

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE – UFCSPA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Josué Renner

**Aprendizado de máquina e “software”  
*open-source* na elaboração de  
reconstruções tridimensionais para o  
estudo de neurônios humanos e seus  
espinhos dendríticos**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

Porto Alegre  
2022

Josué Renner

**Aprendizado de máquina e “software”  
*open-source* na elaboração de  
reconstruções tridimensionais para o  
estudo de neurônios humanos e seus  
espinhos dendríticos**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Biociências da  
Fundação Universidade Federal de  
Ciências da Saúde de Porto Alegre  
como requisito parcial para a obtenção  
do grau de Mestre

Orientador: Dr. Alberto A. Rasia Filho

**Porto Alegre  
2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Catálogo na Publicação

Renner, Josué

Aprendizado de máquina e "software" open-source na elaboração de reconstruções tridimensionais para o estudo de neurônios humanos e seus espinhos dendríticos / Josué Renner. -- 2022.

152 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2022.

Orientador(a): Alberto A. Rasia Filho.

1. espinhos dendríticos. 2. neurônios de von Economo. 3. complexo amigdalóide humano. 4. técnica de Golgi. 5. reconstruções tridimensionais (3D) de imagem. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

O presente estudo foi realizado com recursos do Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). O estudo também contou com suporte para pagamento integral de taxa para publicação de artigo científico proveniente da Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, da Alemanha.

## DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho ao meu pai Ari (*in memoriam*) e à minha mãe Jacinta.

Dedico a todos que quiseram estudar, mas não tiveram oportunidades.

## AGRADECIMENTOS

Fazer este mestrado durante uma pandemia foi difícil. Além de todos os desafios acadêmicos, foi preciso se acostumar com uma nova realidade. Apesar disso tudo, consegui terminar mais essa etapa da minha formação como cientista e como cidadão. Para chegar até aqui, tive o apoio de muitas pessoas queridas. Quero deixar meus agradecimentos a elas.

Ao meu orientador, professor Dr. Alberto Rasia Filho, por todo o apoio, orientação, conhecimentos compartilhados e confiança ao longo dos últimos anos. Muito obrigado por toda a fraternidade e compreensão nos momentos mais difíceis desta minha etapa de formação. Agradeço muito a oportunidade de trabalhar estudando o cérebro humano sob a sua orientação, o que tem me ensinado muitas coisas sobre a vida e sobre como fazer Ciência do mais alto nível de qualidade. Tenho muita sorte de ter tido um orientador atencioso e presente. Muito obrigado, professor!

Ao Francisco, Nivaldo e Carlos que, graças às suas pesquisas, possibilitaram que eu tivesse muitas imagens microscópicas com as quais pude trabalhar. Também deixo meus agradecimentos à Kétlyn, por todas as conversas sobre as reconstruções 3D que resultaram em melhorias metodológicas nos trabalhos do nosso grupo de pesquisa.

Gostaria de agradecer meus amigos e amigas de Novo Hamburgo e Porto Alegre (e também os que não moram nessas cidades, mas que continuaram por perto) por proporcionarem momentos felizes em meio ao caos que foram os últimos anos. Lembrarei disso sempre.

À Mari que, desde a minha graduação, tem me mostrado as partes mais bonitas da vida e que tem me acompanhado sempre. Obrigado por todo o carinho, conversas, tempo, risadas, atenção, planos de vida, por estar ao meu lado e por sempre me escutar. Obrigado por todos esses momentos e por ser quem você é.

À minha família. Ao meu irmão Ari e minha cunhada Nayara por sempre estarem por perto. À minha mãe Jacinta por sempre me proporcionar motivação, carinho e condições para poder continuar estudando.

Ao meu pai Ari Renner (*in memoriam*) que viu o início dessa jornada, mas que, por muito pouco, não vai ver o final dela. Isso é absurdamente injusto. Prometo que tentarei tornar o mundo um lugar mais agradável e com menos injustiças como as que a vida te impôs.

À UFCSPA, por ter sido uma instituição que me proporcionou uma formação acadêmica de excelência que não seria possível sem o ensino público e de qualidade.

Ao PPG-Biociências, por proporcionar o espaço e oportunidade para o desenvolvimento das pesquisas.

