correspondente e em maior aumento no entorno. Quando uma dessas áreas selecionadas possui mais do que uma imagem para ser detalhada, um número foi adicionado (por exemplo, a1, a2 e a3 na parte inferior da figura). Notem-se a presença, distribuição, densidade e diversidade de formas dos espinhos dendríticos nos ramos basais e apicais. Os espinhos foram classificados como: 'fino' (t), 'achatado' (s), 'espesso' (w), formato de 'cogumelo' (m), 'ramificado' (r), com 'formas de transição' ou 'atípicos' (ta). Espínulas estão identificadas com um asterisco ao lado do espinho correspondente. Escala tridimensional (em a1 e válida para todas as demais imagens) = 2 µm.

**2. Neurônio Fusiforme.** Esta forma neuronal foi encontrada homogeneamente em todo o território do nACo. O corpo deste neurônio tem formato ovoide ou em fuso o que lhe dá a característica fusiforme (**Figura 5.5**). Apresenta dimensão congruente com outras formas neuronais encontradas. Cada dendrito emerge de um polo do corpo celular, mas não são necessariamente simétricos. Um dos dendritos sempre assume direção pial e o outro trafega em sentido oposto.

Observamos duas variedades desta arquitetura neuronal. Uma forma tem 2 dendritos principais, onde cada dendrito surge de um polo do fuso, ramificam-se e projetam-se em sentidos opostos. A outra forma apresenta em algum dos polos o surgimento de até 2 dendritos lembrando um formato de bicornio, denominado por isso de neurônio fusiforme bífido. Em alguns casos, pode emergir mais um dendrito de um lado do corpo celular. Pela técnica de Sholl, sugere-se que o padrão de ramificação dendrítico é mais proximal ao soma e diminui gradativamente com o aumento da distância de distribuição dos ramos no neurópilo (**Figura 5.6**). Os neurônios fusiformes apresentaram alta densidade de espinhos dendríticos em toda a extensão da árvore dendrítica, mas menor densidade próximo ao corpo celular. Foram observados espinhos isolados ou formando agrupamentos tanto nos ramos dendríticos proximais, médios e distais. Os espinhos eram de todos os tipos, formando um *continuum* de formas e tamanhos, com notável presença de aspectos de transição ou atípicos (**Figura 5.7**).

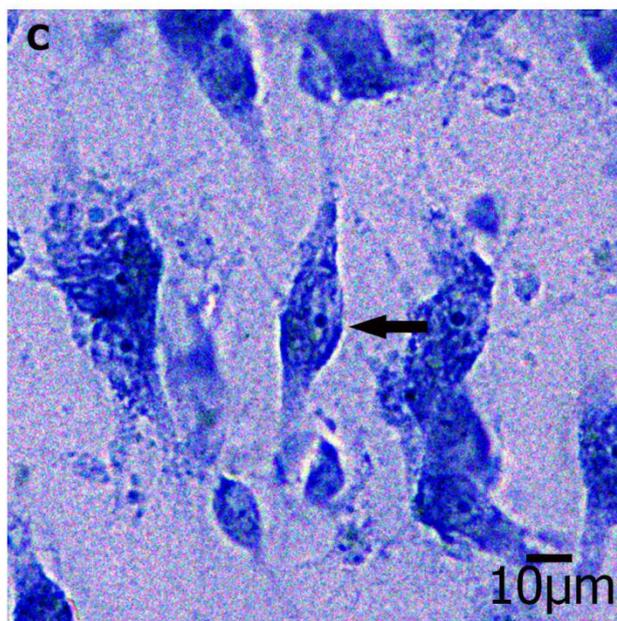
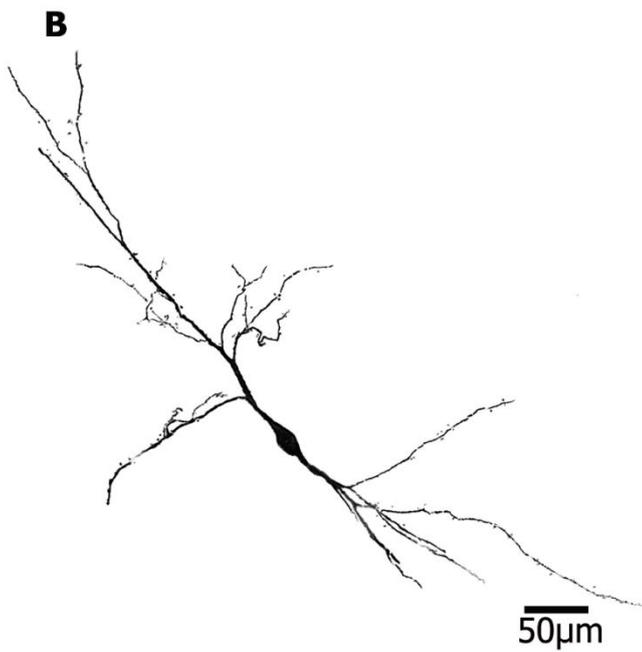
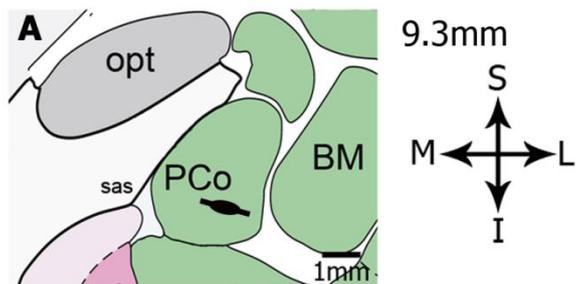


Figura 5.5

**Figura 5.5 Neurônio Fusiforme. (A)** Desenho esquemático de secção coronal do cérebro adulto humano com a localização do núcleo cortical posterior da amígdala (PCo; 9,3 mm posterior ao ponto médio da comissura anterior; baseado no atlas de Mai et al. (2008). A localização do nACo foi conferida e confirmada na versão do atlas de Mai et al. (2015)), onde foi observado neurônio fusiforme e a disposição espacial do corpo celular e ramos dendríticos. Observe que um dos dendritos vai em direção a superfície pial. **(B)** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensional do neurônio fusiforme impregnado pela técnica de Golgi e visualizado por microscopia de luz. **(C)** Imagem microscópica do corpo neuronal (seta) do neurônio fusiforme no núcleo de estudo corado pela técnica da tionina.

**Legenda:** BM: núcleo amigdaliano basomedial; sas: sulco semianular; opt: trato óptico; PCo: núcleo amigdaliano cortical região posterior. Coordenadas: S: superior; I: inferior; M: medial; L: lateral.

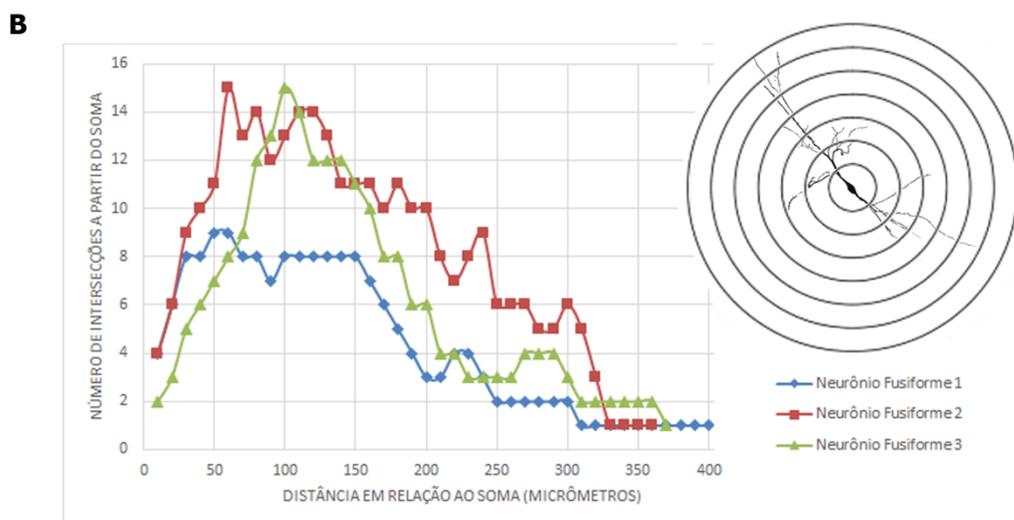
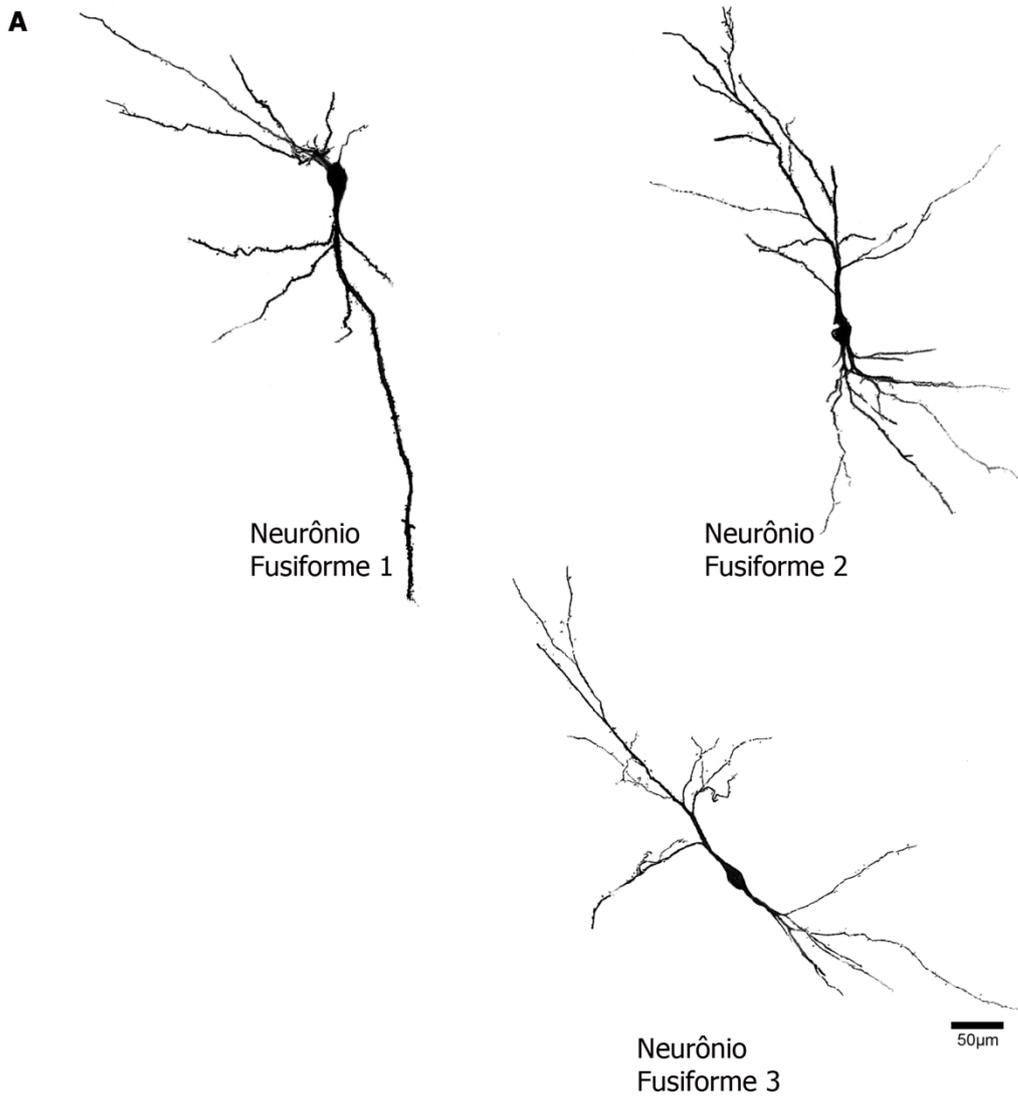


Figura 5.6

**Figura 5.6 (A)** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensionalmente de neurônios fusiformes impregnados pela técnica de Golgi e visualizados por microscopia de luz encontrados na amígdala cortical posterior. O “neurônio fusiforme 2” apresenta dois dendritos surgindo de um dos polos o que lhe confere forma característica de neurônio fusiforme bífido. **(B)** Análise do padrão de ramificação dendrítica empregando-se a técnica dos círculos concêntricos de Sholl (A distancia entre cada círculo concêntrico é de  $50\mu\text{m}$  como ilustrado na parte superior direita da imagem). No gráfico são apresentadas medidas a cada  $10\mu\text{m}$ . Note-se a relação entre o número de ramos dendríticos que passam pelos bordos dos círculos à medida que se estendem pelo neurópilo como indicativo da região dendrítica de predominância de ramificações.

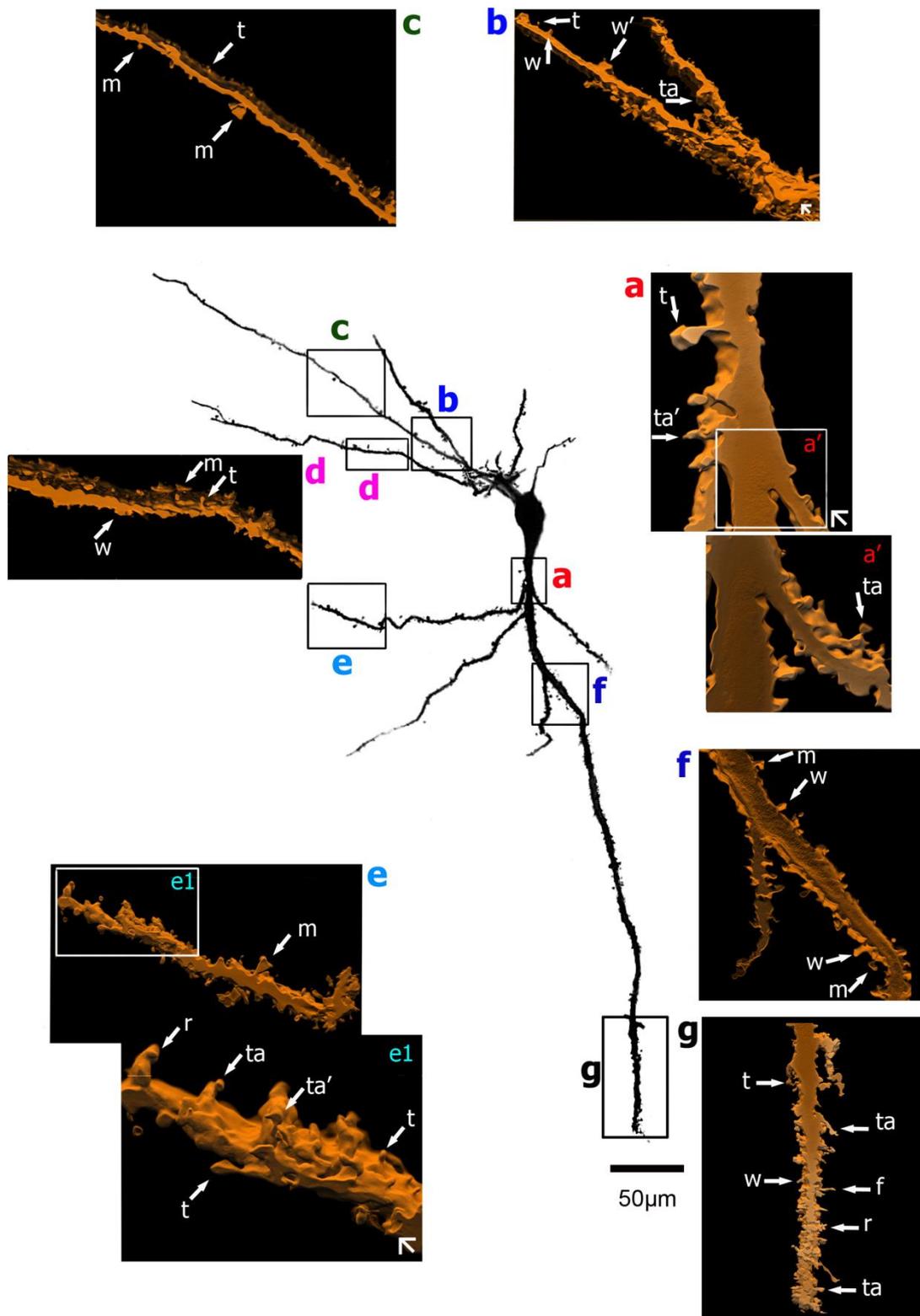


Figura 5.7

**Figura 5.7** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída tridimensionalmente para demonstrar os detalhes morfológicos dos espinhos dendríticos deste mesmo neurônio. A partir da localização do neurônio do centro da figura, as imagens correspondentes às áreas selecionadas (indicadas pelas letras 'a', 'b', 'c', 'd', 'e', 'f' e 'g') estão indicadas de forma correspondente e em maior aumento no entorno. Quando uma dessas áreas selecionadas possui mais do que uma imagem para ser detalhada, um número foi adicionado (e1 na parte superior da figura). Em a' a imagem está com discreta rotação para melhor visualização de espinhos dendríticos. Notem-se a presença, distribuição, densidade e diversidade de formas dos espinhos dendríticos nos ramos dendríticos proximais e distais. Os espinhos foram classificados como: 'fino' (t), 'achatado' (s), 'espesso' (w), formato de 'cogumelo' (m), 'ramificado' (r), com 'formas de transição' ou 'atípicos' (ta). Espínulas estão identificadas com um asterisco ao lado do espinho correspondente. Escala tridimensional (válida para todas as imagens) = 2  $\mu$ m.

**3. Neurônio Angular-Esférico.** Esta forma neuronal foi encontrada homogeneamente em todo o território do nACo. O soma deste neurônio tem um diâmetro interno aparentemente constante o que lhe confere um formato globoso imitando uma esfera. Pode ter até 6 dendritos, mas o que lhe caracteriza são os dendritos predominantemente robustos que surgem ao redor do seu soma. Na microscopia óptica é visualizado como tendo um formato triangular de lados arredondados, isto provavelmente devido a configuração espacial dos seus ramos dendríticos proximais de grosso calibre que surgem ao redor do soma (**Figura 5.8**). Por esses motivos optamos por usar a nomenclatura de angular-esférico. Pela técnica de Sholl, sugere-se que o padrão de ramificação dendrítico é aumentado e de forma constante nas regiões mais proximais e mediais em relação ao soma, diminuindo abruptamente na região distal dos ramos no neurópilo (**Figura 5.9**). O neurônio angular-esférico encontrado apresentou zonas que intercalavam áreas de baixa e alta densidade de espinhos dendríticos, mas em menor densidade próximo ao corpo celular. Foram observados espinhos isolados ou formando agrupamentos tanto nos ramos dendríticos proximais, médios e distais. Os espinhos eram de todos os tipos, formando um *continuum* de formas e tamanhos, com notável presença de aspectos de transição ou atípicos (**Figura 5.10**).