**Muito obrigado!**

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>3D</b>	Tridimensional
<b>ACC</b>	Córtex cingulado anterior
<b>DMN</b>	<i>Default Mode Network</i>
<b>DRD3</b>	Receptor D3 para dopamina
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico-sintase endotelial
<b>FI</b>	Córtex fronto-insular
<b>fMRI</b>	Imagem por ressonância magnética funcional
<b>GABRQ</b>	Subunidade teta do receptor do ácido gama-aminobutírico
<b>IA</b>	Inteligência artificial
<b>MAP2</b>	Proteína associada a microtúbulo tipo 2
<b>NADPH-d</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase
<b>NeuN</b>	Proteína nuclear específica neuronal
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico-sintase neuronal
<b>PC</b>	Pré-cúneo
<b>PMC</b>	Córtex posteromedial
<b>SBF-SEM</b>	Microscopia eletrônica de varredura de bloco em série
<b>scRNA-seq</b>	Sequenciamento de RNA de célula única
<b>TEM</b>	Microscopia eletrônica de transmissão
<b>VENs</b>	Neurônios de von Economo

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Forma e classificação dos espinhos dendríticos.

**Figura 2.** Exemplos de segmentação de imagem microscópica.

**Figura 3.** Fluxo de trabalho para a segmentação de imagens utilizando aprendizado de máquina a partir de imagens microscópicas de neurônio cortical humano impregnado pela técnica de Golgi.

**Figura 4.** Fotomicrografias do corpo celular e dos dendritos proximais de neurônio piramidal e de neurônio de von Economo corticais humanos impregnados pela técnica de Golgi.

## RESUMO

A descrição da estrutura tridimensional (3D) do corpo neuronal, da ramificação dendrítica e dos espinhos dendríticos dos neurônios é essencial para a compreensão de como ocorre o processamento de informações no sistema nervoso ao longo da filogenia, mormente à complexidade que existe no ser humano. Frequentemente, esses componentes da estrutura neuronal apresentam conformações espaciais múltiplas, tornando necessária a elaboração de reconstruções 3D digitais para estudos morfológicos mais detalhados e precisos. A elaboração dessas reconstruções é, no entanto, desafiadora devido às questões relacionadas com a disponibilidade de “software” e com a complexidade do tecido nervoso e dificuldades técnicas inerentes ao processamento histológico de amostras *postmortem* humanas. A presente dissertação de mestrado teve como objetivo aplicar e desenvolver procedimentos de reconstrução 3D a fim de estudar a forma de neurônios humanos e seus espinhos dendríticos impregnados pela técnica de Golgi sob microscopia óptica de campo claro. A partir de imagens de microscopia de luz capturadas sequencialmente ao longo do eixo espacial ‘z’, o “software” *open-source* Neuromantic foi utilizado para a elaboração de reconstruções 3D e obtenção de dados morfométricos dos corpos celulares e ramificações dendríticas dos neurônios de von Economo presentes no córtex cingulado anterior e de neurônios com corpo celular fusiforme no pré-cúneo humanos. Para o estudo da presença, distribuição, número e diferentes formas dos espinhos dendríticos desses neurônios, reconstruções 3D foram feitas com algoritmo computacional na plataforma comercial MATLAB® com imagens microscópicas de maior aumento. De modo a evitar o uso adicional de “software” comercial, por causa de altos custos impeditivos e menor acesso a todos os pesquisadores, o presente trabalho também objetivou desenvolver um método adicional, simples, acessível e confiável para a reconstrução 3D de espinhos dendríticos com “software” gratuito. Para isso, utilizou-se o “software” *open-source* ilastik, que emprega algoritmos de aprendizado supervisionado de máquina para a segmentação de imagens. Esse novo método foi aplicado para a composição de reconstruções 3D dos espinhos dendríticos de neurônios do núcleo cortical do complexo amigdalóide humano, mas pode ser utilizado *a priori* em diversas outras