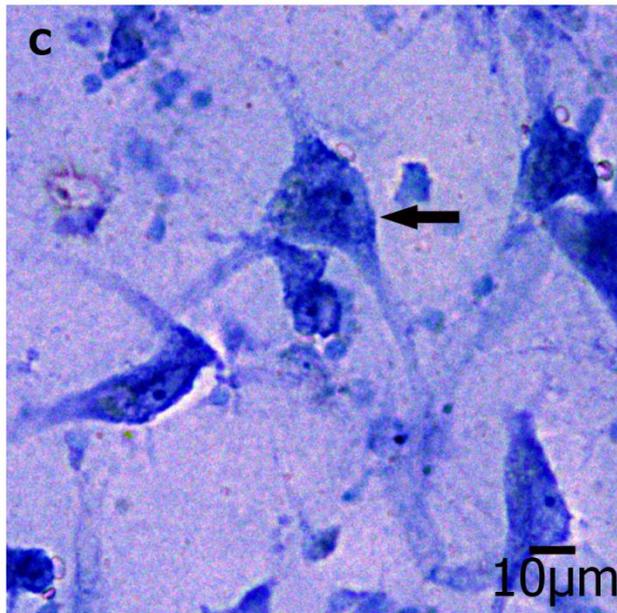
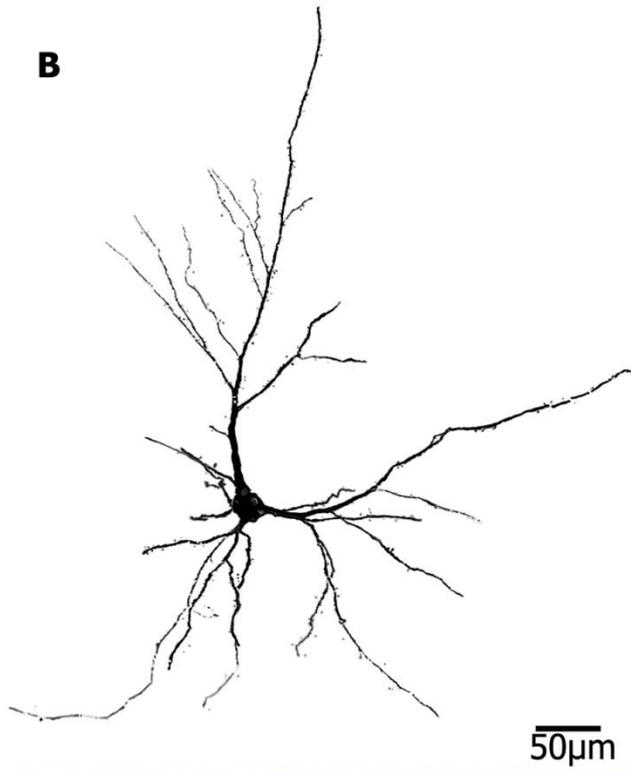
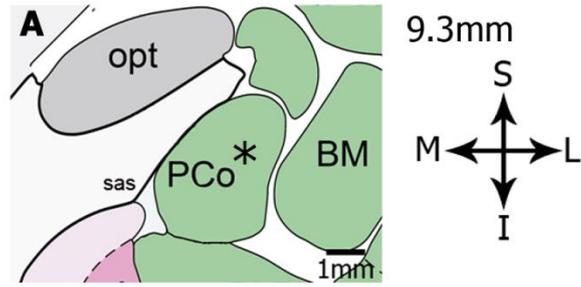
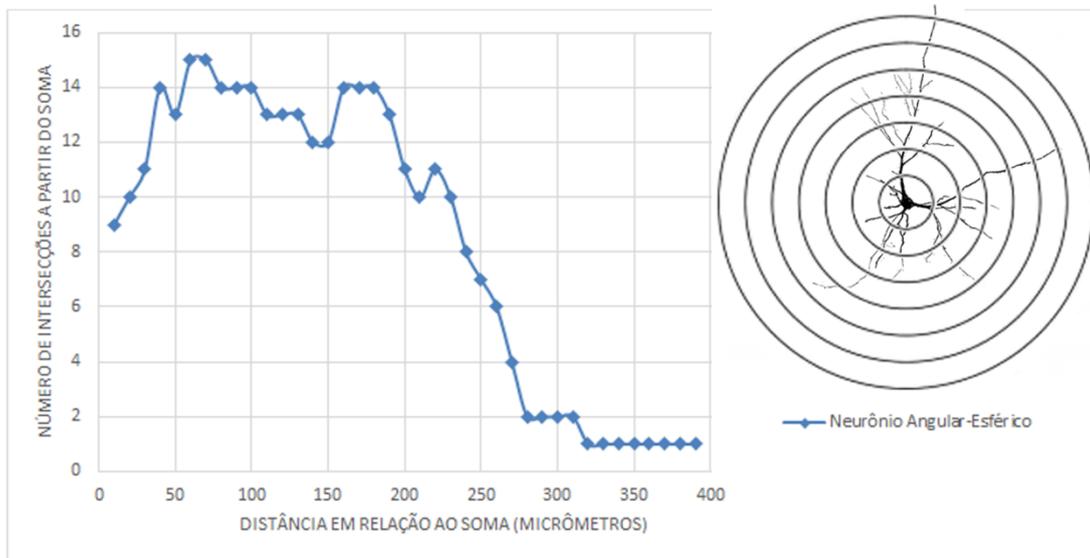


Figura 5.8

**Figura 5.8 Neurônio Angular-Esférico. (A)** Desenho esquemático de secção coronal do cérebro adulto humano com a localização do núcleo cortical posterior da amígdala (PCo; 9,3 mm posterior ao ponto médio da comissura anterior; baseado no atlas de Mai et al. (2008). A localização do nACo foi conferida e confirmada na versão do atlas de Mai et al. (2015)), onde foi observado neurônio angular-esférico (\*). **(B)** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensional do neurônio angular-esférico impregnado pela técnica de Golgi e visualizado por microscopia de luz. **(C)** Imagem microscópica do corpo neuronal (seta) do neurônio angular-esférico no núcleo de estudo corado pela técnica da tionina. **Legenda:** BM: núcleo amigdaliano basomedial; sas: sulco semianular; opt: trato óptico; PCo: núcleo amigdaliano cortical região posterior. Coordenadas: S: superior; I: inferior; M: medial; L: lateral.



**Figura 5.9** Análise do padrão de ramificação dendrítica de neurônio angular-esférico empregando-se a técnica dos círculos concêntricos de Sholl (A distancia entre cada círculo concêntrico é de 50µm como ilustrado na parte superior direita da imagem). No gráfico são apresentadas medidas a cada 10µm. Note-se a relação entre o número de ramos dendríticos que passam pelos bordos dos círculos à medida que se estendem pelo neurópilo como indicativo da região dendrítica de predominância de ramificações.



**Figura 5.10** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída tridimensionalmente para demonstrar os detalhes morfológicos dos espinhos dendríticos deste mesmo neurônio. A partir da localização do neurônio do centro da figura, as imagens correspondentes às áreas selecionadas (indicadas pelas letras 'a', 'b', 'c', 'd', 'e' e 'f') estão indicadas de forma correspondente e em maior aumento no entorno. Nas figuras a', d' e f' a imagem está com discreta rotação para melhor visualização de espinhos dendríticos. Notem-se a presença, distribuição, densidade e diversidade de formas dos espinhos dendríticos nos ramos dendríticos proximais e distais. Os espinhos foram classificados como: 'fino' (t), 'achatado' (s), 'espesso' (w), formato de 'cogumelo' (m), 'ramificado' (r), com 'formas de transição' ou 'atípicos' (ta). Espínulas estão identificadas com um asterisco ao lado do espinho correspondente. Escala tridimensional (válida para todas as imagens) = 2  $\mu$ m.

**4. Neurônio Triangular.** Esta forma neuronal foi encontrada homogeneamente em todo o território do nACo. Apresentando forma triangular se revelou quase equilátero. Seus vértices, de formato muito parecido, se afunilam de onde surgem seus dendritos. Podem ter até 6 dendritos primários com diâmetros muito similares que não apresentam predominância significativa (**Figura 5.11**). Pela técnica de Sholl, sugere-se que o padrão de ramificação dendrítico é aumentado e de forma constante nas regiões mais proximais em relação ao soma, diminuindo progressivamente na região medial e distal dos ramos no neurópilo (**Figura 5.12**). O neurônio triangular encontrado apresentou alta densidade de espinhos dendríticos, mas em menor densidade próximo ao corpo celular. Foram observados espinhos isolados ou formando agrupamentos tanto nos ramos dendríticos proximais, médios e distais. Os espinhos eram de todos os tipos, formando um *continuum* de formas e tamanhos, com notável presença de aspectos de transição ou atípicos (**Figura 5.13**).

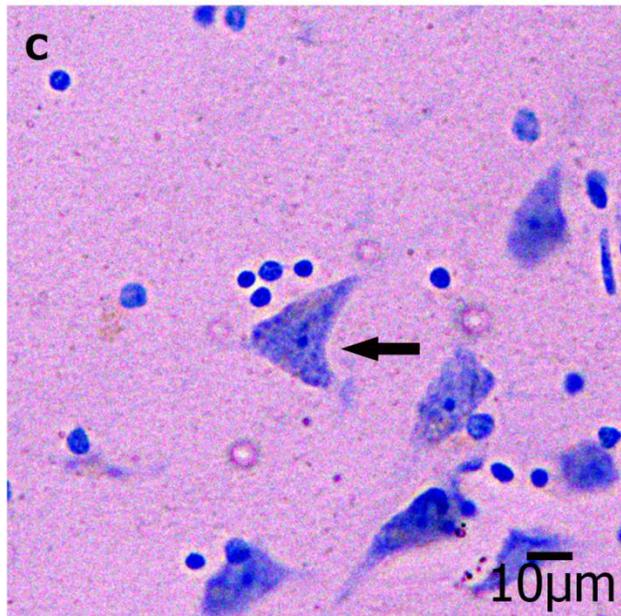
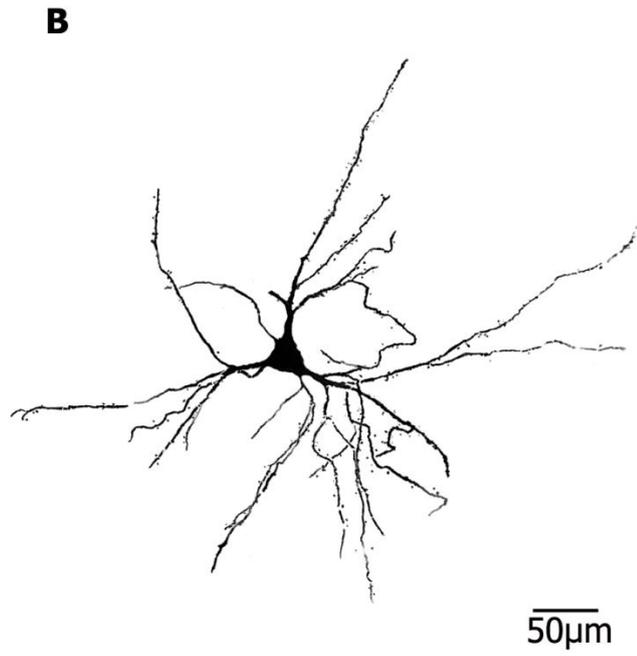
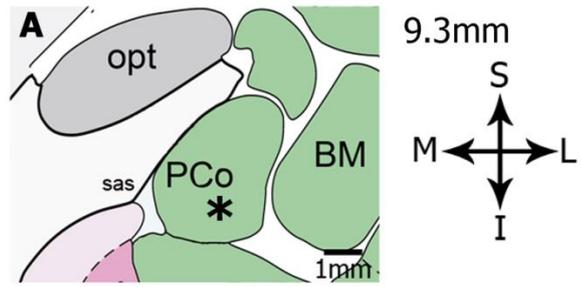
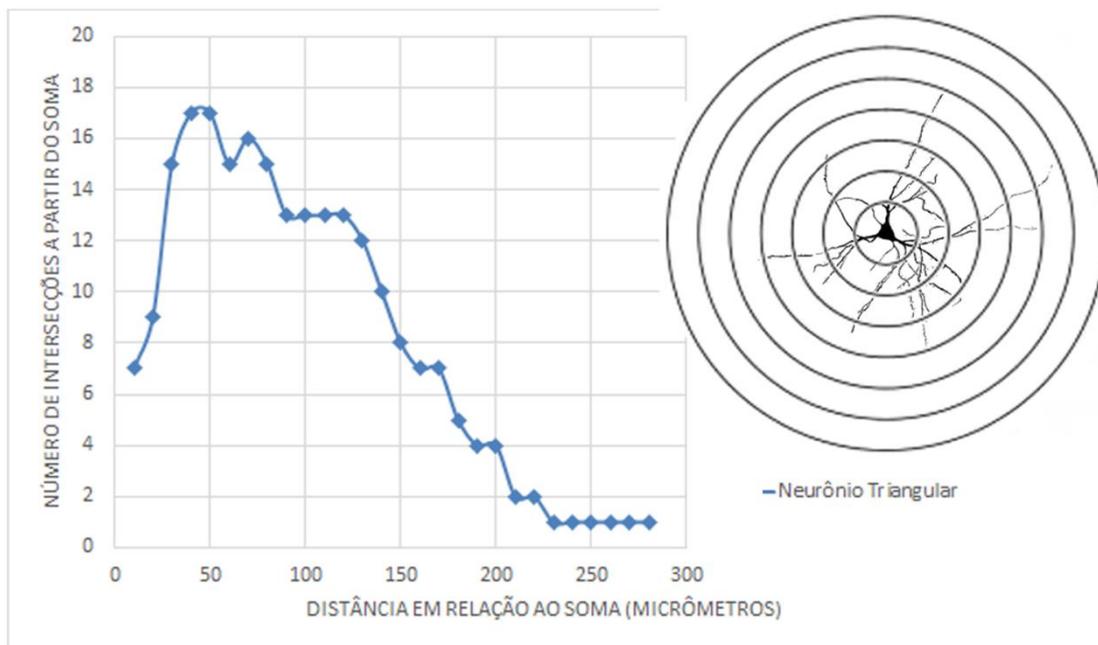


Figura 5.11

**Figura 5.11 Neurônio Triangular.** (A) Desenho esquemático de secção coronal do cérebro adulto humano com a localização do núcleo cortical posterior da amígdala (PCo; 9,3 mm posterior ao ponto médio da comissura anterior; baseado no atlas de Mai et al. (2008). A localização do nACo foi conferida e confirmada na versão do atlas de Mai et al. (2015)), onde foi observado neurônio triangular (\*). (B) Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensional do neurônio triangular impregnado pela técnica de Golgi e visualizado por microscopia de luz. (C) Imagem microscópica do corpo neuronal (seta) do neurônio triangular no núcleo de estudo corado pela técnica da tionina. **Legenda:** BM: núcleo amigdaliano basomedial; sas: sulco semianular; opt: trato óptico; PCo: núcleo amigdaliano cortical região posterior. Coordenadas: S: superior; I: inferior; M: medial; L: lateral.



**Figura 5.12** Análise do padrão de ramificação dendrítica de neurônio triangular empregando-se a técnica dos círculos concêntricos de Sholl (A distancia entre cada círculo concêntrico é de 50μm como ilustrado na parte superior direita da imagem). No gráfico são apresentadas medidas a cada 10μm. Note-se a relação entre o número de ramos dendríticos que passam pelos bordos dos círculos à medida que se estendem pelo neurópilo como indicativo da região dendrítica de predominância de ramificações.

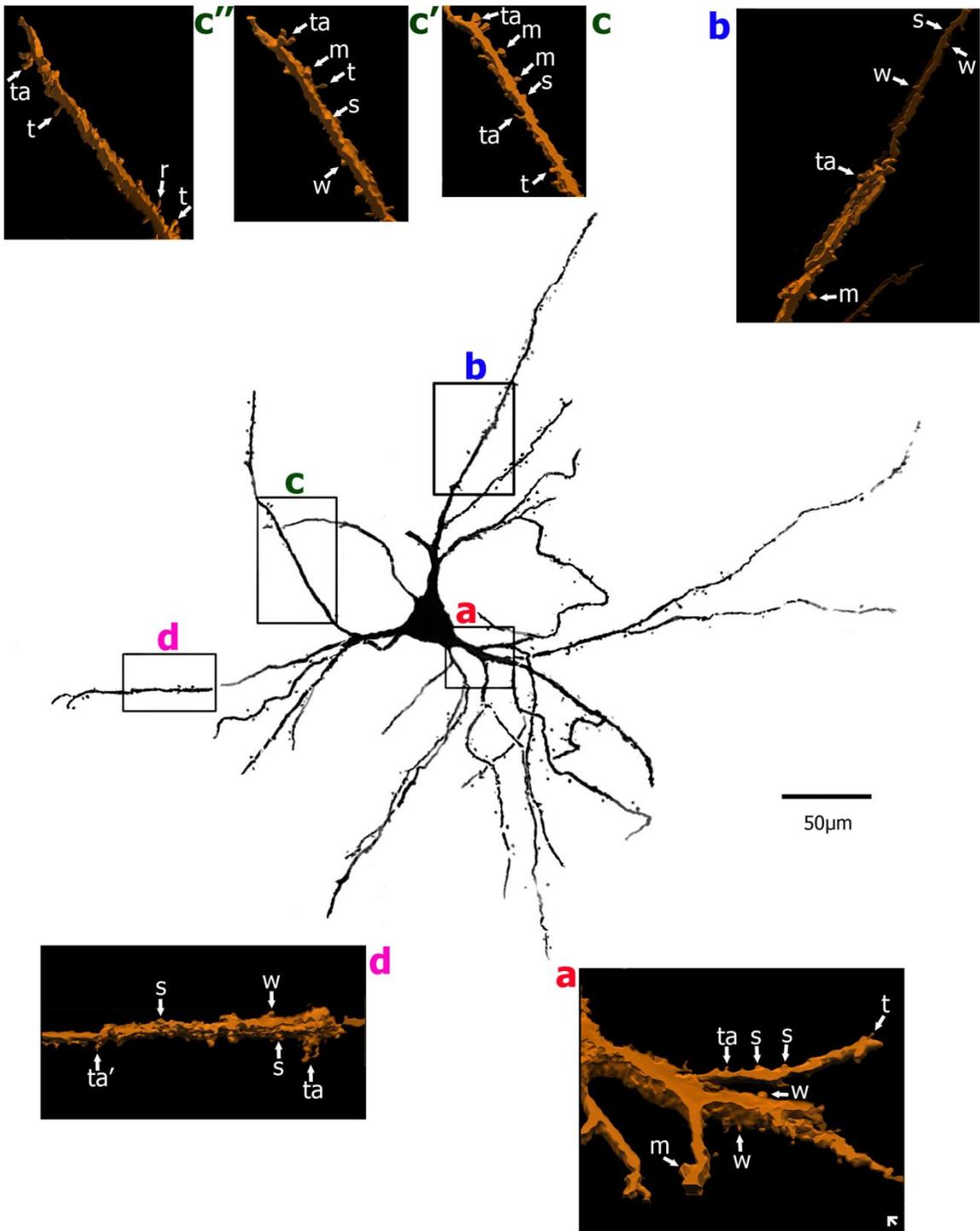


Figura 5.13

**Figura 5.13** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída tridimensionalmente para demonstrar os detalhes morfológicos dos espinhos dendríticos deste mesmo neurônio. A partir da localização do neurônio do centro da figura, as imagens correspondentes às áreas selecionadas (indicadas pelas letras 'a', 'b', 'c' e 'd') estão indicadas de forma correspondente e em maior aumento no entorno. Nas figuras c' e c'' a imagem está com discreta rotação para melhor visualização de espinhos dendríticos. Notem-se a presença, distribuição, densidade e diversidade de formas dos espinhos dendríticos nos ramos dendríticos proximais e distais. Os espinhos foram classificados como: 'fino' (t), 'achatado' (s), 'espesso' (w), formato de 'cogumelo' (m), 'ramificado' (r), com 'formas de transição' ou 'atípicos' (ta). Espínulas estão identificadas com um asterisco ao lado do espinho correspondente. Escala tridimensional (válida para todas as imagens) = 2  $\mu$ m.

**5. Neurônio Retangular.** Esta forma neuronal complexa foi achada em todo território do nACo. Apresenta quatro vértices principais dos quais surgem os ramos dendríticos. O soma parece ser desenhado com linhas retas unindo os vértices, motivo pelo qual a sua denominação. Seu tamanho se mostrou uniforme em relação as outras formas neuronais. Tem até 7 dendritos principais de diâmetros diversos. De cada vértice podem brotar de 1 a 4 dendritos (**Figura 5.14**). O ramo dendrítico mais calibroso é o que pode apresentar maior arborização dendrítica mostrando predominância significativa, mas sem orientação pial. Pela técnica de Sholl, sugere-se que o padrão de ramificação dendrítico é aumentado nas regiões mais proximais em relação ao soma, diminuindo abruptamente na região medial e distal dos ramos no neurópilo (**Figura 5.15**). O neurônio retangular selecionado apresentou dendritos com zonas que intercalavam aleatoriamente áreas de baixa e áreas de alta densidade de espinhos dendríticos, mas próximo ao corpo celular mostrou área de baixa densidade. Foram observados espinhos isolados ou formando agrupamentos tanto nos ramos dendríticos proximais, médios e distais. Os espinhos eram de todos os tipos, formando um *continuum* de formas e tamanhos, com notável presença de aspectos de transição ou atípicos (**Figura 5.16**).

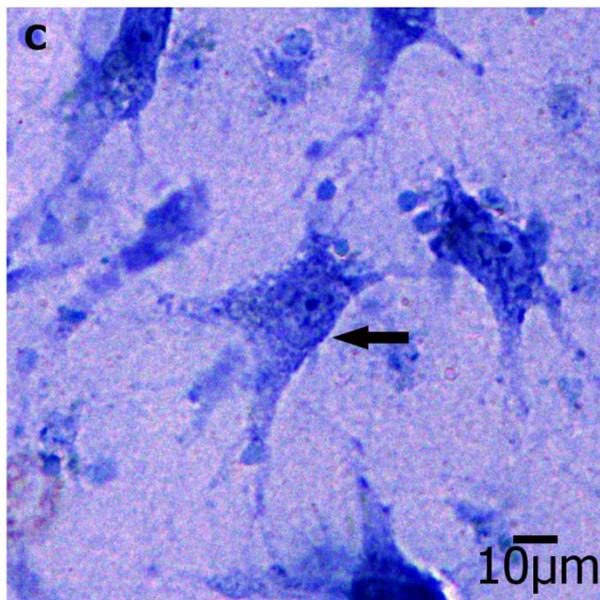
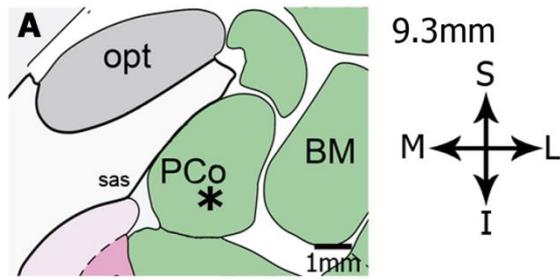
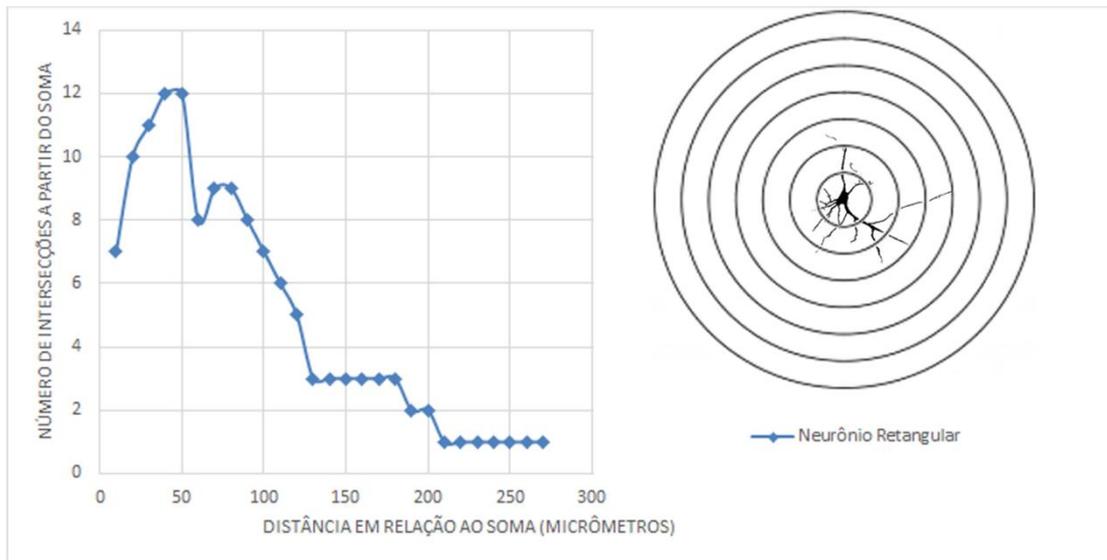


Figura 5.14

**Figura 5.14 Neurônio Retangular.** (A) Desenho esquemático de secção coronal do cérebro adulto humano com a localização do núcleo cortical posterior da amígdala (PCo; 9,3 mm posterior ao ponto médio da comissura anterior; baseado no atlas de Mai et al. (2008). A localização do nACo foi conferida e confirmada na versão do atlas de Mai et al. (2015)), onde foi observado neurônio retangular (\*). (B) Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensional do neurônio retangular impregnado pela técnica de Golgi e visualizado por microscopia de luz. (C) Imagem microscópica do corpo neuronal (seta) do neurônio retangular no núcleo de estudo corado pela técnica da tionina. **Legenda:** BM: núcleo amigdaliano basomedial; sas: sulco semianular; opt: trato óptico; PCo: núcleo amigdaliano cortical região posterior. Coordenadas: S: superior; I: inferior; M: medial; L: lateral.