áreas nervosas igualmente. As ferramentas computacionais que permitiram a elaboração das reconstruções 3D geraram dados morfológicos imprescindíveis sobre a forma do soma, orientação espacial dos ramos dendríticos nos três eixos espaciais e da presença, distribuição, número e forma diversa dos espinhos dendríticos dos neurônios estudados. Neurônios corticais e subcorticais humanos (e de outros animais) podem ser reconstruídos para estudos ontogenéticos, filogenéticos e hodológicos em cada área de interesse e/ou tipo neuronal relevante bem como para a investigação de alterações morfológicas de estruturas neuronais em doenças neurológicas e psiquiátricas. Por utilizar “software” que estão gratuitamente disponíveis para *download* e uso, o presente trabalho disponibiliza como realizar tais estudos e viabiliza o desenvolvimento de pesquisas nas quais as reconstruções 3D neuronais tornam-se acessíveis, mesmo com poucos recursos disponíveis, com qualidade, relevância internacional e atualidade dos dados obtidos, contribuindo para o conhecimento humano na área da Morfologia e das Neurociências.

**Palavras-chave:** neurônios corticais humanos, neurônios de von Economo, complexo amigdalóide humano, técnica de Golgi, reconstruções tridimensionais (3D) de imagem, aprendizado de máquina, espinhos dendríticos.

## ABSTRACT

The description of the three-dimensional (3D) structure of the neuronal body, the dendritic branching and the dendritic spines of neurons is essential for understanding how information processing occurs in the nervous system throughout the phylogeny, especially given the complexity that exists in humans. These components of the neuronal structure often have multiple spatial conformations, making it necessary to elaborate 3D digital reconstructions for more detailed and accurate morphological studies. However, the elaboration of these reconstructions is challenging due to issues related to the availability of software and the complexity of nervous tissue and technical difficulties inherent to the histological processing of human postmortem samples. The present master's dissertation aimed to develop and apply 3D reconstruction procedures in order to study the shape of human neurons and their dendritic spines impregnated by the Golgi technique and seen with bright-field optical microscopy. From light microscopy images captured sequentially along the 'z' spatial axis, the open-source software Neuromantic was used to perform 3D reconstructions and to obtain morphometric data of cell bodies and dendritic ramifications of von Economo neurons and spindle-shaped neurons present, respectively, in the anterior cingulate cortex and in the human precuneus. To study the presence, distribution, number, and different shapes of the dendritic spines of these neurons, 3D reconstructions were performed with a computational algorithm on the commercial MATLAB® platform. In order to avoid the additional use of commercial software, due to high costs and less accessibility to all researchers, the present work also aimed to develop an additional, simple, accessible and reliable method for the 3D reconstruction of dendritic spines with free software. For this, the open-source ilastik software, which employs supervised machine learning algorithms for image segmentation, was used. This new method was applied to the composition of 3D reconstructions of the dendritic spines of neurons located in the cortical nucleus of the human amygdaloid complex, but it can be used *a priori* in several other brain areas as well. The computational tools that allowed the elaboration of the 3D reconstructions generated essential morphological data about the shape of the soma, the spatial orientation of the dendritic branches in the three spatial axes and the presence, distribution, number and diversity of

shapes of the dendritic spines of the neurons studied. Human (and other animal) cortical and subcortical neurons can be reconstructed for ontogenetic, phylogenetic and hodological studies in each area of interest and/or relevant neuronal type as well as for the investigation of morphological alterations of neuronal structures in neurological and psychiatric diseases. By using software that is freely available for download and use, the present work provides information about how to carry out such studies and enables the development of research in which 3D reconstructions become accessible. Even with few available resources, high-quality studies with international relevance that contributed to Morphology and Neurosciences were possible.