**Figura 5.15** Análise do padrão de ramificação dendrítica de neurônio retangular empregando-se a técnica dos círculos concêntricos de Sholl (A distancia entre cada círculo concêntrico é de 50µm como ilustrado na parte superior direita da imagem). No gráfico são apresentadas medidas a cada 10µm. Note-se a relação entre o número de ramos dendríticos que passam pelos bordos dos círculos à medida que se estendem pelo neurópilo como indicativo da região dendrítica de predominância de ramificações.

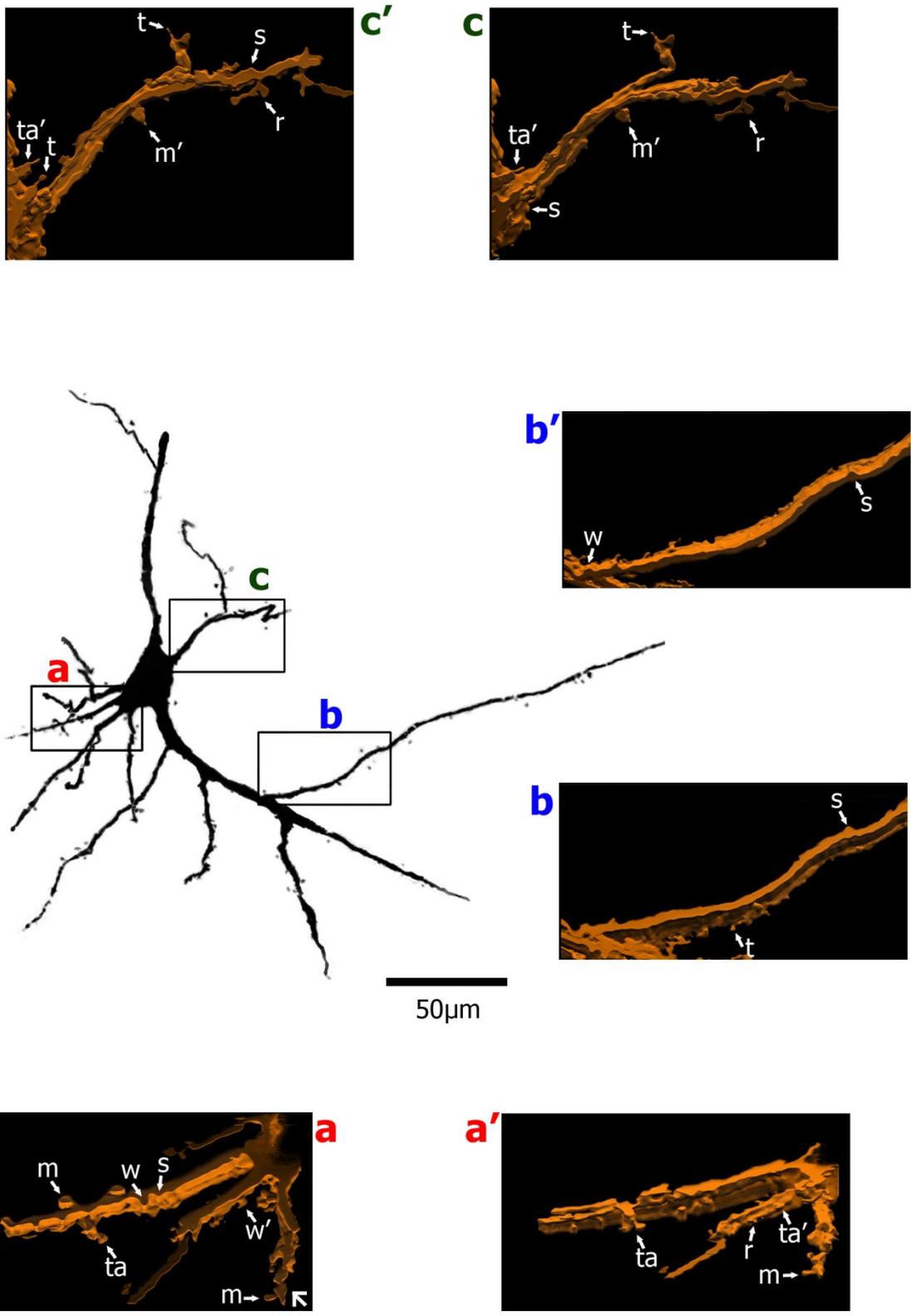
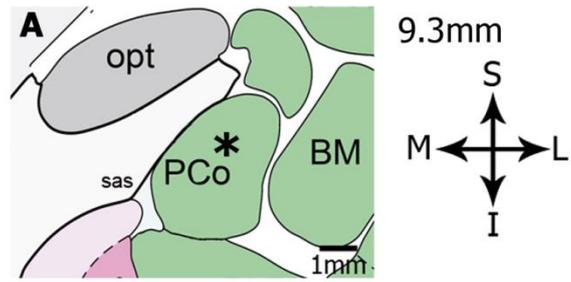


Figura 5.16

**Figura 5.16** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída tridimensionalmente para demonstrar os detalhes morfológicos dos espinhos dendríticos deste mesmo neurônio. A partir da localização do neurônio do centro da figura, as imagens correspondentes às áreas selecionadas (indicadas pelas letras 'a', 'b' e 'c') estão indicadas de forma correspondente e em maior aumento no entorno. Nas figuras a', b' e c' a imagem está com discreta rotação para melhor visualização de espinhos dendríticos. Notem-se a presença, distribuição, densidade e diversidade de formas dos espinhos dendríticos nos ramos dendríticos proximais e distais. Os espinhos foram classificados como: 'fino' (t), 'achatado' (s), 'espesso' (w), formato de 'cogumelo' (m), 'ramificado' (r), com 'formas de transição' ou 'atípicos' (ta). Espínulas estão identificadas com um asterisco ao lado do espinho correspondente. Escala tridimensional (válida para todas as imagens) = 2  $\mu$ m.

**6. Neurônio Poligonal-Estrelado.** Encontrado no território do nACo apresenta soma poligonal imitando uma estrela. Do soma surgem até 6 dendritos com diâmetros menores a aqueles observados na forma retangular. (**Figura 5.17**). Sua árvore dendrítica surge em todas as direções sem predominância específica. Pela técnica de Sholl, sugere-se que o padrão de ramificação dendrítico é aumentado nas regiões mais proximais em relação ao soma, diminuindo abruptamente na região medial e distal dos ramos no neurópilo (**Figura 5.18**). O neurônio poligonal-estrelado selecionado apresentou dendritos com alta densidade de espinhos dendríticos e área de baixa densidade próximo ao corpo celular. Foram observados espinhos isolados ou formando agrupamentos tanto nos ramos dendríticos proximais, médios e distais. Os espinhos eram de todos os tipos, formando um *continuum* de formas e tamanhos, com notável presença de aspectos de transição ou atípicos (**Figura 5.19**).



**B**

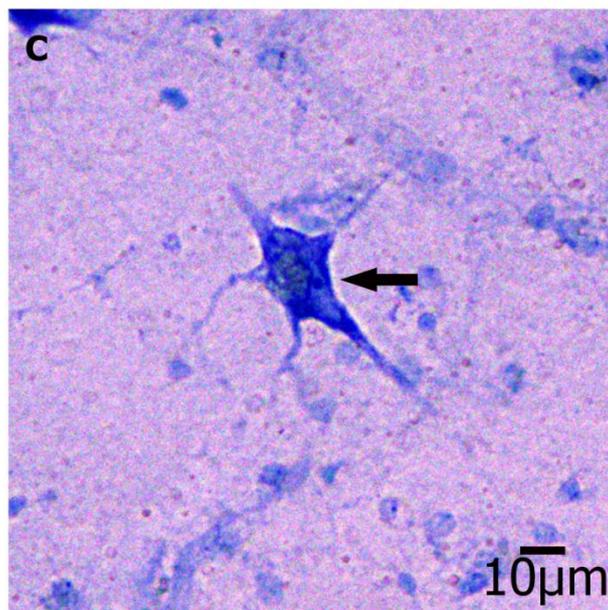
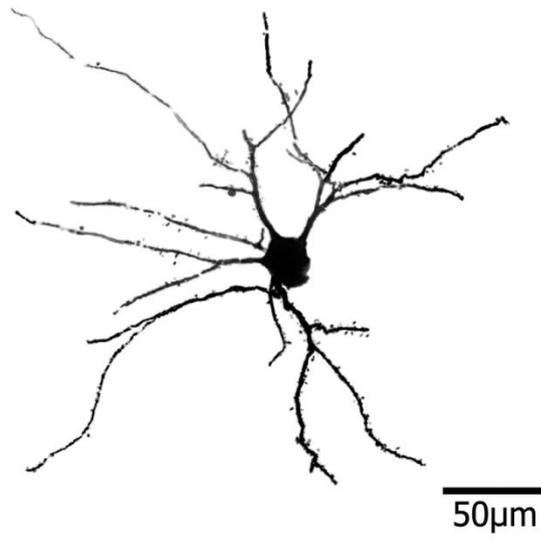
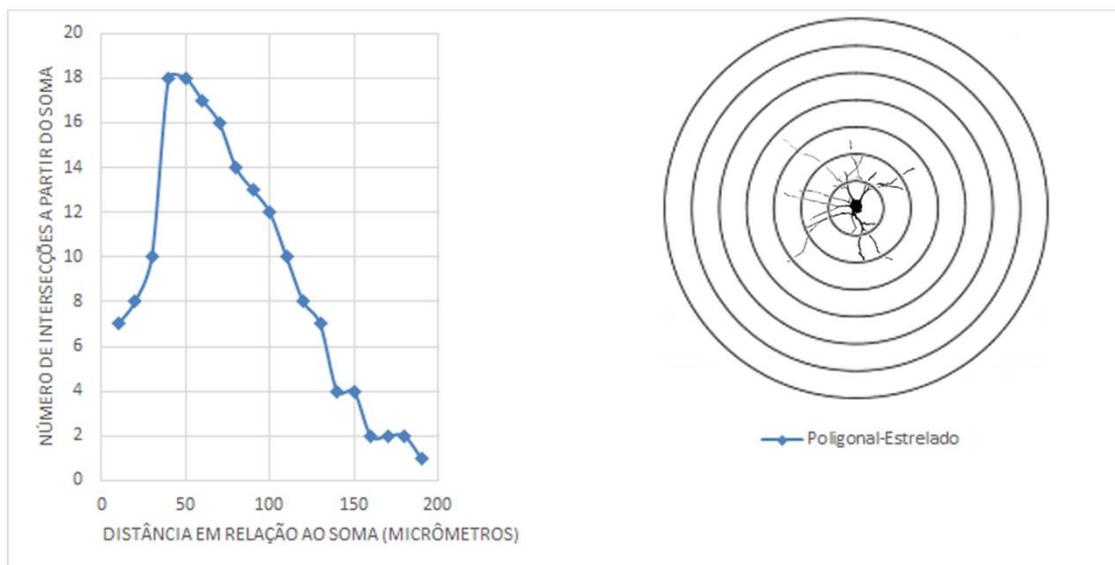


Figura 5.17

**Figura 5.17 Neurônio Poligonal-Estrelado.** (A) Desenho esquemático de secção coronal do cérebro adulto humano com a localização do núcleo cortical posterior da amígdala (PCo; 9,3 mm posterior ao ponto médio da comissura anterior; baseado no atlas de Mai et al. (2008). A localização do nACo foi conferida e confirmada na versão do atlas de Mai et al. (2015)), onde foi observado neurônio poligonal-estrelado (\*). (B) Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensional do neurônio poligonal-estrelado impregnado pela técnica de Golgi e visualizado por microscopia de luz. (C) Imagem microscópica do corpo neuronal (seta) do neurônio poligonal-estrelado no núcleo de estudo corado pela técnica da tionina. **Legenda:** BM: núcleo amigdaliano basomedial; sas: sulco semianular; opt: trato óptico; PCo: núcleo amigdaliano cortical região posterior. Coordenadas: S: superior; I: inferior; M: medial; L: lateral.



**Figura 5.18** Análise do padrão de ramificação dendrítica de neurônio poligonal-estrelado empregando-se a técnica dos círculos concêntricos de Sholl (A distancia entre cada círculo concêntrico é de 50μm como ilustrado na parte superior direita da imagem). No gráfico são apresentadas medidas a cada 10μm. Note-se a relação entre o número de ramos dendríticos que passam pelos bordos dos círculos à medida que se estendem pelo neurópilo como indicativo da região dendrítica de predominância de ramificações.

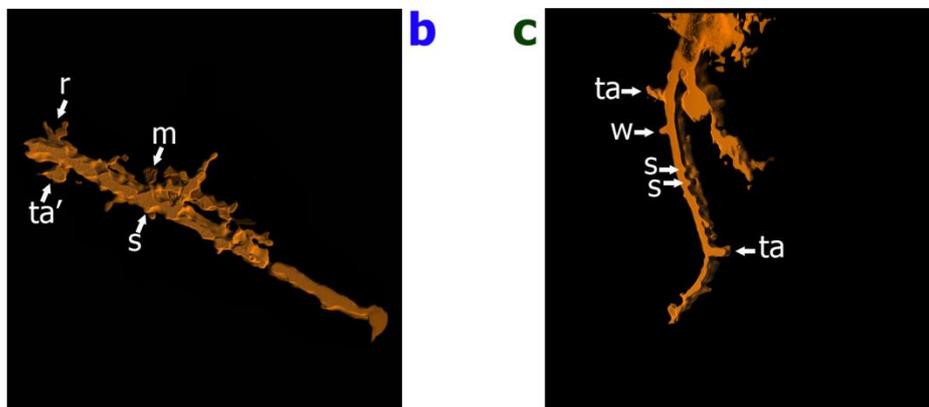
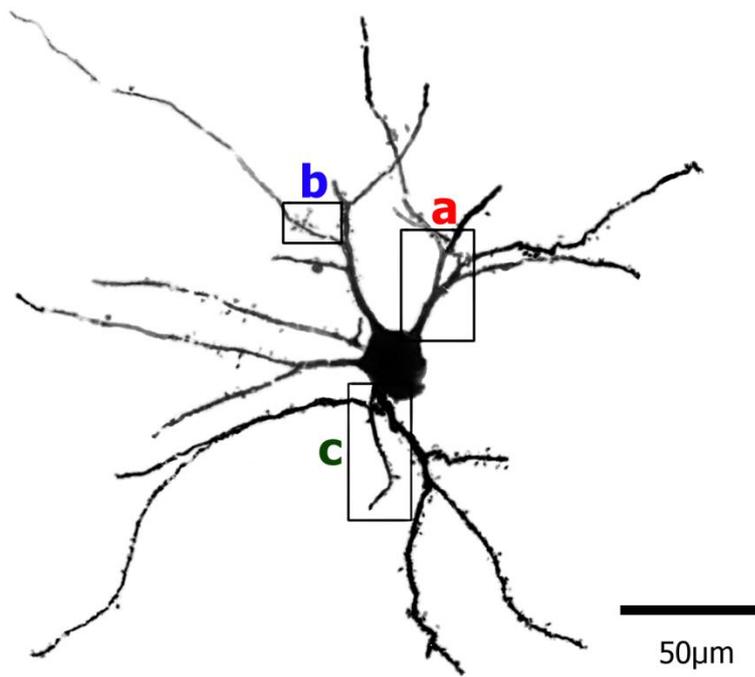
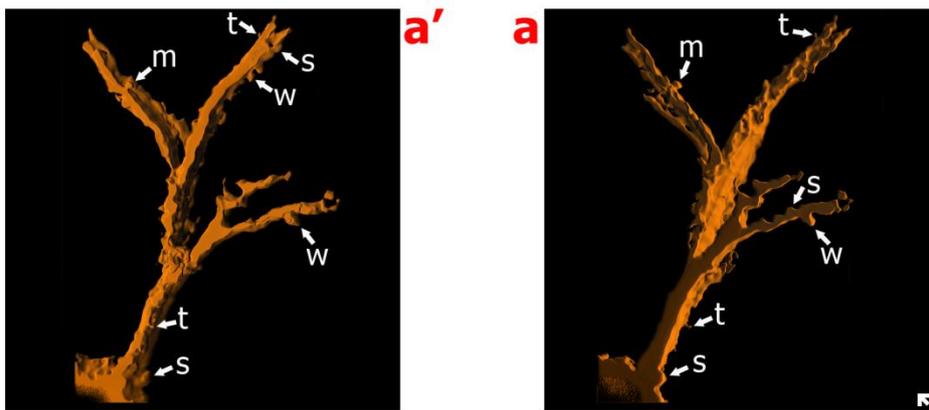
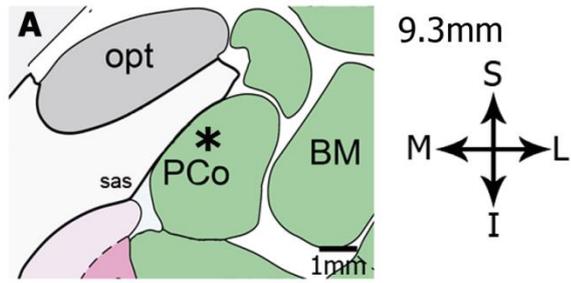


Figura 5.19

**Figura 5.19** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída tridimensionalmente para demonstrar os detalhes morfológicos dos espinhos dendríticos deste mesmo neurônio. A partir da localização do neurônio do centro da figura, as imagens correspondentes às áreas selecionadas (indicadas pelas letras 'a', 'b' e 'c') estão indicadas de forma correspondente e em maior aumento no entorno. Na figura 'a' a imagem está com discreta rotação para melhor visualização de espinhos dendríticos. Notem-se a presença, distribuição, densidade e diversidade de formas dos espinhos dendríticos nos ramos dendríticos proximais e distais. Os espinhos foram classificados como: 'fino' (t), 'achatado' (s), 'espesso' (w), formato de 'cogumelo' (m), 'ramificado' (r), com 'formas de transição' ou 'atípicos' (ta). Espínulas estão identificadas com um asterisco ao lado do espinho correspondente. Escala tridimensional (válida para todas as imagens) = 2  $\mu$ m.

**7. Neurônio Redondo-Cônico.** Encontrado no território do nACo apresenta um formato cônico com uma base em formato circular. Seu vértice se confunde dentro do soma neuronal. Com isto, na observação, mostra-se como um neurônio somente redondo. Seu tamanho é semelhante as outras formas neuronais encontradas. Do soma surgem até 7 dendritos primários robustos (**Figura 5.20**). O dendrito que surge da região do vértice do cone se mostra geralmente proeminente. Pela técnica de Sholl, sugere-se que o padrão de ramificação dendrítico é aumentado nas regiões mais proximais e mediais em relação ao soma, diminuindo abruptamente na região distal dos ramos no neurópilo (**Figura 5.21**). O neurônio redondo-cônico selecionado apresentou dendritos com alta densidade de espinhos dendríticos e área de baixa densidade próximo ao corpo celular. Foram observados espinhos isolados ou formando agrupamentos tanto nos ramos dendríticos proximais, médios e distais. Os espinhos eram de todos os tipos, formando um *continuum* de formas e tamanhos, com notável presença de aspectos de transição ou atípicos (**Figura 5.22**).



**B**

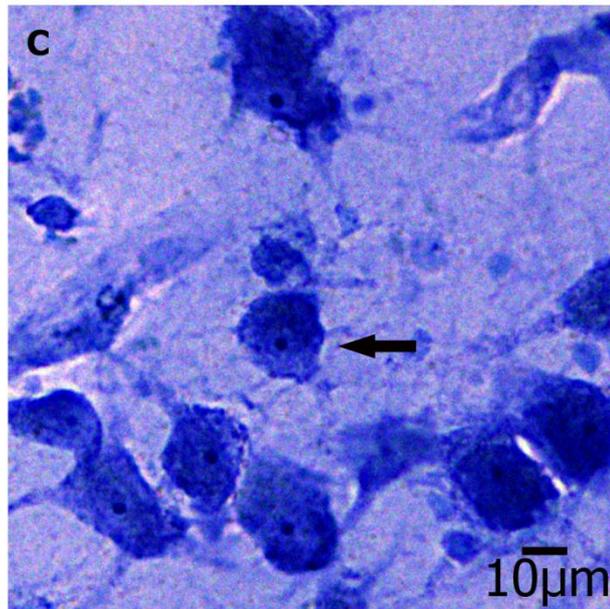
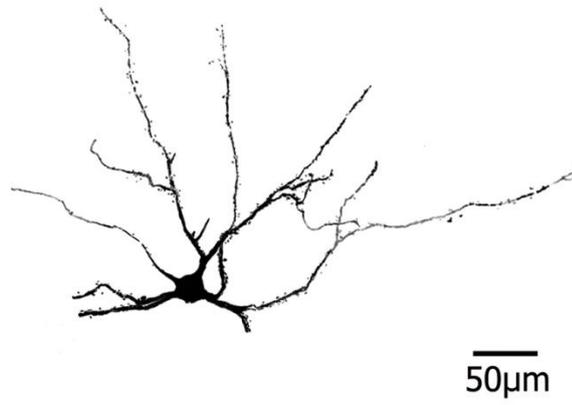
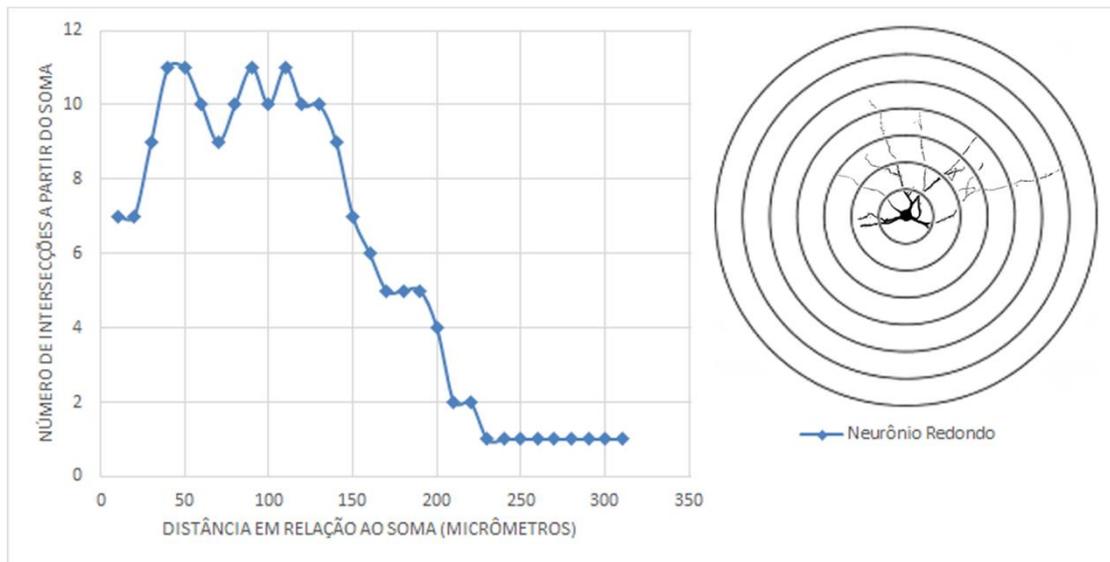


Figura 5.20

**Figura 5.20 Neurônio Redondo-Cônico.** (A) Desenho esquemático de secção coronal do cérebro adulto humano com a localização do núcleo cortical posterior da amígdala (PCo; 9,3 mm posterior ao ponto médio da comissura anterior; baseado no atlas de Mai et al. (2008). A localização do nACo foi conferida e confirmada na versão do atlas de Mai et al. (2015)), onde foi observado neurônio redondo-cônico (\*). (B) Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensional do neurônio redondo-cônico impregnado pela técnica de Golgi e visualizado por microscopia de luz. (C) Imagem microscópica do corpo neuronal (seta) do neurônio redondo-cônico no núcleo de estudo corado pela técnica da tionina. **Legenda:** BM: núcleo amigdaliano basomedial; sas: sulco semianular; opt: trato óptico; PCo: núcleo amigdaliano cortical região posterior. Coordenadas: S: superior; I: inferior; M: medial; L: lateral.



**Figura 5.21** Análise do padrão de ramificação dendrítica de neurônio redondo empregando-se a técnica dos círculos concêntricos de Sholl (A distancia entre cada círculo concêntrico é de 50 $\mu$ m como ilustrado na parte superior direita da imagem). No gráfico são apresentadas medidas a cada 10 $\mu$ m. Note-se a relação entre o número de ramos dendríticos que passam pelos bordos dos círculos à medida que se estendem pelo neurópilo como indicativo da região dendrítica de predominância de ramificações.

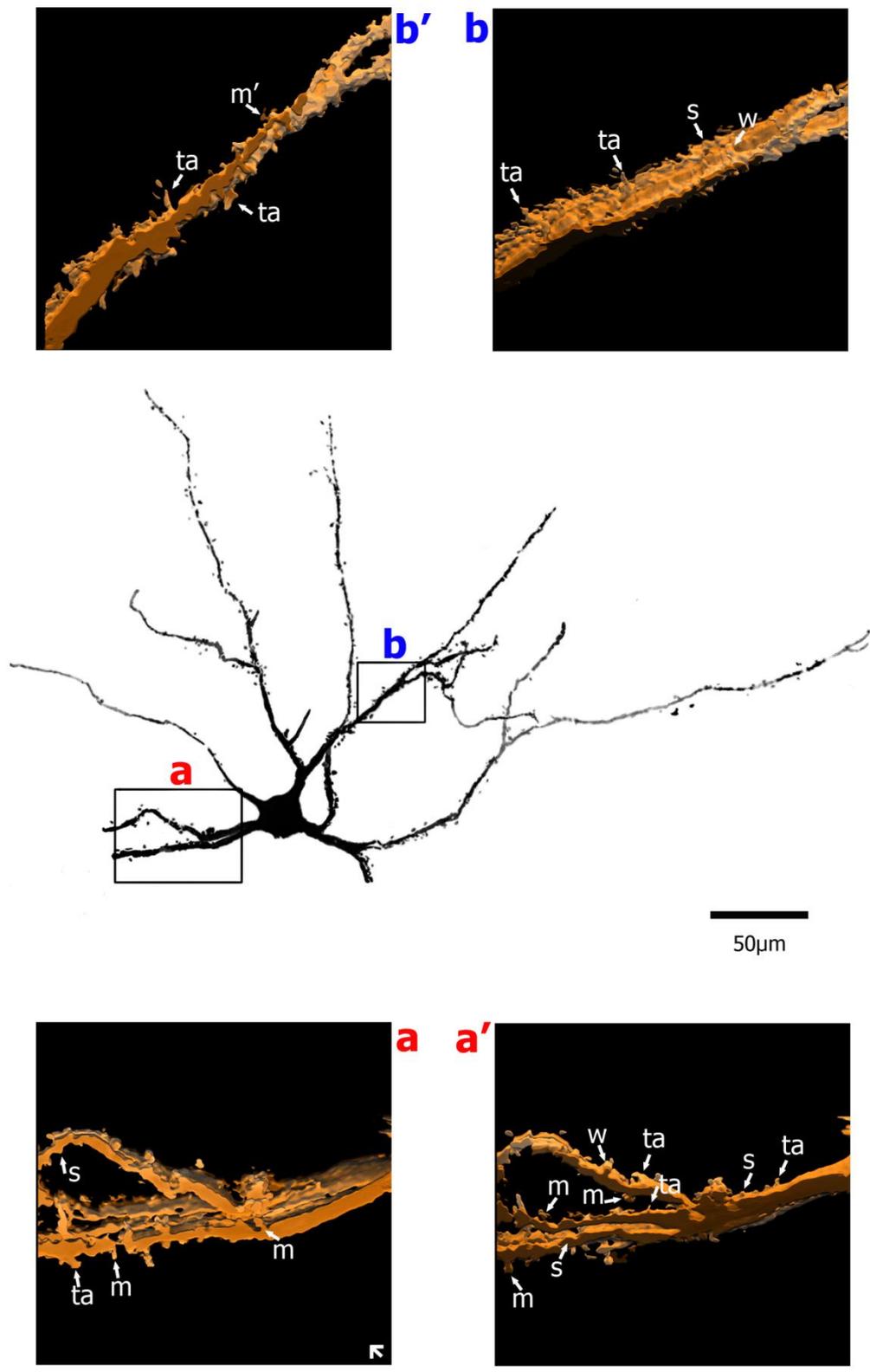
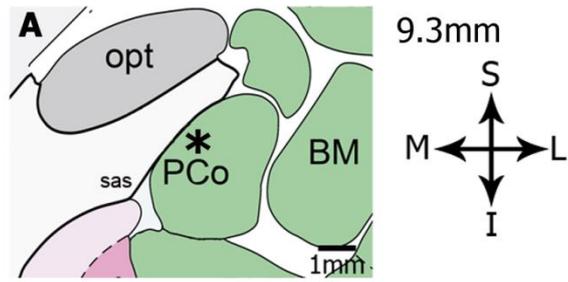


Figura 5.22

**Figura 5.22** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída tridimensionalmente para demonstrar os detalhes morfológicos dos espinhos dendríticos deste mesmo neurônio. A partir da localização do neurônio do centro da figura, as imagens correspondentes às áreas selecionadas (indicadas pelas letras 'a' e 'b') estão indicadas de forma correspondente e em maior aumento no entorno. Nas figuras a' e b' a imagem está com discreta rotação para melhor visualização de espinhos dendríticos. Notem-se a presença, distribuição, densidade e diversidade de formas dos espinhos dendríticos nos ramos dendríticos proximais e distais. Os espinhos foram classificados como: 'fino' (t), 'achatado' (s), 'espesso' (w), formato de 'cogumelo' (m), 'ramificado' (r), com 'formas de transição' ou 'atípicos' (ta). Espínulas estão identificadas com um asterisco ao lado do espinho correspondente. Escala tridimensional (válida para todas as imagens) = 2  $\mu$ m.

**8. Neurônio *Pear Shaped*.** Este neurônio de linhas arredondadas faz lembrar o formato de uma pera. Apresenta dois dendritos primários um em cada polo. O dendrito mais robusto tem característica marcante com uma ramificação tipo emaranhado. O dendrito oposto, de diâmetro menor, projeta-se quase perpendicularmente formando um ângulo ao redor de noventa graus ou levemente obtuso em relação ao eixo principal (**Figura 5.23**). Pela técnica de Sholl, sugere-se que o padrão de ramificação dendrítico é aumentado nas regiões mais proximais em relação ao soma, diminuindo abruptamente na região medial e distal dos ramos no neurópilo (**Figura 5.24**). O neurônio *pear shaped* selecionado apresentou alta densidade de espinhos dendríticos e área de baixa densidade próximo ao corpo celular. Mas em algumas áreas apresentavam espinhos dendríticos em densidades impressionantemente muito altas. Foram observados espinhos isolados ou formando agrupamentos tanto nos ramos dendríticos proximais, médios e distais. Os espinhos eram de todos os tipos, formando um *continuum* de formas e tamanhos, com notável presença de aspectos de transição ou atípicos (**Figura 5.25**).



**B**

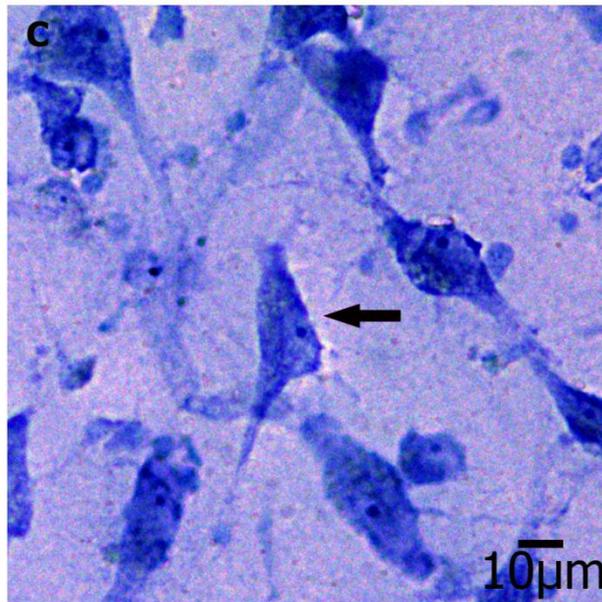
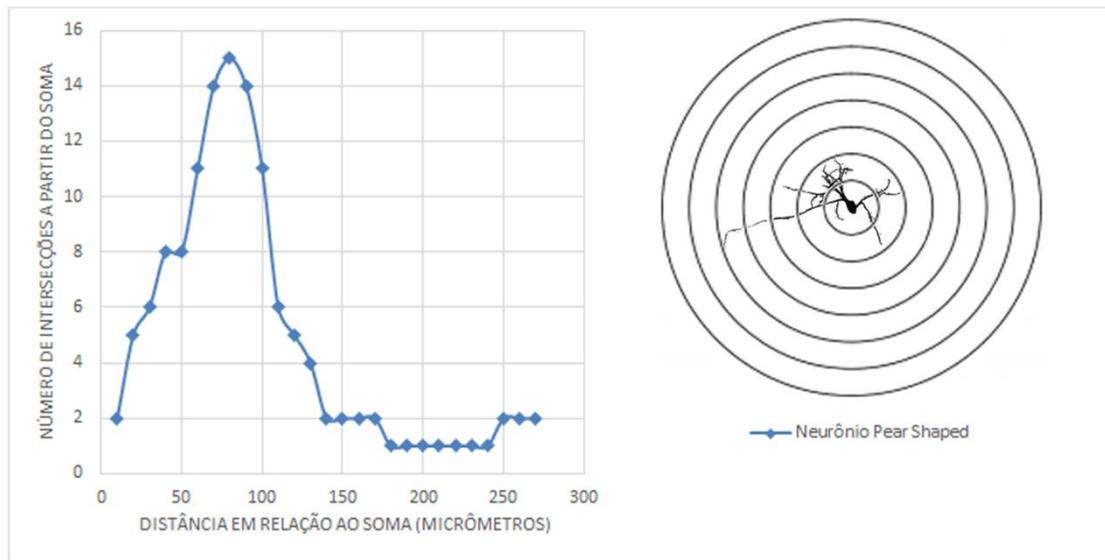


Figura 5.23

**Figura 5.23 Neurônio Pear Shaped.** (A) Desenho esquemático de secção coronal do cérebro adulto humano com a localização do núcleo cortical posterior da amígdala (PCo; 9,3 mm posterior ao ponto médio da comissura anterior; baseado no atlas de Mai et al. (2008). A localização do nACo foi conferida e confirmada na versão do atlas de Mai et al. (2015)), onde foi observado neurônio *pear shaped* (\*). (B) Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensional do neurônio *pear shaped* impregnado pela técnica de Golgi e visualizado por microscopia de luz. (C) Imagem microscópica do corpo neuronal (seta) do neurônio *pear shaped* no núcleo de estudo corado pela técnica da tionina. **Legenda:** BM: núcleo amigdaliano basomedial; sas: sulco semianular; opt: trato óptico; PCo: núcleo amigdaliano cortical região posterior. Coordenadas: S: superior; I: inferior; M: medial; L: lateral.



**Figura 5.24** Análise do padrão de ramificação dendrítica de neurônio *pear shape* empregando-se a técnica dos círculos concêntricos de Sholl (A distancia entre cada círculo concêntrico é de 50µm como ilustrado na parte superior direita da imagem). No gráfico são apresentadas medidas a cada 10µm. Note-se a relação entre o número de ramos dendríticos que passam pelos bordos dos círculos à medida que se estendem pelo neurópilo como indicativo da região dendrítica de predominância de ramificações.

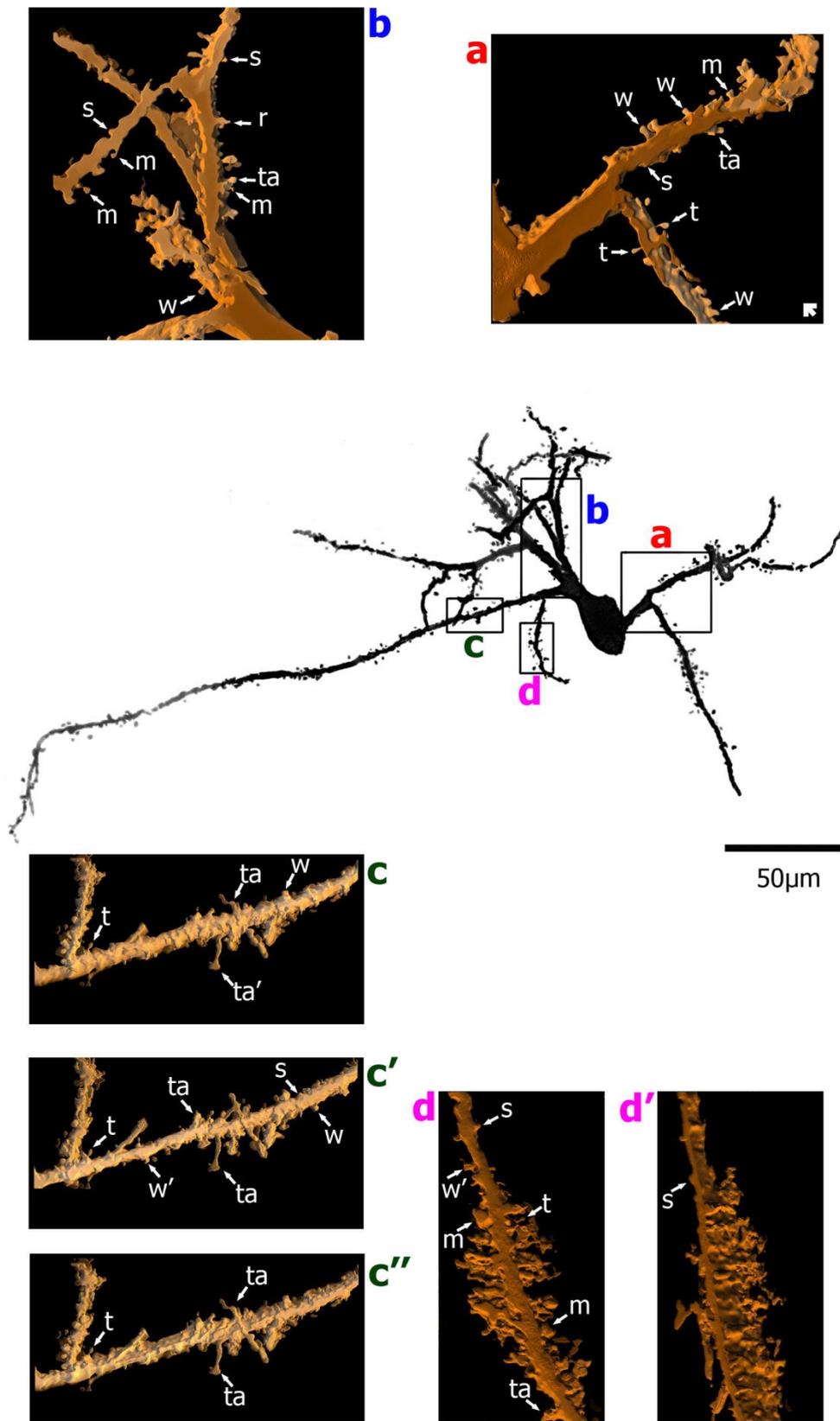
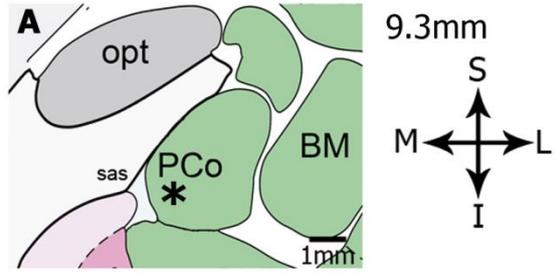


Figura 5.25

**Figura 5.25** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída tridimensionalmente para demonstrar os detalhes morfológicos dos espinhos dendríticos deste mesmo neurônio. A partir da localização do neurônio do centro da figura, as imagens correspondentes às áreas selecionadas (indicadas pelas letras 'a', 'b', 'c' e 'd') estão indicadas de forma correspondente e em maior aumento no entorno. Nas figuras c', c'' e d' a imagem está com discreta rotação para melhor visualização de espinhos dendríticos. Notem-se a presença, distribuição, densidade e diversidade de formas dos espinhos dendríticos nos ramos dendríticos proximais e distais. Os espinhos foram classificados como: 'fino' (t), 'achatado' (s), 'espesso' (w), formato de 'cogumelo' (m), 'ramificado' (r), com 'formas de transição' ou 'atípicos' (ta). Espínulas estão identificadas com um asterisco ao lado do espinho correspondente. Escala tridimensional (válida para todas as imagens) = 2  $\mu$ m.

**9. Neurônio *Fork-Like*.** Este neurônio também de linhas arredondadas faz lembrar o formato de um pingo de água ou de um *balloon-like*. Apresenta somente 1 dendrito primário de grosso calibre (**Figura 5.26**). Pela técnica de Sholl, sugere-se que o padrão de ramificação dendrítico é aumentado nas regiões mediais em relação ao soma, diminuindo na região distal dos ramos no neurópilo (**Figura 5.27**). O neurônio *fork-like* selecionado apresentou alta densidade de espinhos dendríticos e área de baixa densidade próximo ao corpo celular. Mas em algumas áreas apresentavam espinhos dendríticos em densidades impressionantemente muito altas. Foram observados espinhos isolados ou formando agrupamentos tanto nos ramos dendríticos proximais, médios e distais. Os espinhos eram de todos os tipos, formando um *continuum* de formas e tamanhos, com notável presença de aspectos de transição ou atípicos (**Figura 5.28**).