**Keywords:** human cortical neurons, von Economo neurons, human amygdaloid complex, Golgi technique, three-dimensional (3D) image reconstructions, machine learning, dendritic spines.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	16
1.1 Reconstruções tridimensionais digitais como meio de estudo da forma e função de neurônios	16
1.2 O uso do aprendizado de máquina como meio para a reconstrução tridimensional de espinhos dendríticos de neurônios humanos impregnados pela técnica de Golgi	22
1.3 Neurônios de von Economo (VENs)	31
<b>2. OBJETIVOS</b>	38
2.1 Objetivos gerais	38
2.2 Objetivos específicos	38
<b>3. ARTIGOS CIENTÍFICOS</b>	40
Artigo 1 – <i>Dendritic and Spine Heterogeneity of von Economo Neurons in the Human Cingulate Cortex</i>	41
Artigo 2 – <i>Spindle-Shaped Neurons in the Human Posteromedial (Precuneus) Cortex</i>	59
Artigo 3 – <i>Human cortical amygdala dendrites and spines morphology under open-source 3D reconstruction procedures</i>	87
<b>4. DISCUSSÃO</b>	90
<b>5. CONCLUSÕES</b>	106
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	107
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERENTES À INTRODUÇÃO E À DISCUSSÃO</b>	108
<b>8. ANEXOS</b>	129
Anexo I: Parecer de aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) da UFCSPA. Projeto aprovado com o número de parecer 3.285.063.	129

Anexo II: Parecer de aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) da UFCSPA. Emenda aprovada com o número de parecer 4.787.433.	134
Anexo III: Parecer de aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como instituição coparticipante. Aprovado com o número de parecer 5.036.809.	141
Anexo IV: Capítulo publicado no livro <i>Advances in Medicine and Biology</i>	146
<b>9. CURRÍCULO LATTES</b>	<b>148</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Reconstruções tridimensionais digitais como meio de estudo da forma e função de neurônios

As contribuições feitas por Camillo Golgi (1843–1926) para o estudo do sistema nervoso central são um dos pilares da Neurociência moderna (Bentivoglio et al., 2019). O método de impregnação pela prata de células nervosas desenvolvido por ele permitiu que fossem elaborados, a partir de uma preparação histológica relativamente simples, os primeiros estudos sobre a forma dos neurônios e de células da glia (Golgi, 1873; DeFelipe, 2002, 2015). No processo de impregnação, o tecido encefálico é colocado em soluções de dicromato de potássio e nitrato de prata, que reagem e formam o cromato de prata (Walker; Herskowitz, 2021). Os grânulos de cromato de prata se acumulam e gradualmente cobrem a superfície interna e o citoplasma das células nervosas (Fairén, 2005) permitindo a visualização das estruturas neuronais (principalmente corpo celular e a arborização dendrítica) com grande contraste em relação ao “fundo” histológico (“*background*”; Das; Reuhl; Zhou, 2013; Mancuso et al., 2013). Com a técnica, o próprio Camillo Golgi descreveu a forma de neurônios do bulbo olfatório e diferentes tipos de neurônios do córtex cerebral humano (Golgi, 1873, 1875, 1882–1883, 1901). Essa mesma técnica também possibilitou que mais pesquisadores estudassem o sistema nervoso central. Ramón y Cajal (1852–1934) adotou a técnica de Golgi e produziu uma quantidade de descrições e ilustrações de estruturas neuronais (Ramón y Cajal, 1909–1911) que até hoje impressionam pela quantidade de detalhes (Parekh; Ascoli, 2013). Desde os trabalhos desses dois autores, a microscopia de luz aliada à técnica de Golgi tem sido uma ferramenta amplamente utilizada para o estudo de formas celulares e da citoarquitetura de muitas regiões encefálicas (Wilt et al., 2009; Magliaro et al., 2019). E, embora tenha sido criada no século XIX, a técnica de Golgi continua sendo essencial para a visualização e caracterização da arquitetura neuronal (Milatovic et al., 2010; Rasia-Filho, 2022).

Desde as primeiras descrições feitas por Golgi e Cajal, dados morfométricos (como tamanho do corpo celular, número, comprimento e volume de dendritos) de neurônios têm contribuído para a compreensão do sistema nervoso central (Jungblut et al., 2012; Ferreira et al., 2014; Arshadi et al., 2021). No entanto, por mais completas que sejam as descrições feitas a partir da visualização microscópica, são necessários recursos adicionais para a descrição da forma plena e de dados morfométricos das três dimensões espaciais de neurônios. Isso porque as células neuronais frequentemente apresentam estruturas com formas tridimensionais (3D) complexas (Wang et al., 2019) e, na microscopia convencional, apenas duas dimensões espaciais são levadas em consideração (Luengo-Sanchez et al., 2018). Uma das maneiras de caracterizar a forma neuronal nas três dimensões espaciais é por meio da elaboração de reconstruções 3D digitais (Arshadi et al., 2021; Conte et al., 2021).