**B**

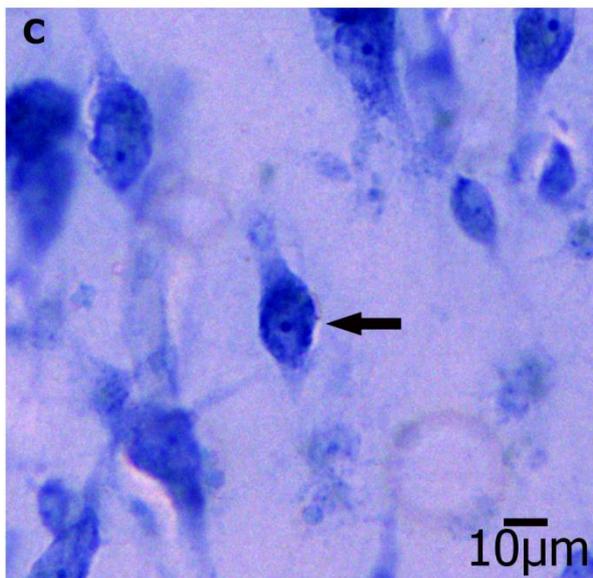
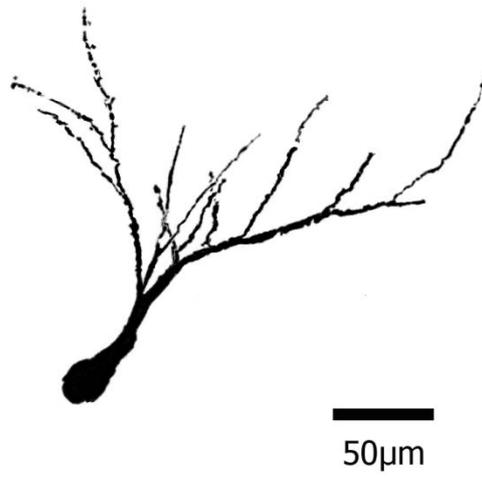
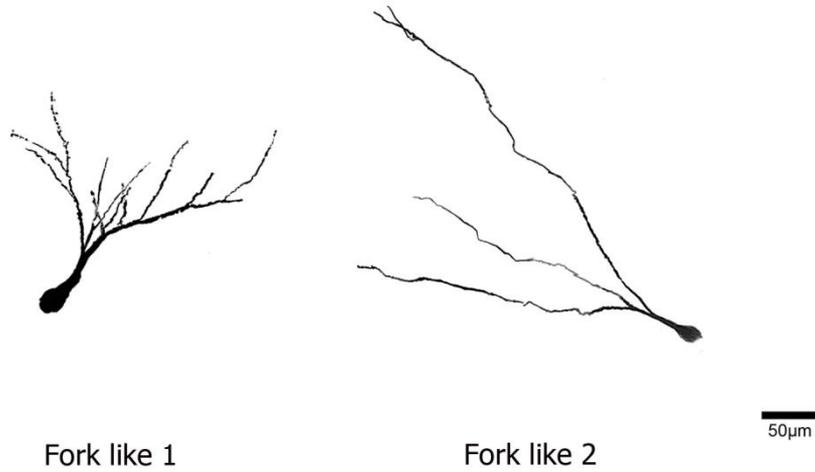
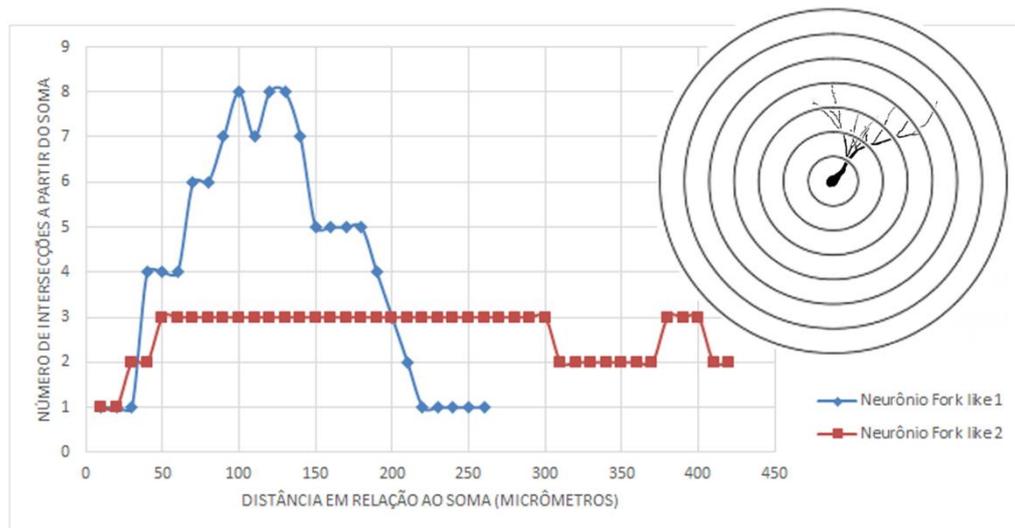


Figura 5.26

**Figura 5.26 Neurônio Fork-Like. (A)** Desenho esquemático de secção coronal do cérebro adulto humano com a localização do núcleo cortical posterior da amígdala (PCo; 9,3 mm posterior ao ponto médio da comissura anterior; baseado no atlas de Mai et al. (2008). A localização do nACo foi conferida e confirmada na versão do atlas de Mai et al. (2015)), onde foi observado neurônio *fork-like* (\*). **(B)** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensional do neurônio *fork-like* impregnado pela técnica de Golgi e visualizado por microscopia de luz. **(C)** Imagem microscópica do corpo neuronal (seta) do neurônio *fork-like* no núcleo de estudo corado pela técnica da tionina. **Legenda:** BM: núcleo amigdaliano basomedial; sas: sulco semianular; opt: trato óptico; PCo: núcleo amigdaliano cortical região posterior. Coordenadas: S: superior; I: inferior; M: medial; L: lateral.

**A****B**

**Figura 5.27 (A)** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensionalmente de neurônios *fork-like* impregnados pela técnica de Golgi e visualizados por microscopia de luz encontrados na amígdala cortical posterior. **(B)** Análise do padrão de ramificação dendrítica empregando-se a técnica dos círculos concêntricos de Sholl (A distância entre cada círculo concêntrico é de 50µm como ilustrado na parte superior direita da imagem). No gráfico são apresentadas medidas a cada 10µm. Note-se a relação entre o número de ramos dendríticos que passam pelos bordos dos círculos à medida que se estendem pelo neurônio como indicativo da região dendrítica de predominância de ramificações.

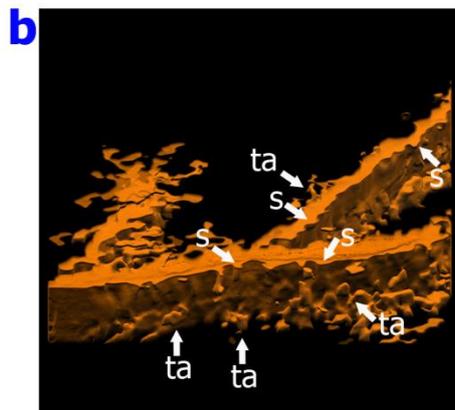
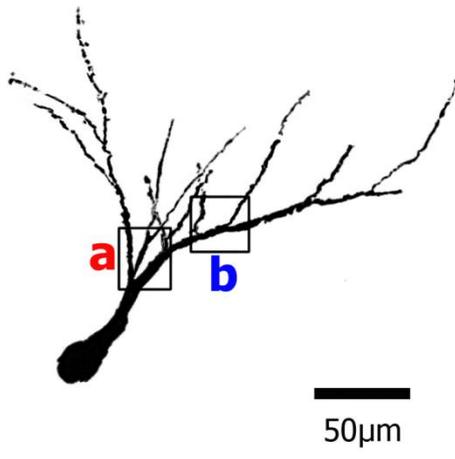
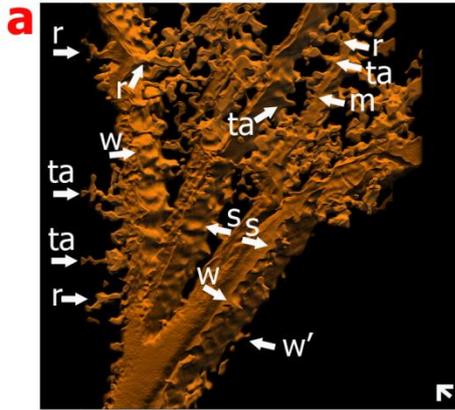
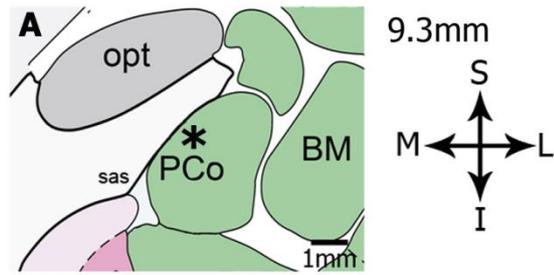


Figura 5.28

**Figura 5.28** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída tridimensionalmente para demonstrar os detalhes morfológicos dos espinhos dendríticos deste mesmo neurônio. A partir da localização no neurônio do centro da figura, as imagens correspondentes às áreas selecionadas (indicadas pelas letras 'a' e 'b') estão indicadas de forma correspondente e em maior aumento no entorno. Notem-se a presença, distribuição, densidade e diversidade de formas dos espinhos dendríticos nos ramos dendríticos proximais e distais. Os espinhos foram classificados como: 'fino' (t), 'achatado' (s), 'espesso' (w), formato de 'cogumelo' (m), 'ramificado' (r), com 'formas de transição' ou 'atípicos' (ta). Espínulas estão identificadas com um asterisco ao lado do espinho correspondente. Escala tridimensional (válida para todas as imagens) = 2  $\mu$ m.

**10. Neurônios Pequenos.** Algumas células neuronais de pequenas dimensões, maiores que a glia e bem menores que as outras formas neuronais foram observadas. Os somas apresentaram diversos formatos. Observamos formatos fusiformes, retangulares e globosos, todos eles com 2 ou 3 dendritos primários (**Figura 5.29**). Pela técnica de Sholl, sugere-se que o padrão de ramificação dendrítico é aumentado nas regiões proximais em relação ao soma, diminuindo abruptamente na região medial e distal dos ramos no neurópilo (**Figura 5.30**). Os neurônios pequenos selecionados apresentaram alta densidade de espinhos dendríticos, inclusive no próprio corpo celular. Foram observados espinhos isolados ou formando agrupamentos tanto nos ramos dendríticos proximais, médios e distais. Os espinhos eram de todos os tipos, formando um *continuum* de formas e tamanhos, com notável presença de aspectos de transição ou atípicos (**Figura 5.31**).



**B**

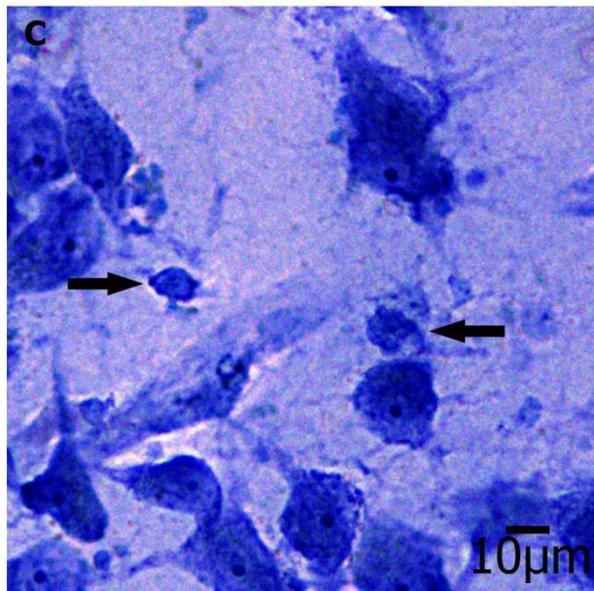
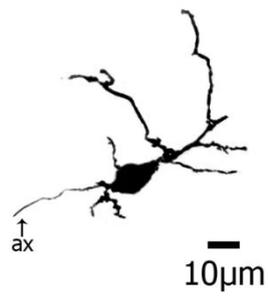
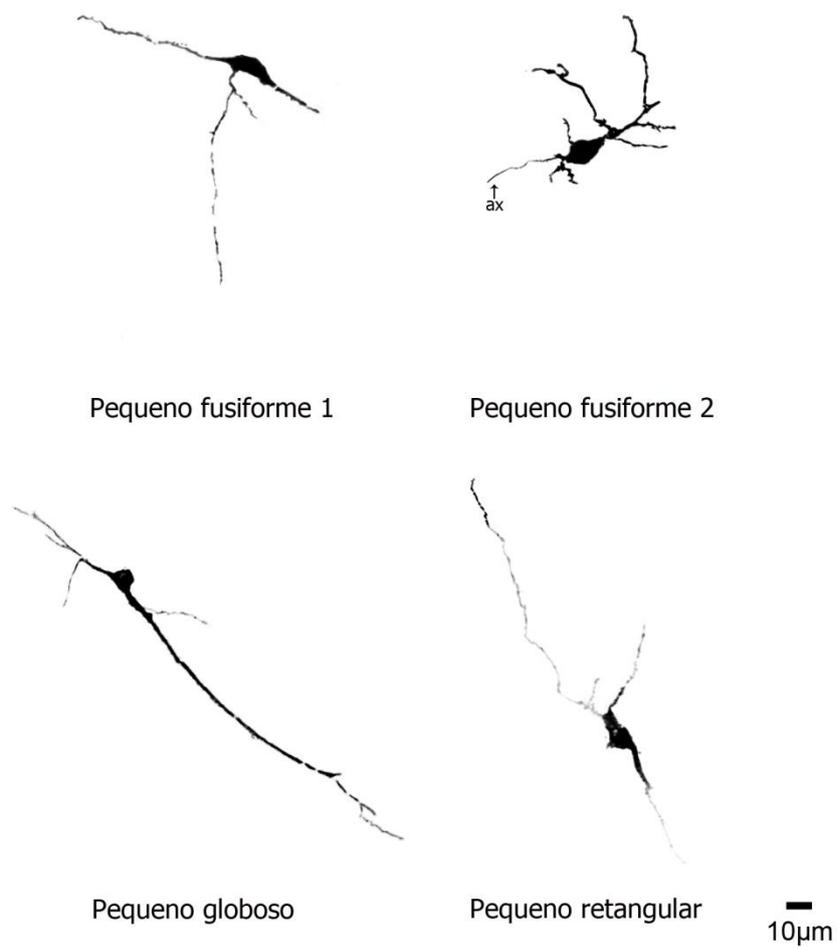


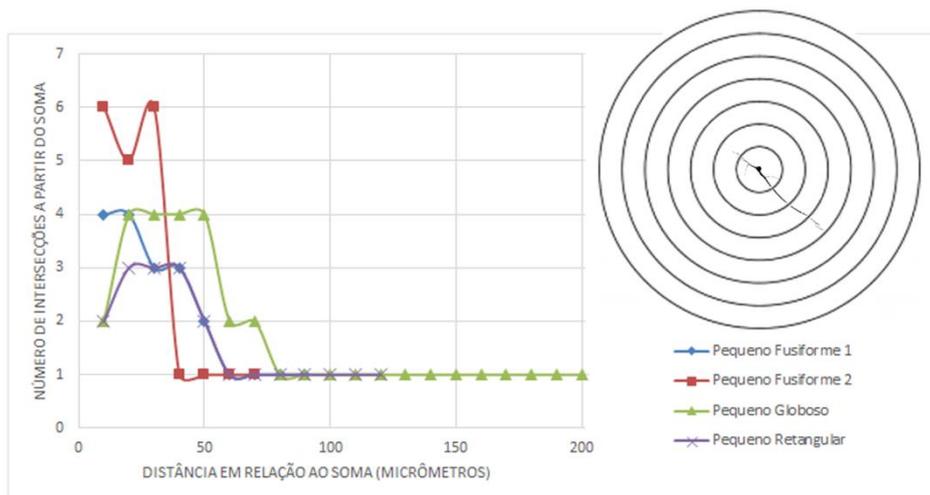
Figura 5.29

**Figura 5.29 Neurônio Pequeno Fusiforme.** **(A)** Desenho esquemático de secção coronal do cérebro adulto humano com a localização do núcleo cortical posterior da amígdala (PCo; 9,3 mm posterior ao ponto médio da comissura anterior; baseado no atlas de Mai et al. (2008). A localização do nACo foi conferida e confirmada na versão do atlas de Mai et al. (2015)), onde foi observado neurônio pequeno fusiforme (\*). **(B)** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensional do neurônio pequeno fusiforme impregnado pela técnica de Golgi e visualizado por microscopia de luz. **(C)** Imagem microscópica do corpo neuronal (seta) do neurônio pequeno fusiforme no núcleo de estudo corado pela técnica da tionina. **Legenda:** BM: núcleo amigdaliano basomedial; sas: sulco semianular; opt: trato óptico; PCo: núcleo amigdaliano cortical região posterior. Coordenadas: S: superior; I: inferior; M: medial; L: lateral.

**A**



**B**



**Figura 5.30**

**Figura 5.30 (A)** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída bidimensionalmente de neurônios pequenos impregnados pela técnica de Golgi e visualizados por microscopia de luz encontrados na amígdala cortical posterior. Observamos axônio (ax) no neurônio pequeno fusiforme 2. **(B)** Análise do padrão de ramificação dendrítica empregando-se a técnica dos círculos concêntricos de Sholl (A distancia entre cada círculo concêntrico é de  $50\mu\text{m}$  como ilustrado na parte superior direita da imagem). No gráfico são apresentadas medidas a cada  $10\mu\text{m}$ . Note-se a relação entre o número de ramos dendríticos que passam pelos bordos dos círculos à medida que se estendem pelo neurópilo como indicativo da região dendrítica de predominância de ramificações.

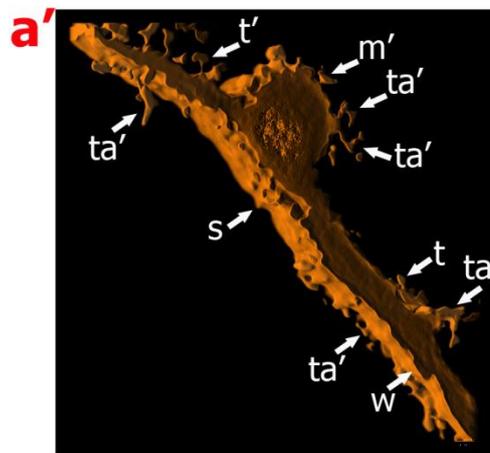
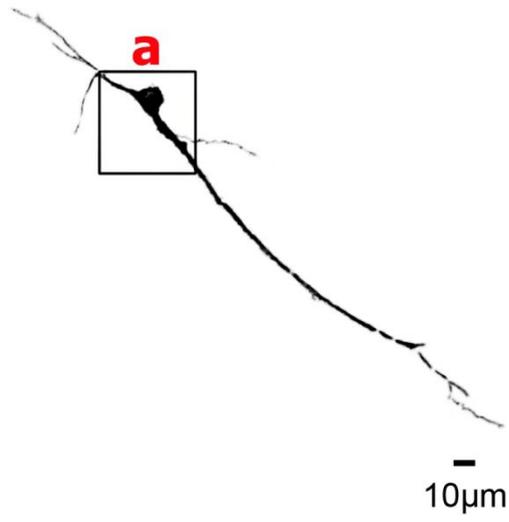
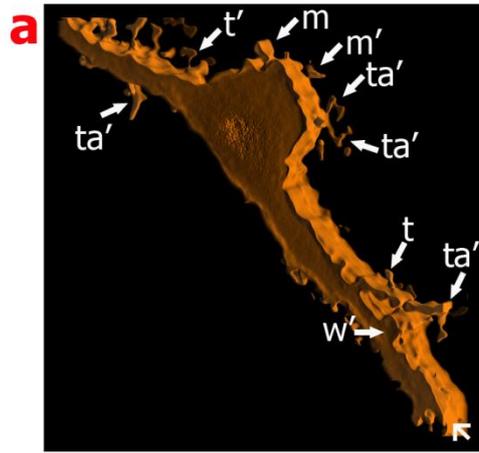


Figura 5.31

**Figura 5.31** Imagem microscópica digitalizada e reconstruída tridimensionalmente para demonstrar os detalhes morfológicos dos espinhos dendríticos deste mesmo neurônio. A partir da localização no neurônio do centro da figura, as imagens correspondentes às áreas selecionadas (indicada pela letra 'a') está indicada de forma correspondente e em maior aumento no entorno. Na figura a' a imagem está com discreta rotação para melhor visualização de espinhos dendríticos. Notem-se a presença, distribuição, densidade e diversidade de formas dos espinhos dendríticos no soma e nos ramos dendríticos proximais e distais. Os espinhos foram classificados como: 'fino' (t), 'achatado' (s), 'espesso' (w), formato de 'cogumelo' (m), 'ramificado' (r), com 'formas de transição' ou 'atípicos' (ta). Espínulas estão identificadas com um asterisco ao lado do espinho correspondente. Escala tridimensional (válida para todas as imagens) = 2  $\mu$ m.

### **Espinhos dendríticos**

Espinhos dendríticos de todas as formas foram observados em todos os neurônios encontrados no nACo humano. Em maiores detalhes, esses espinhos apresentam-se como um *continuum* de formas e tamanhos como pode ser observado após reconstrução tridimensional de imagem. Ademais, apresentaram-se com densidades que qualificamos como baixa, alta e muito alta (**Figura 5.32**).

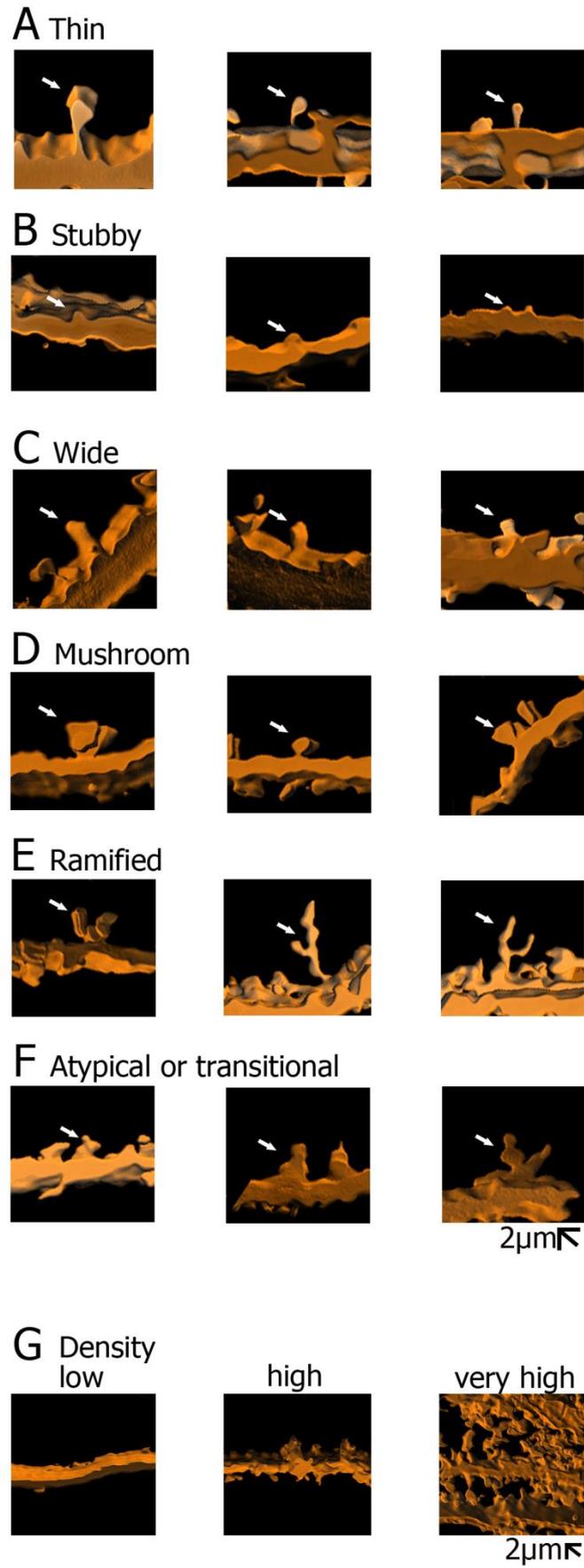
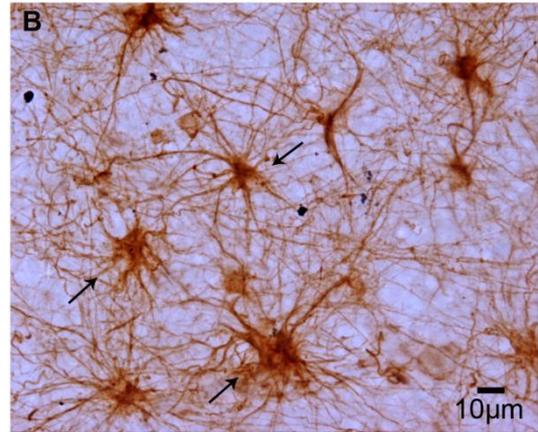
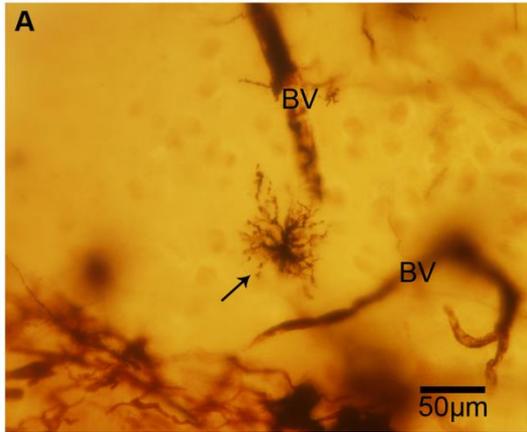


Figura 5.32

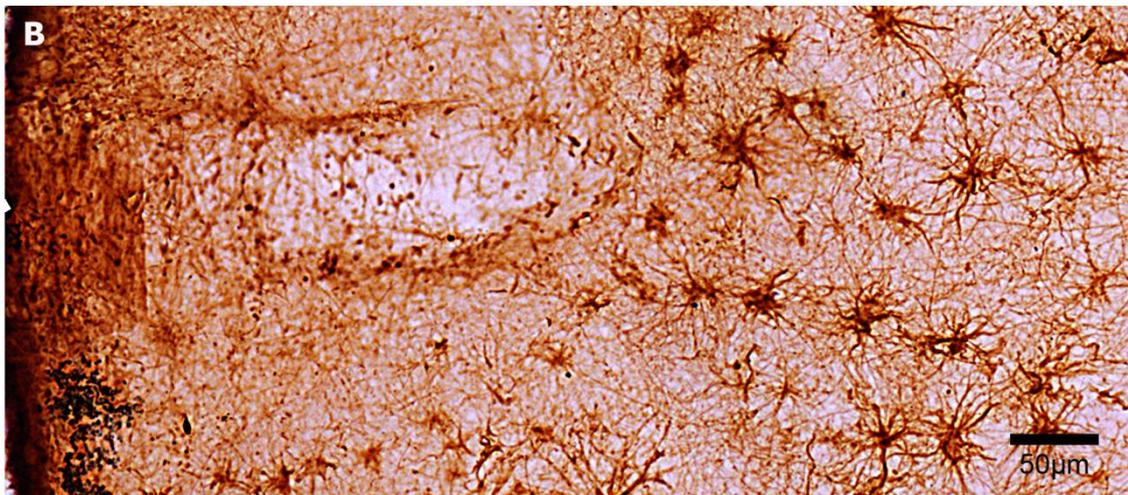
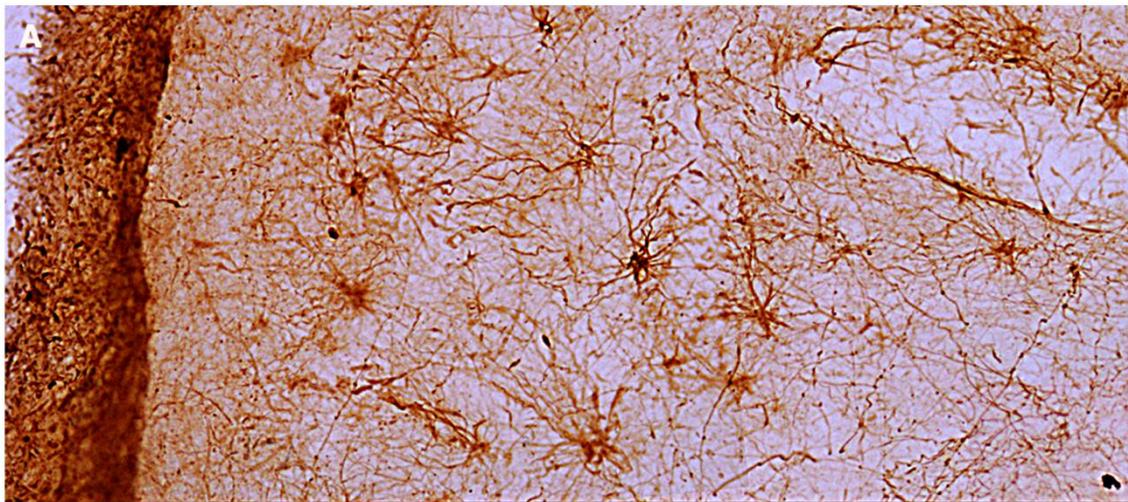
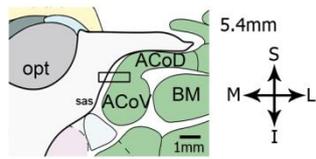
**Figura 5.32** Reconstrução tridimensional de imagem obtida dos espinhos dendríticos impregnados pela técnica de Golgi e observados no núcleo cortical da amígdala humana. Exemplos representativos das diferentes formas são apresentados como espinhos **(A)** finos (*thin*), **(B)** espessos (*stubby*), **(C)** amplos (*wide*), **(D)** tipo cogumelo (*mushroom*), **(E)** ramificados (*ramified*), e **(F)** atípicos ou de transição (*atypical or transitional*). **(G)** A densidade de espinhos dendríticos variou desde baixa (*low*), alta (*high*) até muito alta (*very high*). A barra de escala aplica-se para as imagens correspondentes.

### **Imunohistoquímica para GFAP**

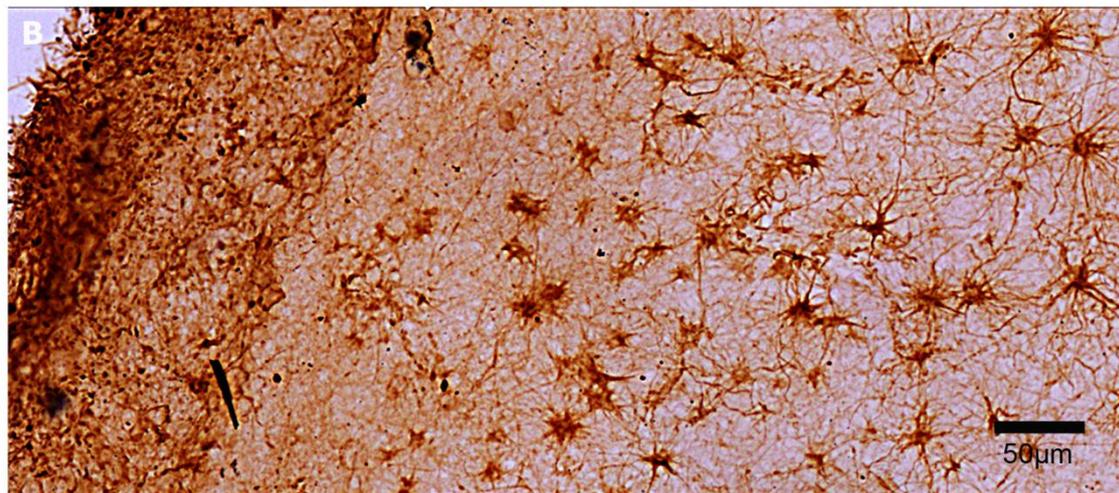
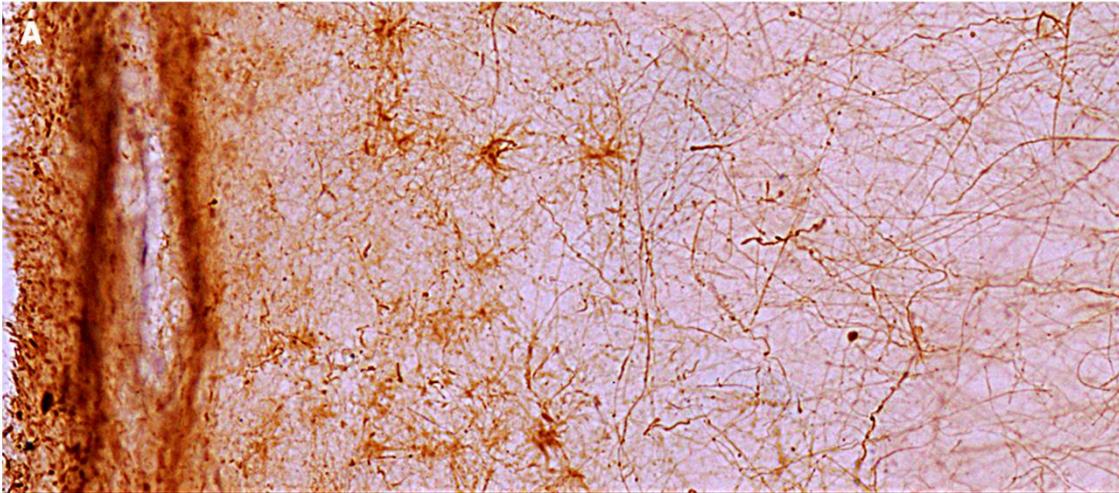
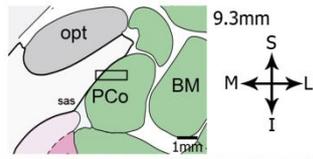
Foram observados astrócitos protoplasmáticos de formato estrelado característico, com prolongamentos que se irradiavam do corpo celular e se projetavam em todas as direções formando uma trama difusa no neurópilo do nACo humano (**Figura 5.33A**). Os resultados de imunohistoquímica para GFAP são congruentes com as imagens obtidas com a técnica de Golgi, a qual proporcionava a identificação de astrócitos com idêntico aspecto (**Figura 5.33B**). Ademais, o aspecto de distribuição dos astrócitos que expressavam GFAP foi variável em duas amostras estudadas, em uma com maior expressão e em outra menor, apesar de terem sido feitos os mesmos procedimentos experimentais e estudadas as mesmas regiões no nACo. Isso indica a possibilidade de variabilidade nessa expressão protéica por várias condições individuais e/ou dos procedimentos em si (**Figuras 5.34 e 5.35**). Próximo da superfície, há alta densidade de prolongamentos astrocitários e, logo a seguir, em direção interna, aparecem corpos astrocitários mais isolados, embora mantenha-se a ramificação profusa dos seus prolongamentos no neurópilo nas partes anterior (**Figura 5.34**) e posterior (**Figura 5.35**) do nACo humana.



**Figura 5.33** Astrócito protoplasmático na região da amígdala cortical posterior. **(A)** Astrócito (seta) com grande número de prolongamentos longos e extremamente ramificados. Técnica de Golgi. **(B)** Astrócitos (setas) com aspecto semelhante aos achados na técnica de Golgi. Nota-se uma trama de ramificação profusa entre os astrócitos. Técnica de imunohistoquímica para GFAP. **Legenda:** BV: vasos sanguíneos; GFAP: Proteína ácida fibrilar glial.



**Figura 5.34** Imagem microscópica do parênquima da região anterior do núcleo cortical da amígdala humana. Observe as diferenças de imunoreatividade dos astrócitos neste núcleo, onde em (A) encontramos áreas com menor imunoreatividade e em (B) áreas com maior imunoreatividade através da técnica de imunohistoquímica para GFAP. **Legenda:** ACoD: região dorsal do núcleo cortical da amígdala; ACoV: região ventral do núcleo cortical da amígdala; BM: núcleo amigdaliano basomedial; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; sas: sulco semianular; opt: trato óptico. Coordenadas: S: superior; I: inferior; M: medial; L: lateral.



**Figura 5.35** Imagem microscópica do parênquima da região posterior do núcleo cortical da amígdala humana. Observe as diferenças de imunoreatividade dos astrócitos neste núcleo, onde em (A) encontramos áreas com menor imunoreatividade e em (B) áreas com maior imunoreatividade através da técnica de imunohistoquímica para GFAP. **Legenda:** BM: núcleo amigdaliano basomedial; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; PCo: núcleo cortical posterior da amígdala; sas: sulco semianular; opt: trato óptico. Coordenadas: S: superior; I: inferior; M: medial; L: lateral.

## VI. DISCUSSÃO

O presente trabalho, original para estudo do nACo humano, empregou a técnica histológica da tionina, a técnica de Golgi desenvolvida para emprego no tecido nervoso humano mantido em solução fixadora comum durante meses, o que permitiu alcançar resultados para o estudo da morfologia neuronal com elevada qualidade e nível de detalhes morfológicos (Dall'Oglio et al., 2010, 2013, 2015; Rasia-Filho et al., 2016), e a técnica de imunohistoquímica para GFAP como complementar ao estudo dos componentes celulares locais. Conforme os objetivos, os resultados obtidos são interpretados de forma descritiva e serão discutidos a seguir com base nos estudos limitados existentes sobre o nACo em nossa espécie e as possibilidades de interpretação dos dados aqui obtidos.

### Limitações técnicas

A técnica de Golgi gera impregnação neuronal pela prata com característica randômica e variável. Em modelos animais rigorosamente controlados, utilizam-se procedimentos de perfusão para fixação tecidual (Glasser and Van der Loos, 1981; Angulo et al., 1996; Gibb et al., 1998), enquanto nas amostras coletadas em humanos isso ocorre principalmente por imersão da amostra em formaldeído (Rosoklija et al., 2003; Friedland et al., 2006; Dal'Oglio et al., 2007, 2010). Isso torna um desafio trabalhar com amostras humanas que são difíceis de padronizar em muitas variáveis que influenciam a viabilidade e conservação do tecido nervoso. Dentre essas estão o tempo decorrido desde o óbito, a temperatura ambiente até a obtenção da amostra para estudo, a *causa mortis* e todas as variáveis que afetavam o doador do tecido ainda em vida (Jacobs et al., 2001; Lu et al., 2013; Garey et al., 2014; Dall'Oglio et al., 2015). Considera-se que até 10% das células nervosas locais ficam visíveis com o emprego da técnica de Golgi (Dall'Oglio et al., 2007). Em nossa experiência com tecido humano, esse percentual é muito menor dependendo das condições de conservação da amostra. Não obstante, a técnica de Golgi continua sendo o procedimento de maior utilidade prática e o mais adequado para revelar a morfologia dos diversos tipos de neurônios no sistema nervoso de diferentes espécies (Torres-Fernandez, 2006).

Há de se considerar que o tecido cerebral humano no período *post-mortem* é submetido à anoxia e a processos autolíticos (Dall'Oglio et al., 2015). Os neurônios

são altamente susceptíveis à lesão isquêmico-hipóxica que se instala em poucos minutos após parada cardiocirculatória. Acabando a oferta de oxigênio aos tecidos, ocorre disfunção metabólica que compromete a bomba de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ , resultando no acúmulo imediato de sódio e água no interior celular, provocando o início do edema celular e na sequência, o dano à membrana celular (Sattar, 2011). Esse edema intracelular pode alterar a identificação da forma de espinhos dendríticos (Fiala et al., 2002; Garcia-López et al., 2007) e de espínulas (Tarrant and Routtenberg, 1977). Por isso que a obtenção de dados morfométricos deve ser tomada com maior cautela ou mesmo não ser realizada para que se evitem resultados muito discrepantes em relação à realidade e advindos de tecido com lesão autolítica e após todo processamento histológico realizado (Dall'Oglio et al., 2015).

### **Neurônios do núcleo cortical do complexo amigdaliano humano**

A posição anatômica do nACo junto à superfície pial do complexo amigdaliano sugere que, no complexo amigdaliano de primatas, este seja um núcleo com característica de área de transição com componentes celulares que lembram estrutura subcortical e os de córtex primitivo com neurônios piramidais (Amaral et al., 1992).

No nACo, os neurônios foram classificados segundo critérios morfológicos onde consideraram-se: (1) soma celular: estudo da forma e tamanho; (2) dendritos: estudo do número, forma, distribuição, comprimento e padrão de ramos dendríticos; e, (3) espinhos dendríticos: estudo da presença, densidade, distribuição e formas (Jones e Peters, 1984). Para cada um dos tipos estudados, a análise dos dados da técnica dos círculos concêntricos de Sholl (Sholl, 1956) indicam as tendências de distribuição espacial dos ramos dendríticos e a arquitetura neuronal. Essas informações não estão completas para interpretação inequívoca dos resultados o que pode ser explicado pelo fato de que nem todos os ramos dendríticos foram observados completamente em sua extensão. Esta é uma limitação inerente à técnica de Golgi, da espessura da secção tecidual e do grau de impregnação de cada neurônio. Não obstante, foram estudados os neurônios mais representativos de cada tipo e que melhor impregnação apresentavam.

Dados sobre axônios não foram obtidos ou por restrição técnica ou por existirem prolongamentos mielinizados nos neurônios locais e que não foram impregnados pela prata. De fato, o estudo dos axônios pela técnica de Golgi é dificultado pelo fato de que a maioria dos axônios são impregnados somente em um

pequeno trajeto a partir da sua origem, justamente na região não mielinizada do seu segmento inicial (Sloper e Powell, 1976, 1979). Como não há estudos eletrofisiológicos ou hodológicos dos neurônios do nACo humano, o papel funcional de cada um deles é ainda desconhecido, embora inferências possam ser feitas baseadas em dados de outras espécies ou outras áreas cerebrais (Gloor, 1997). Toda a celularidade diversificada encontrada pode significar que esse núcleo desempenha múltiplas funções de integração e processamento de informações em seres humanos, possivelmente envolvendo vários circuitos ou subpopulações neuronais.

Desta forma, o neurônio Piramidal Modificado (**Figura 5.2**) é o que mais se aproxima do tipo neuronal piramidal. Para poder classificar e denominar este neurônio como *pyramidal-like*, fizemos uma comparação com os neurônios piramidais do córtex cerebral, para assim podermos discutir e justificar nossos achados e o porquê dessa nomenclatura. Nos neurônios piramidais corticais, o corpo celular geralmente tem formato cônico ou triangular. Algumas variedades de soma, como a esférica, ovoide, romboidal e formas irregulares podem ser encontradas (Vaughan, 1977; Jones e Peters, 1984). Os neurônios piramidais têm somas de diversos tamanhos (Feldman, 1976). O soma via de regra é liso, mas excepcionalmente um pequeno número de espinhos pode ser encontrado na sua superfície (Jones e Peters, 1984).

A característica principal dos neurônios piramidais corticais é a presença de um dendrito apical dominante, com um diâmetro maior em comparação aos dendritos basais, que surge no ápice do corpo celular e vai verticalmente em direção à superfície pial, onde se ramifica em tufo ou rede de ramos terminais. A demarcação do dendrito apical com o soma é ambígua, enquanto, a demarcação dos dendritos basais com o corpo celular parece ser algo mais evidente. Tipicamente o número de ramos dendríticos oblíquos que surgem no dendrito apical está em torno de 2 a 5. Nos dendritos basais são de 3 a 5 ramos (Jones e Peters, 1984). Há espinhos dendríticos em todos os ramos, embora seja notável a menor densidade ou mesmo a ausência desses elementos nos ramos mais proximais (Valverde, 1967; Jones, 1975).