O conhecimento acerca da forma 3D de um neurônio é essencial para determinar seu fenótipo, conectividade, integração sináptica e seu papel em um circuito neuronal (Sholl, 1956; Spruston, 2008; Meijering, 2010; Peng et al., 2015; Wang et al., 2017; Abdellah, 2018; Yuan et al., 2019; Huang et al., 2020; Chen et al., 2021). Ao descreverem o formato e a localização de estruturas neuronais, como dendritos e axônios, as reconstruções 3D fornecem uma poderosa ferramenta para a investigação da forma e função dos neurônios (Donohue; Ascoli, 2011) uma vez que permitem a obtenção da estrutura celular plena (Scorcioni; Polavaram; Acoli, 2008; Correa-Júnior et al., 2020; Fuentealba-Villarreal et al., 2022). Esses dados se tornam especialmente úteis quando se considera que a geometria 3D de estruturas como os dendritos se relaciona diretamente com as propriedades biofísicas do neurônio, com o quanto de membrana celular está disponível para contatos sinápticos e como é feita a integração de *inputs* sinápticos excitatórios e inibitórios para o estabelecimento de domínios espaço-temporais para a integração sináptica em cada neurônio (Spruston, 2008; Yuste, 2010; Rochefort; Konnerth, 2012; Spruston et al., 2013; Hayashi-Takagi et al., 2015; Rollenhagen; Lübke, 2016; Tønnesen; Nägerl, 2016; Nakahata; Yasuda, 2018; Correa-Júnior et al., 2020). As reconstruções ainda possibilitam a elaboração de modelos eletrofisiológicos em ambientes virtuais por simulações de funcionamento (Ascoli; Donohue; Halavi,

2007; Gouwens et al., 2018; Chen et al., 2022). Os modelos computacionais permitem inferir princípios-chave do funcionamento das estruturas neuronais. Em relação aos dendritos, tais modelos possibilitam a manipulação rápida, sistemática e repetidas de propriedades que seriam inviáveis de serem manipuladas em tecido vivo ou *in vitro*, como alterações na forma e número das ramificações dendríticas ou modificações na distribuição de canais iônicos em compartimentos e em momentos específicos (veja-se Poirazi; Papoutsi, 2020 para uma revisão sobre o tema). Portanto, as reconstruções 3D se tornaram ferramentas indispensáveis para explorar a função neuronal (Svoboda, 2011; Yang et al., 2021).

A elaboração de reconstruções 3D pode ser feita por meio da utilização de diferentes tipos de microscópios associados a variadas técnicas histológicas para visualização de tecido encefálico. Além de trabalhos que utilizaram a já citada técnica de Golgi associada à microscopia de luz (Petanjek et al., 2008; Bicanic; Hladnik; Petanjek, 2017; Bentivoglio et al., 2019; Correa-Júnior et al., 2020; Fuentealba-Villaruel et al., 2022), também é possível obter reconstruções 3D com técnicas histológicas aliadas à microscopia confocal (Ruszczycski et al., 2019; Callara et al., 2020; Yang et al., 2021), microscopia eletrônica (Chklovskii; Vitaladevuni; Scheffer, 2010; Bosch et al., 2015; Lee, K. et al., 2019; Urakubo et al., 2019), microscopia de dois fótons (Blackman et al., 2014; Urban et al., 2018) ou outras possibilidades (Meijering (2010); Donohue; Ascoli (2011), Halavi et al. (2012); Parekh; Ascoli (2013) e Acciai; Soda; Iannello (2016) para revisões de literatura sobre o tema).

Muitos métodos computacionais para a obtenção das reconstruções 3D a partir de imagens 2D sequenciais de microscopia foram propostos (Myatt et al. 2012; Zhou et al., 2016; Yang et al., 2021). A ideia básica é coletar as imagens microscópicas de modo sequencial ao longo do eixo espacial 'z' a fim de que seja obtido um conjunto de imagens de toda a forma neuronal. Depois da coleta das imagens sequenciais, o objetivo é "traçar", por uma *interface* computacional, todas as estruturas neuronais observadas em cada um dos planos focais bidimensionais e, ao final, somar todos os traçados para que se obtenha um retrato 3D das estruturas neuronais (Halavi et al. 2012; Zhou et al., 2016). A aquisição de uma série de imagens (comumente chamada de *image stack*) adquiridas em intervalos

de profundidade repetidamente espaçados proporciona um alto grau de precisão de análise dos elementos celulares observados por microscopia (Taylor; Levenson, 2006; Gautier; Ginsberg, 2021). Isso é particularmente importante para a elaboração de reconstruções 3D de neurônios.

Nos últimos anos, foram desenvolvidos “software” que oferecem uma *interface* para a reconstrução 3D de neurônios a partir de imagens microscópicas obtidas sequencialmente. Entre os “software” comerciais mais populares estão o Neurolucida (Glaser; Glaser, 1990), Imaris (<https://imaris.oxinst.com/>), Neuron 3DMA (Koh et al., 2002) e Amira (<https://www.thermofisher.com/br/en/home/electron-microscopy/products/software-em-3d-vis/amira-software/neuroscience.html>). Embora esses “software” tenham ferramentas úteis que diminuem o tempo despendido pelos pesquisadores, eles apresentam um preço muito elevado para serem adquiridos e mantidos. A opção para contornar esse problema é utilizar “software” gratuitos e/ou *open-source*. Dentre esses, os mais utilizados são o Farsight (Wang et al., 2011), Trees Toolbox (Cuntz et al., 2011), Vaa3D (Peng et al., 2010), Simple Neurite Tracer (Longair; Baker; Armstrong, 2011), neoTube (Feng; Zhao; Kim, 2015), Neural Circuit Tracer (Gala et al., 2014) e o Neuromantic (Myatt et al. 2012).

As reconstruções 3D de neurônios vistos em microscopia de luz são usualmente armazenadas em um tipo de arquivo computacional .swc (Stockley et al., 1993; Cannon et al., 1998; Ascoli et al., 2001; Parekh; Ascoli, 2013; Feng; Zhao; Kim, 2015; O'Halloran, 2020). Nesse tipo de arquivo, são armazenados e representados dados sobre as estruturas neuronais em um formato que é compacto, sendo qualitativamente e quantitativamente preciso e de fácil leitura. Esse tipo de reconstrução 3D se pauta em descrever os componentes celulares neuronais (corpo celular, ramificação dendrítica e axônios) como sendo uma série de cilindros interligados, sendo que cada um dos cilindros possui coordenadas espaciais 'x', 'y' e 'z'. Assim, a reconstrução 3D dos elementos celulares armazena dados morfométricos como comprimento, área, diâmetro e volume de cada estrutura neuronal. As reconstruções 3D dos neurônios no formato .swc atualmente são compartilhadas por um grande número de grupos de pesquisa em um repositório internacional chamado NeuroMorpho (hospedado no seguinte endereço

eletrônico: <https://neuroMorpho.Org>). O NeuroMorpho fornece uma cobertura extensa de reconstruções 3D descritas em publicações revisadas por pares (Ascoli; Donohue; Halavi, 2007; Donohue; Ascoli, 2011; Halavi et al., 2012; Nanda et al., 2015). Atualmente, o NeuroMorpho conta com mais de 180.000 reconstruções 3D de neurônios de várias espécies animais. Três reconstruções 3D que constituem um dos artigos científicos da presente dissertação de mestrado estão disponíveis no NeuroMorpho. Elas podem ser vistas acessando os seguintes *links*: [https://neuromorpho.org/neuron\\_info.jsp?neuron\\_name=VEN1Figure4](https://neuromorpho.org/neuron_info.jsp?neuron_name=VEN1Figure4), [https://neuromorpho.org/neuron\\_info.jsp?neuron\\_name=VEN2Figure5](https://neuromorpho.org/neuron_info.jsp?neuron_name=VEN2Figure5) e [https://neuromorpho.org/neuron\\_info.jsp?neuron\\_name=VEN3Figure6](https://neuromorpho.org/neuron_info.jsp?neuron_name=VEN3Figure6).