Outras formas modificadas de neurônios com características piramidais são encontrados no córtex cerebral. Estes neurônios tem dendrito apical curto, bifurcado ou ausente, e muitas vezes não formam tufo terminal (Jones e Peters, 1984). No nACo encontramos neurônios muito parecidos a neurônios piramidais, classificados como outras formas modificadas de neurônios com características piramidais, por isso sua denominação de piramidal modificado ou *pyramidal-like* como descrito por Jones (1984; **Figura 5.2 e 5.3A**). Desse modo os neurônios *pyramidal-like* poderiam ser

considerados como uma forma primitiva de neurônios piramidais no *continuum* subcortical-allocórtex-neocórtex (Rasia-Filho et al., 2016). No nACo encontramos formas *pyramidal-like* e não evidenciamos nenhum neurônio tipicamente piramidal. Devido a posição anatômica que este núcleo ocupa é possível que seja uma área transicional para o allocórtex (sistema olfatório e hipocampo que se caracterizam por apresentar 3 a 4 camadas, em contraste com as 6 camadas do neocórtex cerebral).

O neurônio fusiforme do nACo (**Figura 5.5**) deveria ser comparado com neurônio que existe no córtex cerebral denominado de 'bipolar', com nomenclatura imprópria dado o fato de apresentar 2 dendritos surgindo do soma (Jones e Peters, 1984). O dito neurônio 'bipolar' tem soma em formato ovoide ou em fuso (Peters e Kimerer, 1981), apresenta dimensões relativamente uniformes e são considerados os menores neurônios das áreas neocorticais (Jones e Peters, 1984). Isso difere nos nossos achados, onde o tipo fusiforme manteve o mesmo padrão de dimensões comparativamente as outras formas neuronais presentes no nACo. Somente uma forma fusiforme com muito menor dimensão foi classificado como neurônio pequeno e será discutido logo a seguir.

Ademais, assim como no neurônio 'bipolar', o neurônio fusiforme encontrado no nACo é formado por 2 dendritos principais, um desses dendritos apresentando orientação pial. Cada dendrito emerge de um polo do corpo celular. Mas às vezes em um dos polos podem surgir até dois dendritos (bipolar bífido ou em nosso caso fusiforme bífido; **Figura 5.6A**). Em certos casos, pode emergir um dendrito muito fino e curto de um lado do corpo celular. A orientação vertical dos dendritos faz com que o neurônio apresente um ramo dendrítico ascendente e um ramo descendente que raramente são simétricos (Jones e Peters, 1984). O ramo do dendrito ascendente no neurônio bipolar às vezes pode mudar de direção e tomar sentido descendente, isto não visualizado nos neurônios fusiformes no nACo. Em alguns neurônios bipolares localizados no córtex cerebral os dendritos ascendentes chegam à camada superficial (em direção pial), enquanto os dendritos descendentes podem alcançar camadas mais profundas (em direção à substância branca; Peters e Kimerer, 1981; Jones e Peters, 1984). Coincidentemente, os formatos fusiformes no nACo mantinham essa orientação espacial acompanhando os neurônios *pyramidal-like*.

Os neurônios 'bipolares' no córtex cerebral têm dendritos lisos, mas às vezes alguns espinhos pequenos podem estar presentes (Feldman e Peters, 1978; Jones e Peters, 1984). Contrariamente aos nossos achados, os dendritos dos neurônios fusiformes no nACo apresentaram alta densidade de espinhos dendríticos.

Observamos espinhos dendríticos em toda a extensão dos dendritos mantendo um padrão de densidade constante somente diminuta nas regiões proximais dos dendritos.

Nos neurônios 'bipolares' do córtex cerebral, geralmente seus axônios, mielinizados ou não-mielinizados, tem origem verticalmente ao dendrito primário descendente e assumem a seguir trajetória ascendente ou descendente (Peters e Kimerer, 1981). Os axônios destes neurônios bipolares formam sinapses assimétricas com neurônios piramidais provocando nestes efeitos excitatórios (Jones e Peters, 1984). Geralmente recebem sinapses inibitórias no corpo celular e no seu dendrito proximal de neurônios estrelados sem espinhos ou escassos espinhos dendríticos (*smooth* ou *sparsely spined stellate neurons*) e de células bipenachadas (*bitufted*; Peters e Fairén, 1978; Peters e Proskauer, 1980). Os dendritos em suas regiões mais distais recebem aferências excitatórias (Jones e Peters, 1984). Alguns destes neurônios são marcados com anticorpos para o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP-positivos). O papel do VIP no córtex cerebral é desconhecido, mas quando é aplicado em neurônios corticais produz forte excitação (Phillis et al., 1978; Dodd et al., 1979). Outros neurônios em contrapartida são marcados com anticorpos para o peptídeo colecistocinina (CCK-positivos) que igualmente excita neurônios no córtex cerebral (Innis et al., 1979; Emson e Hunt, 1981). Os neurônios CCK-positivos são encontrados em maior quantidade do que os neurônios VIP-positivos (Emson e Hunt, 1981; Peters et al., 1983). Esses dados também sugerem que estes peptídeos podem ser neurotransmissores primários e que podem existir duas subpopulações de neurônios bipolares (Jones e Peters, 1984). Por essas características similares, talvez o neurônio de formato fusiforme no nACo possa ser uma subpopulação de neurônio bipolar com alta densidade de espinhos dendríticos e, portanto, poderia ser considerado um neurônio bipolar-*like*, o que requer estudos adicionais para sua comprovação.

Provavelmente, pelas suas características morfológicas, outras formas neuronais encontradas no nACo podem ter alguma relação com os tipos celulares encontrados no neocórtex cerebral, os denominados neurônios estrelados com alta densidade de espinhos dendríticos (*spiny stellate neurons*) e os neurônios estrelados sem espinhos ou escassos espinhos dendríticos. Os neurônios estrelados com alta densidade de espinhos dendríticos são os neurônios mais característicos da camada IV do córtex cerebral (Jones e Peters, 1984). Esses neurônios se assemelham aos neurônios piramidais corticais, porém com a diferença principal entre eles e que os distingue é a ausência do dendrito apical característico dos neurônios piramidais (Lund, 1973). O corpo celular pode ser redondo ou ovoide. Geralmente são

multipolares, pois apresentam de 3 a 7 dendritos primários que se irradiam em todas as direções. A forma do corpo da célula é determinada pelo número e a largura relativa dos seus dendritos primários (Rasia-Filho et al., 1999; Dall'Oglio et al., 2013).

Os neurônios estrelados sem espinhos ou escassos espinhos dendríticos representam somente 5% do total dos neurônios corticais e apresentam 3 subpopulações de tipos neuronais que são os neurônios denominados de células em cesto (*basket cell*), as células em duplo ramallete (*double bouquet cells*) e as células em calendabro (*chandelier cells*; Jones e Peters, 1984). As células em cesto são células estreladas, grandes e abundantes que são observadas no córtex visual e córtex motor nas camadas III e V. Do seu soma surgem 4 a 10 dendritos de grosso calibre que são geralmente sinuosos, longos, lisos, sem espinhos ou escassos espinhos dendríticos (Jones, 1975). As células em duplo ramallete têm esta nomenclatura por que esses neurônios formam duplo ramo dendrítico. Esta característica de arborização dendrítica praticamente simétrica que surge em dois níveis é chamada também de bipeenachada (*bitufted*; Jones e Peters, 1984; Rasia et al., 1999) e apresentam características de neurônios inibitórios (Ribak et al., 1979; Somogyi et al., 1983). As células em candelabro são reconhecidas pela forma terminal dos seus axônios que formam estruturas tipo “velas” orientadas verticalmente lembrando um candelabro. Fazem assim, sinapses com o segmento inicial do axônio das células piramidais (Somogyi, 1977). O soma geralmente é ovoide ou fusiforme com dendritos surgindo no polo superior e inferior produzindo uma figura de árvore dendrítica da forma bipeenachada e parecem estar envolvidas na inibição de neurônios piramidais (Fairén e Valverde, 1980).

As células em duplo ramallete e células em candelabro não foram encontradas no nACo. Os formatos celulares que denominamos de angular-esférico (**Figura 5.8**), triangular (**Figura 5.11**), retangular (**Figura 5.14**), poligonal-estrelado (**Figura 5.17**) e o redondo-cônico (**Figura 5.20**) pelas suas características poderiam talvez ser considerados como pertencendo a tipos de neurônios estrelados com alta densidade de espinhos dendríticos ou de células em cesto. Estas formas têm em comum a de apresentar de 6 a 7 dendritos primários com diversas arquiteturas na sua árvore dendrítica, podendo apresentar desde altas densidades até baixas densidades de espinhos dendríticos. O formato do soma também é uma diferença entre eles. Outros estudos devem ser feitos para confirmar estas suposições que podem abrir um novo campo de investigação.

Em relação ao neurônio angular-esférico, deve-se considerar relato anterior sobre uma forma de neurônio encontrado no MeA humano com corpo celular de formato triangular com presença de 3 dendritos primários e que não correspondem às características morfológicas de neurônios piramidais (Dall'oglio et al., 2013). No nACo foi visualizado neurônio lembrando tal formato angular, mas, após reconstrução 3D, revelou-se tendo forma esférica apresentando até 6 dendritos primários, como descrito nos resultados. Isto nos leva a crer que este neurônio é uma forma diferente daquela achada na MeA denominada de angular e por isso o denominamos de angular-esférico.

O neurônio retangular já foi relatado no MeA humano onde foi observado em pequeno número e apresentando-se com soma grande e múltiplos dendritos primários (Dall'oglio et al., 2013). No nACo este neurônio manteve essas mesmas características, embora essa forma neuronal tenha sido achada de maneira mais frequente neste estudo.

O neurônio *pear shaped* (Figura 5.23) que encontramos no nACo tem a mesma estrutura morfológica àquela descrita no MeA humano, onde apresenta forma de pera, 2 dendritos primários característicos com padrão de ramificação moderada (Dall'Oglio et al., 2013). No nACo o ramo dendrítico mais proeminente se mostrou mais emaranhado comparativamente com aqueles descritos no MeA. Já o neurônio *fork-like* (Figura 5.26 e 5.27A) tem somente um dendrito principal o que lhe confere ocorrência única nesta região do nACo.

Por último, decidimos classificar como neurônios pequenos (Figura 5.29 e 5.30A), um grupo de formas neuronais que apesar de apresentar diversas formas somáticas tinham a peculiaridade de serem bem menores comparativamente com as outras formas neuronais anteriormente relatadas. Nossa observação pela técnica da tionina confirmou esses achados. Também no córtex cerebral, na camada II e IV, são encontrados neurônios muito pequenos denominados de células gliaformes (*neurogliaform cells*) ou células em teia de aranha (*spiderweb cells*). Esses neurônios são quase minúsculos, com um grande número de radiações dendríticas finas, pequenas, com varicosidades e sem ramificações (Ramón y Cajal, 1922; Valverde, 1971, 1978). Os neurônios pequenos no nACo, porém, apresentam dimensões maiores que as células gliais e, além disso, não têm característica multidendrítica.

De Olmos, (2004) refere que em cada subnúcleo do nACo nos mamíferos estudados predominavam algumas formas neuronais específicas. Enquanto na ACo há predominância de formas *pyramidal-like* e fusiformes, na PCo estão as formas

angular e *fork-like*. Diferentemente, na nossa observação, encontramos as 10 formas neuronais supracitadas em número significativo e amplamente distribuídas tanto na ACo (**Figura 5.1A**) quanto na PCo (**Figura 5.1B**).

Quanto aos espinhos dendríticos, pelas imagens obtidas nas reconstruções 3D, podemos observar claramente que existem todas as formas relatadas considerando trabalhos anteriores que guiaram nosso estudo. Ou seja, os espinhos dendríticos apresentam as mesmas características relatadas por Jones e Peters (1984) e por Dal'Oglio et. al. (2015) em cérebro humano.

A maioria das formas neuronais apresentou alta densidade de espinhos dendríticos em quase todos os segmentos dos seus ramos dendríticos, somente poupando o segmento inicial. Particularmente os neurônios das formas angular e retangular em alguns segmentos dendríticos apresentavam zonas com alta densidade de espinhos dendríticos intercalando com outras zonas de baixa densidade. Os somas neuronais via de regra não apresentaram espinhos dendríticos, a não ser o soma dos neurônios pequenos, onde ficou bem caracterizado por apresentarem em toda sua superfície espinhos dendríticos facilmente visualizados em grande quantidade. Muito impressionante é que nas formas neuronais *pear-shaped* e *fork-like* observamos algumas áreas com densidade muito alta de espinhos dendríticos difíceis de individualizar, contar e classificar.

Mudanças dinâmicas no número e na forma dos espinhos dendríticos podem ocorrer ao longo da vida (Toni et al., 1999; Kuwajima et al., 2013; Tonnesen et al., 2014; van der Zee, 2015). Em que momento os espinhos dendríticos estão sendo estudados é uma variável que em humanos é difícil determinar. A densidade de espinhos dendríticos em um segmento dendrítico é o resultado do aporte sináptico que esta área recebe e que diferentes formas dos espinhos podem se relacionar com a complexidade da modulação sináptica (Kasai et al., 2003; Hermel et al., 2006; Alvarez et al., 2007; Arellano et al., 2007; Dall'Oglio et al., 2008a, b, 2015; Rasia et al., 2009; Arpini et al., 2010; Brusco et al., 2010; Zancan et al., 2015). Nosso estudo sugere como são os espinhos em pacientes hígidos neurologicamente, embora valha lembrar que as amostras foram obtidas em indivíduos entre 47 e 75 anos de idade, que provavelmente sofreram efeitos do envelhecimento, de doenças e situação crítica a que estiveram expostos, além dos efeitos da lesão celular provocadas pelo óbito do indivíduo até a colocação da peça coletada em material de preservação, entre 6-12h *post-mortem*. Todas essas condições podem gerar alterações da densidade e forma dos espinhos dendríticos (Purpura, 1974; Connor and Diamond, 1982; Marcuzzo et al.,

2007; Khibnik et al., 2015). Não obstante, todos os tipos de espinhos dendríticos foram observados no nACo humano sem preponderância específica em algum tipo neuronal (**Figura 5.32**; Peters e Kaiserman-Abramof, 1970; Dall'Oglio et al., 2015). As formas transicionais ou atípicas foram as mais numerosas e se caracterizaram por aspecto polimórfico, complexo, randômico e de difícil classificação em algum tipo específico. As reconstruções 3D evidenciam espinhos finos, achatados, espessos, com formato de cogumelo, ramificados, atípicos ou transicionais.

### **Astrócitos do núcleo cortical do complexo amigdaliano humano**

No presente estudo descritivo, encontramos numerosos astrócitos protoplasmáticos no nACo humano (**Figura 5.33**). Os resultados da imunorreatividade para GFAP complementaram a identificação dos astrócitos protoplasmáticos comparativamente com os corados com tionina em todas as áreas do nACo. Cabe mencionar que os corpos celulares gliais não apresentam formas uniformes, sendo observados corpos esféricos e polimórficos. Dos corpos celulares surgem ramos múltiplos, espessos e finos que apresentaram comprimentos variáveis formando uma rede entre eles (**Figura 5.33B**). Estes astrócitos foram encontrados isolados ou aglomerados geralmente na proximidade de vasos sanguíneos. Achados parecidos com essa trama complexa entre astrócitos também foram relatados no MeA humana (Dall'Oglio et al., 2013). Adicionalmente, observamos que existe uma densidade astrocitária heterogênea no nACo, maior na parte mais externa com extensa ramificação astrocitária e menor na parte mais interna nuclear, onde predominavam especialmente corpos celulares e prolongamentos mais isolados. Foi igualmente observado que as mesmas áreas estudadas apresentavam maior e menor imunoreatividade para a GFAP independentemente do lado hemisférico estudado (**Figura 5.34 e 5.35**). Essas diferenças podem ser devido a diferenças sutis envolvendo a técnica e a quantidade de epitopos de ligação para o anticorpo empregado ou mesmo a diferenças próprias de cada indivíduo.

## VII. CONCLUSÕES

O nACo humano apresenta neurônios tipo *piramidal-like*. Isso lhe confere características de área de transição para o allocórtex e de área de surgimento evolutivo de tais neurônios no *continuum* subcortical-allocórtex-neocórtex. A presença de 10 tipos neuronais sugere que tal diversificação celular representa múltiplas funções de integração e processamento de informações em seres humanos.

As reconstruções 3D evidenciam no nACo espinhos finos, achatados, espessos, com formato de cogumelo, ramificados e atípicos ou transicionais. Todos os tipos de espinhos dendríticos observados não apresentam preponderância específica em algum tipo neuronal.

Os astrócitos protoplasmáticos no nACo apresentam características parecidas às descritas na MeA humana.

## VIII. PERSPECTIVAS

Nossa expectativa é fazer um mapeamento e explorar todos os subnúcleos do complexo amigdaliano humano descrevendo as formas neuronais de cada região. Desta forma, pretende-se comparar os diversos núcleos e estabelecer semelhanças e diferenças e estudar as possíveis relações filogenéticas, estruturais e de conexão entre cada núcleo amigdaliano humano.

## REFERÊNCIAS

- Adolphs R, Tranel D.** Amygdala damage impairs emotion recognition from scenes only when they contain facial expressions. *Neuropsychologia*. 2003; 41:12181-12189.
- Alvarez VA, Sabatini BL.** Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*. 2007; 30:79-97.
- Amaral DG, Price JL, Pitkänen A, Carmichael ST.** Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In: Aggleton JP, Editor. *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*. New York: Wiley-Liss. 1992; p 1-66.
- Amaral DG, Schumann CM, Nordahl CW.** Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci*. 2008; 31:137–145.
- Angulo A, Fernández E, Merchán JA, Molina M.** A reliable method for Golgi staining of retina and brain slices. *J Neurosci Methods*. 1996; 66:55-9.
- Araque A, Párpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG.** Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 1999; 22:208–215.
- Arellano JI, Benavides-Piccione R, Defelipe J, Yuste R.** Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci*. 2007; 1(1):131-43.
- Arpini M, Menezes IC, Dall'Oglio A, Rasia-Filho AA.** The density of Golgi-impregnated dendritic spines from adult rat posterodorsal medial amygdala neurons displays no evidence of hemispheric or dorsal/ventral differences. *Neurosci Lett*. 2010; 469(2):209-13.
- Aust S, Stasch J, Jentschke S, Härtwig EA, Koelsch S, Heuser I, Bajbouj M.** Differential effects of early life stress on hippocampus and amygdala volumes as a function of emotional abilities. *Hippocampus*. 2014; 24:1094-101.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA.** *Neuroscience: exploring the brain*. Wolters Kluwer. Philadelphia. 4<sup>th</sup> Edition. 2016.
- Beltramino C, Taleisnik S.** Facilitatory and inhibitory effects of electrochemical stimulation of the amygdala on the release of luteinizing hormone. *Brain Res*. 1978; 144:95-107.
- Benjamin RM, Jackson JC.** Unit discharges in the mediodorsal nucleus of the squirrel monkey evoked by electrical stimulation of the olfactory bulb. *Brain Res*. 1974; 75:181-191.
- Benzing WC, Mufson EJ, Jennes L, Stopa EG, Armstrong DM.** Distribution of neurotensin immunoreactivity within the human amygdaloid complex: A comparison with acetylcholinesterase- and Nissl-stained tissue sections. *J Comp Neurol*. 1992; 317:283-297.
- Bian X.** Physiological and morphological characterization of GABAergic neurons in the medial amygdala. *Brain Res*. 2013; 1509:8-19.
- Breiter HC, Etcoff NL, Whalen PJ, Kennedy WA, Rauch SL, Buckner RL, Strauss MM, Hyman SE, Rosen BR.** Response and habituation of the human amygdala during visual processing of facial expression. *Neuron*. 1996; 17:875-887.
- Brightman MW, Reese TS.** Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol*. 1969; 40:647-677.
- Brodal A.** *Neurological Anatomy*. Oxford University Press, New York; 1981. 1053 pp.
- Brusco J, Wittmann R, de Azevedo MS, Lucion AB, Franci CR, Giovenardi M, Rasia-Filho AA.** Plasma hormonal profiles and dendritic spine density and morphology in the hippocampal CA1 stratum radiatum, evidenced by light microscopy, of virgin and postpartum female rats. *Neurosci Lett*. 2008; 438(3):346-50.
- Brusco J, Dall'Oglio A, Rocha LB, Rossi MA, Moreira JE, Rasia-Filho AA.** Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial amygdala. *Neurosci Lett*. 2010; 483(2):152-6.
- Carrer HF.** Mesencephalic participation in the control of sexual behavior in the female rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1978; 92:877-887.

- Carroll BT, Goforth HW, Carrol LA.** Anatomic basis of Klüver-Bucy syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1999; 11(1):116.
- Casas SG, Mateus S, de Oliveira VR, Abramo AC.** Importância do “órgão vômero nasal” humano. *Rev Soc Bras Cir Plást.* 1998; 13(3):43-50.
- Chen S, Sabatini BL.** Signaling in dendritic spines and spine microdomains. *Curr Opin Neurobiol.* 2012; 22:389–396.
- Connor JR, Diamond MC.** A comparison of dendritic spine number and type on pyramidal neurons of the visual cortex of old adult rats from social or isolated environments. *J Comp Neurol.* 1982; 210(1):99-106.
- Connor JR, Peters A.** Astrocytic response to CNS injury. *Soc Neurosci Abstr.* 1982; 8:239.
- Conti RP, Arnone JM.** Neuropsychiatric Symptoms of Urbach-Wiethe Disease. *International Journal of Clinical and Experimental Neurology.* 2015; 3(2):45-50.
- Dall'Oglio A, Marcuzzo S, de Castilhos J, Rasia-Filho AA.** Método de Golgi., In Bittencourt JC e Elias CF. *Métodos em neurociência.* 1ª Ed. Roca, São Paulo, 2007; 3:33-56.
- Dall'Oglio A, Gehlen G, Achaval M, Rasia-Filho AA.** Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: further data based on the Golgi method. *Neurosci Lett.* 2008a; 430(2):151-6.
- Dall'Oglio A, Gehlen G, Achaval M, Rasia-Filho AA.** Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the "ventral" medial amygdala subnuclei of adult male and female rats. *Neurosci Lett.* 2008b; 439(3):287-92.
- Dall'Oglio A, Ferrme D, Brusco J, Moreira JE, Rasia-Filho AA.** The “single-section” Golgi method adapted for formalin-fixed human brain and light microscopy. *J Neurosci Methods.* 2010;189:51-55.
- Dall'Oglio A, Xavier LL, Hilbig A, Ferme D, Moreira JE, Achaval M, Rasia-Filho AA.** Cellular components of the human medial amygdaloid nucleus. *J Comp Neurol.* 2013; 521(3):589-611.
- Dall'Oglio A, Dutra ACL, Moreira JE, Rasia-Filho AA.** The human medial amygdale: structure, diversity and complexity of dendritic spines. *J Anat.* 2015; 227:440-459.
- de Castilhos J, Rigon P, Xavier LL, Rasia-Filho AA, Achaval M.** Sex differences in NADPH-diaphorase activity in the rat posterodorsal medial amygdala. *Brain Res.* 2009; 1305:31–39.
- de Olmos JS.** Amygdala. In: Paxinos G, Mai J. (eds). *The Human Nervous System.* Second Edition. Elsevier, San Diego; 2004, pp. 739-868.
- De Vito JL, Smith AO.** Afferent projections to the hypothalamic area controlling emotional responses (HACER). *Brain Res.* 1982; 252:213-226.
- Dityatev A, Rusakov DA.** Molecular signs of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr Opin Neurobiol.* 2011; 21:353–359.
- Dodd J, Kelly JS, Said SI.** Excitation of CA1 neurons of the rat hippocampus by the octacosapeptide, vasoactive intestinal polypeptide (VIP), *Proceedings. Br J Pharmacol.* 1979; 66:125p.
- Dunn JD.** Plasma corticosterone response to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res.* 1987; 407:327-331.
- Edwards DH, Kravitz EA.** Serotonin, social status and aggression. *Curr Opin Neurobiol.* 1997; 7:812-819.
- Emsley JG, Macklis JD.** Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol.* 2006; 2:175–186.
- Emson PC, Hunt SP.** Anatomical chemistry of the cerebral cortex. In: *The organization of the cerebral cortex.* Ed. Schmitt FO, Worden FG, Adelman G, Dennis SG. MIT Press, Cambridge, Mass. 1981; pp. 325-346.
- Everitt B.** Limbic lobe and olfactory pathways. In: Berry MM, Bannister LH, Standring SM. (eds). *Gray's Anatomy.* London: Churchill Livingstone; 1995. pp. 1115-1141.

- Fahrbach SE, Morrel JI, Pfaff DW.** Estrogen concentrating neurons in the medial preoptic area send axons to the ventral tegmental area and amygdala. *Soc Neurosci Abstr.* 1983; 9:516.
- Fairén A, Valverde F.** A specialized type of neuron in the visual cortex of the cat: a Golgi and electron microscope study of chandelier cells. *J Comp Neurol.* 1980; 194:761-779.
- Feldman ML.** Aging changes in the morphology of cortical dendrites. In: *Neurobiology of aging.* Ed Terry RD and Gershon S. Raven Press, New York. 1976; pp 211-227.
- Feldman ML, Peters A.** The forms of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat. *J Comp Neurol.* 1978; 179:761-794.
- Fiala JC, Spacek J, Harris KM.** Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Rev.* 2002; 39:29–54.
- Flynn JP.** The neural basis of aggression in cats. In: *Neurophysiology and emotion.* Ed Glass DC. New York: Rockefeller University Press. 1967.
- Frederickson CJ, Rampy BA, Reamy-Rampy S, Howell GA.** Distribution of histochemically reactive zinc in the forebrain of the rat. *J Chem Neuroanat.* 1992; 5(6):521-530.
- Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB.** Importance of Zinc in the Central Nervous System: The Zinc-Containing Neuron. *J Nutr.* 2000; 130(5):1471s-1483s
- Freese JL, Amaral DG.** Neuroanatomy of the primate amygdala. In: Walen PJ, Phelps EA (eds). *The Human Amygdala.* New York: 2009, pp. 3-42.
- Friedland DR, Los JG, Ryugo DK.** A modified Golgi staining protocol for use in the human brain stem and cerebellum. *J Neurosci Methods.* 2006; 150:90–95.
- Fuchs AS, Siegel A.** neural pathway mediating hypothalamically elicited flight behavior in the cat. *Brain Res.* 1984; 306:263-281.
- Fudge JL, Emiliano AB.** The extended amygdala and the dopamine system: Another piece of the dopamine puzzle. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2003; 15:306-316.
- García-López P, García-Marín V, Freire M.** The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. *Prog Neurobiol.* 2007; 83:110–130.
- Garcia-Lopez P, Garcia-Marín V, Freire M.** Dendritic spines and development: towards a unifying model of spinogenesis – a present day review of Cajal's histological slides and drawings. *Neural Plast.* 2010. 769207.
- Garcia-Segura LM, McCarthy M.** Minireview: role of glia in neuroendocrine function. *Endocrinology.* 2004; 145(3):1082-1086.
- Gardner-Medwin, AR.** Possible roles of vertebrate neuroglia in potassium dynamics, spreading depression and migraine. *J Exp Biol.* 1981; 95:111-127.
- Garey LJ, Ong WY, Patel TS, et al.** Reduced dendritic spine density on cerebral cortical neurons in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014; 65:446–453.
- Garrett A, Chang K.** The role of the amygdala in bipolar disorder development. *Dev Psychopathol.* 2008; 20:1285–1296.
- Gibb R, Kolb B.** A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods.* 1998; 79:1-4.
- Glaser EM, Van der Loos H.** Analysis of thick Brian sections by observe-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. *J Neurosci Methods.* 1981; 4:117
- Gloor P.** *The Temporal Lobe and Limbic System.* Oxford University Press. New York; 1997.
- Gonzalez RC, Woods RE.** *Digital Image Processing.* Upper Saddle River: Prentice Hall, 2002. 976 p.
- Gonzalez-Ramirez MM, Velazquez-Zamora DA, Olvera-Cortes ME, et al.** Changes in the plastic properties of hippocampal dendritic spines underlie the attenuation of place learning in healthy aged rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2014; 109:94–103.

- Gulledge AT, Carnevale NT, Stuart GJ.** Electrical advantages of dendritic spines. *PLoS One*. 2012; 7:e36007.
- Halassa MM, Haydon PG.** Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72:335–355.
- Hamann SB, Ely TD, Grafton ST, Kilts CD.** Amygdala activity related to enhanced memory for pleasant and aversive stimuli. *Nature Neuroscience*. 1999; 2:289-93.
- Harnett MT, Makara JK, Spruston N, et al.** Synaptic amplification by dendritic spines enhances input cooperativity. *Nature*. 2012; 491:599–605.
- Hayman LA, et al.** KlüverBucy syndrome after bilateral selective damage of amygdala and its cortical connections. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1998; 10:354-358.
- Hermel EES, Faccioni-Heuser MC, Marcuzzo S, Rasia-Filho AA and Achaval M.** Ultrastructural features of neurons and synaptic contacts in the posterodorsal medial amygdala of adult male rats. *J Anat*. 2006; 208:565–575.
- Innis RB, Correa FMA, Uhl GR, Schneider B, Snyder S.** Cholecystokinin octapeptide-like immunoreactivity: Histochemical localization in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76:521-525.
- Ivenshitz M. and Segal M.** Neuronal density determines network connectivity and spontaneous activity in cultured hippocampus. *J Neurophysiol*. 2010; 104:1052-1060.
- Jacobs B, Schall M, Prather M, et al.** Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative Golgi study. *Cereb Cortex*. 2001; 11:558–571.
- Johnston JB.** Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J Comp Neurol*. 1923; 35:337–481.
- Jones EG, Powell TPS.** Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *J Cell Sci*. 1969; 5:509-529.
- Jones EG.** Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol*. 1975; 160:205-268.
- Jones EG, Peters A.** Cerebral cortex. Vol 1 Cellular components of the cerebral cortex. Plenum Press, New York. 1984; 565pp.
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H.** Structure stability function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*. 2003; 26:360-368.
- Khibnik LA, Beaumont M, Doyle M, Heshmati M, Slesinger PA, Nestler EJ, Russo SJ.** Stress and Cocaine Trigger Divergent and Cell Type–Specific Regulation of Synaptic Transmission at Single Spines in Nucleus Accumbens. *Biol Psychiatry*. 2015; 6:1-8.
- Kim BG, Dai HN, McAtee M, Vicini S, Bregman BS.** Labeling of dendritic spines with the carbocyanine dye Dil for confocal microscopic imaging in lightly fixed cortical slices. *J Neurosci Methods*. 2007; 162(1-2):237-43.
- Kuwajima M, Spacek J, Harris KM.** Beyond counts and shapes: studying pathology of dendritic spines in the context of the surrounding neuropil through serial section electron microscopy. *Neuroscience*. 2013; 251:75–89.
- Li XF, Hu MH, Hanley BP, Lin YS, Poston L, Lightman SL, O’Byrne KT.** The Posterodorsal Medial Amygdala Regulates the Timing of Puberty Onset in Female Rats. *Endocrinology*. 2015; 8:1-13.
- Lu D, He L, Xiang W, et al.** Somal and dendritic development of human CA3 pyramidal neurons from midgestation to middle childhood: a quantitative Golgi study. *Anat Rec*. 2013; 296:123–132.
- Lund JS.** Organization of neurons in the visual cortex, area 17, of the monkey (*Macaca mulatta*). *J Comp Neurol*. 1973; 147:455-496.
- Mai JK, Paxinos G, Voss T.** Atlas of the Human Brain. 3 Ed. Academic Press, New York; 2008.
- Mai JK, Majtanik M, Paxinos G.** Atlas of the Human Brain. 4 Ed. Elsevier, New York; 2015.

- Marcuzzo S, Dall'oglio A, Ribeiro MF, Achaval M, Rasia-Filho AA.** Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. *Neurosci Lett.* 2007; 424(1):16-21.
- Maren S.** Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci.* 1999; 22:561-567.
- Martinez FG, Hermel EE, Xavier LL, Viola GG, Riboldi J, Rasia-Filho AA, Achaval M.** Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats. *Brain Res.* 2006; 1108:117–126.
- Matus A.** Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science.* 2000; 290:754–758.
- Meredith, M.** Human vomeronasal organ function: a critical review of best and worst cases. *Chem Senses.* 2001; 26:433-445.
- Monti-Bloch L, Jennings-White C, Berliner DL.** The Human Vomeronasal System: A Review. *Annals of the New York Academy of Sciences,* 1998; 855:373-389.
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K.** Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol.* 2002; 64:313-353.
- O'Kusky J, Colonnier M.** A laminar analysis of the number of neurons, glia and synapses in the visual cortex (area 17) of adult macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 1982; 210:278-290.
- Peters A, Kaiserman-Abramof IR.** The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat.* 1970; 127:321-356.
- Peters A, Fairén A.** Smooth and sparsely spined stellate cells in the visual cortex of the rat: a study using a combined Golgi-electron microscope technique. *J Comp Neurol.* 1978; 181:129-172.
- Peters A, Proskauer CC.** Synaptic relationships between a multipolar stellate cell and a pyramidal neuron in rat visual cortex: A combined Golgi-electron microscope study. *J Neurocytol.* 1980; 181:129-172.
- Peters A, Kimerer LM.** Bipolar neurons in rat visual cortex: a combined Golgi electron microscope study. *J Neurocytol.* 1981; 10:921-946.
- Peters A, Miller M, Kimerer LM.** Cholecystokinin-like immunoreactive neurons in rat cerebral cortex. *Neuroscience.* 1983; 8:431-448.
- Phillis JN, Kirkpatrick JR, Said SI.** Vasoactive intestinal polypeptide excitation of central neurons. *Can J Physiol Pharmacol.* 1978; 57:337-340.
- Picker S, Goldring S.** Electrophysiological properties of human glia. *Trends Neurosci.* 1982; 5:73-76.
- Pitkänen A, Tuunanen J, Kälviäinen R, Partanen K, Salmenperä T.** Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 1998; 32:233–253.
- Pope A.** Neuroglia: Quantitative aspects. In: *Dynamic properties of glia cells.* Ed. Schoffeniels E, Frank G, Hertz L, Tower DB. Pergamon Press, Elmsford, NY. 1978; pp 13-20.
- Protopopescu X, Pan H, Tuescher O, Cloitre M, Goldstein M, Engelien W, Epstein J, Yang Y, Gorman J, LeDoux J, Silbersweig D, Stern E.** Differential time courses and specificity of amygdala activity in posttraumatic stress disorder subjects and normal control subjects. *Biol Psychiatry.* 2005; 57:464-473.
- Purpura D.** Dendritic spine “dysgenesis” and mental retardation. *Science.* 1974; 20:1126-1128.
- Ramón y Cajal S.** Studien über die Sehrinde der Katze. *J Psychol Neurol.* 1922; 29:161-181.
- Rasband WS.** ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2015.
- Rasia-Filho AA, Londero RG, Achaval M.** Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. *Brain Res Bull.* 1999; 48(2):173–183.
- Rasia-Filho AA, Hilbig A.** Papel da amígdala e do hipocampo no transtorno do estresse pós-traumático. In: *Caminha R. Transtornos do estresse pós-traumático.* São Paulo: Casa do Psicólogo; 2005. pp. 37-53.

- Rasia-Filho AA, Brusco J, Moreira JE.** Spine plasticity in the rat medial amygdala. In: Baylrod, M. Dendritic Spines: Biochemistry, Modeling and Properties. New York: Nova Science Publishers; 2009.
- Rasia-Filho AA et al.** O *continuum* subcortical-allocórtex-neocórtex de surgimento dos neurônios piramidais humanos: implicações filogenéticas, morfológicas, funcionais e patológicas. Prêmio Austregésilo. Academia Nacional de Medicina. Anais da ANM. 2016; 187(2):142.
- Revel JP, Karnovsky MJ.** Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol.* 1967; 33:C7.
- Ribak CE, Harris AB, Vaughn JE, Roberts E.** Inhibitory, GABAergic nerve terminals decrease at sites of focal epilepsy. *Science.* 1979; 205:211-213.
- Rosoklija G, Mancevski B, Ilievski B, Perera T, Lisanby SH, Coplan JD, Duma A, Serafimova T, Dwork AJ.** Optimization of Golgi methods for impregnation of brain tissue from humans and monkeys. *J Neurosci Methods.* 2003; 131:1–7.
- Sah P, Faber SL, de Armentia ML, Power J.** The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *Physiol Rev.* 2003; 83:803–834.
- Sattar HA.** Growth adaptations, cellular injury, and cell death. In: Sattar HA. Fundamentals of pathology. First Edition, Pathoma, Chicago: 2011, pp. 1-10.
- Schumann CM, Amaral DG.** Stereological analysis of amygdala neuron number in autism. *J Neurosci.* 2006; 26:7674-7679.
- Serra J.** Image Analysis and Mathematical Morphology. San Diego: Academic Press, 1982: 610 p.
- Segal M.** Dendritic spines and long-term plasticity. *Nature Rev. Neurosci.* 2005; 6:277-284.
- Segal M.** Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. *Eur J Neurosci.* 2010; 31:2178-2184.
- Shepherd GM.** The dendritic spine: a multifunctional integrative unit. *J. Neurophysiol.* 1996; 75:2197-2210.
- Sholl, DA.** The organization of the cerebral cortex. Meuthen. London.1956.
- Sims KS, Williams RS.** The human amygdaloid complex: a cytologic and histochemical atlas using Nissl, myelin, acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase staining. *Neuroscience.* 1990; 2:449-472.
- Sloper JJ, Powell TPS.** Observations in the axon initial segment and other structures in the neocortex using conventional staining and ethanolic phosphotungstic acid. *Brain Res.* 1976; 50:163-169.
- Sloper JJ, Powell TPS.** A study of the initial segment and proximal axon of neurons in the primate motor and somatic sensory cortex. *Philos Trans R Soc London.* 1979; 285:173-197.
- Sofroniew MV, Vinters HV.** Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119:7–35.
- Somogyi P.** A specific axo-axonal neuron in the visual cortex of the rat. *Brain Res.* 1977; 136:345-350.
- Somogyi P, Freund TF, Wu JY, Smith AD.** The section Golgi impregnation procedure. II. Immunocytochemical demonstration of glutamate decarboxylase in Golgi-impregnated neurons and in their afferent synaptic boutons in the visual cortex of the cat. *Neuroscience.* 1983; 9:475-490.
- Sorvari H, Soininen H, Paljärvi L, Karkola K, Pitkänen A.** Distribution of parvalbumin-immunoreactive cells and fibers in the human amygdaloid complex. *J Comp Neurol.* 1995; 360:185-212.
- Sorvari H, Soininen H, Pitkänen A.** Calretinin-immunoreactive cells and fibers in the human amygdaloid complex. *J Comp Neurol.* 1996; 369:188-208.
- Spiga S, Acquas E, Puddu MC, Mulas G, Lintas A, Diana M.** Simultaneous Golgi-Cox and immunofluorescence using confocal microscopy. *Brain Struct Funct.* 2011; 216:171-182.
- Staut CCV, Naidich TP.** Urbach-Wiethe Disease (Lipoid Proteinosis). *Pediatric Neurosurgery.* 1998; 28(4):212–214.

**Stewart MG, Popov VI, Kraev IV, Medvedev N, Davies HA.** Structure and complexity of the synapse and dendritic spine. In: Pickel V, Segal M, editors. *The Synapse*. Kidlington: Academic Press. 2014; p 1–20.

**Swanson LW, Petrovich GD.** What is the amygdala? *Trends Neurosci.* 1998; 21(8):323-31.

**Takato M, Goldring S.** Intracellular marking with Lucifer yellow CH and horseradish peroxidase of cells electrophysiologically characterized as glia in the cerebral cortex of the cat. *J Comp Neurol.* 1979; 186:173-188.

**Tao-Cheng J-H, Dosemeci A, Gallant PE, Miller S, Galbraith JA et al.** Rapid turnover of spinules at synaptic terminals. *Neuroscience.* 2009; 160:42–50.

**Tarrant SB, Routtenberg A.** The synaptic spinule in the dendritic spine: electron microscopic study of the hippocampal dentate gyrus. *Tissue Cell.* 1977; 9:461–473.

**Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D.** LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature.* 1999; 402:421-425.

**Tonnesen J, Katona G, Rózsa B, Nägerl UV.** Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nat Neurosci.* 2014; 17:678-685.

**Torres-Fernández O.** La técnica de impregnación argéntica de Golgi. Conmemoración del centenario del premio nobel de Medicina (1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal. *Biomédica.* 2006; 26:498-508.

**Ulfig N, Setzer M, Bohl J.** Ontogeny of the human amygdala. *Ann NY Acad Sci.* 2003; 985:22-33.

**Valverde F.** Intrinsic organization of the amygdaloid complex. A Golgi study in the mouse. *Trab Inst Cajal Invest Biol.* 1962; 54:291–314.

**Valverde F.** Apical dendritic spines of the visual cortex and light deprivation in the mouse. *Exp Brain Res.* 1967; 3:337-352.

**Valverde F.** Short axon neuronal subsystems in the visual cortex of the monkey. *Int J Neurosci.* 1971; 1:181-197.

**Valverde F.** The organization of area 18 in the monkey. *Anat Embryol.* 1978; 154:305-334.

**van der Zee EA.** Synapses, spines and kinases in mammalian learning and memory, and the impact of aging. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015; 50:77–85.

**Varon SS, Somjen GG.** Neuron-glia interactions. *Neurosci Res Progr Bull.* 1979; 17(1):9-239.

**Vaughan DW, Peters A.** Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: An electron microscope study. *J Neurocytol.* 1974; 3:405-429.

**Vaughan DW.** Age-related deterioration of pyramidal cell basal dendrites in rat auditory cortex. *J Comp Neurol.* 1977; 171:501-516

**Vaughan DW.** The structure of neuroglial cells. In: Jones EG, Peters A. *Cerebral cortex*. Chapter 10; Vol 2 Functional properties of cortical cells. Plenum Press, New York; 1984, 340pp.

**Wearne SL, Rodriguez A, Ehlenberger DB, Rocher AB, Henderson SC, Hof PR.** New techniques for imaging, digitization and analysis of three-dimensional neural morphology on multiple scales. *Neuroscience.* 2005; 136:661-680.

**Woolley CS, McEwen BS.** Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neurol.* 1993; 336(2):293-306.

**Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC, Da Cunha C, Deonizio JM, Netto CA, Achaval M.** A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Protoc.* 2005; 16:58–64.

**Yilmazer-Hanke DM.** Amygdala. In: Paxinos G, Mai J. (eds). *The Human Nervous System*. Third Edition. Elsevier, San Diego. 2012; pp. 759-834.

**Yuste R.** Electrical compartmentalization in dendritic spines. *Annu Rev Neurosci.* 2013; 36:429–449.

**Zancan M, Dall'Oglio A, Sarzenski TM, Maher MI, Segura LMG, Rasia-Filho AA.** Glial and axonal perikaryal coverage and somatic spines in the posterodorsal medial amygdala of male and cycling female rats. *J Comp Neurol.* 2015; 523:2127–2137.

**Zirlinger M, Anderson D.** Molecular dissection of the amygdala and its relevance to autism. *Genes Brain Behav.* 2003; 2:282-294.