Além das estruturas neuronais como os dendritos e axônios, o estudo da geometria 3D dos espinhos dendríticos também é essencial para a compreensão do sistema nervoso central. Os espinhos dendríticos (ou espinhos, para maior simplicidade) foram descritos pela primeira vez por Santiago Ramón y Cajal enquanto ele observava os dendritos de neurônios de Purkinje do cerebelo de ave (Ramón y Cajal, 1888; também veja García-López; García-Marín; Freire (2007) e Yuste (2015) para uma discussão mais aprofundada sobre os achados de Cajal). Enquanto os dendritos são o *locus* primário da conectividade pós-sináptica e podem compor até 90% da superfície pós-sináptica de alguns neurônios (Eberwine et al., 2001), os espinhos, por sua vez, são pequenas protusões que emergem dos dendritos de muitos tipos de neurônios (Rocheffort e Konnerth, 2012; Qiao et al., 2016; Cornejo; Ofer; Yuste, 2022). Eles são os subcompartimentos pós-sinápticos mais importantes de neurônios excitatórios glutamatérgicos do encéfalo, sendo fundamentais para a transmissão sináptica, para a plasticidade neuronal (Helm et al., 2021; Kasai, et al., 2021) e para os processos de aprendizado, memória e cognição (Yuste, 2010, 2015; Ofer et al., 2022). Os espinhos podem formar uma ou várias sinapses (Brusco et al., 2014; Dall'Oglio et al., 2015; Rasia-Filho, 2022) e, dependendo do tipo de *input* sináptico recebido, sofrem alterações na sua forma, volume, tamanho e quantidade ao longo do tempo (Suratkal; Yen; Nishiyama, 2021). Ou seja, os espinhos são estruturas altamente plásticas que podem ser constantemente alteradas frente à atividade neuronal (Pchitskaya e Bezprozvanny, 2020; Kasai, et al., 2021), o que faz com que o entendimento sobre suas formas,

tamanhos e quantidade seja profundamente significativo para o conhecimento das funções nervosas (Obashi; Taraska; Okabe, 2021; Ofer et al., 2022;). Os espinhos e suas reconstruções 3D serão abordados com maiores detalhes no próximo tópico desta dissertação.

O primeiro objetivo da presente dissertação de mestrado foi integrar a observação microscópica a partir da técnica de Golgi às reconstruções 3D a fim de descrever a forma plena dos neurônios de von Economo (VENs) do córtex cingulado anterior (ACC) e dos *spindle-shaped neurons* (sugestivos de VENs) do pré-cúneo (PC) humano de pessoas adultas, sem quadros demenciais, falecidas sem doenças neurológicas ou psiquiátricas. Utilizando-se o “software” *open-source* Neuromantic, foi feita a descrição morfológica do corpo neuronal e da ramificação dos dendritos proximais até os dendritos mais distais, assim como dos ramos dendríticos colaterais. As reconstruções 3D também permitiram a obtenção de dados morfométricos do corpo celular e de toda a extensão da ramificação dendrítica dessas células. A presença, distribuição, número e diferentes formas dos espinhos dendríticos ao longo da superfície desses neurônios foram descritas por meio de reconstruções 3D com imagens microscópicas de maior aumento. Essas reconstruções 3D dos espinhos dendríticos foram feitas com algoritmo para segmentação de imagens dentro da plataforma MATLAB.

Os resultados dessas investigações, descritos em Correa-Júnior et al. (2020) e Fuentealba-Villarroel et al. (2022), já foram publicados e compõem parte da presente dissertação (seção “3. Artigos Científicos”). Até o mês de junho do ano de 2022, a publicação de Correa-Júnior et al. (2020) possuía sete citações (de acordo com o *Google Scholar*) e mais de 14.980 visualizações (o que faz com que essa publicação tenha sido mais visualizada do que 95% de todos os artigos publicados pelo grupo *Frontiers*). Adicionalmente, essa publicação compõe um *Research Topic* intitulado *Latest Advances on Excitatory Synapse Biology* (Huber; Paoletti; Sjöström, 2021) que foi elaborado em conjunto pelas revistas científicas *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *Frontiers in Cellular Neuroscience* e *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Atualmente, esse *Research Topic* possui mais de 143.000 visualizações. A publicação de Fuentealba-Villarroel et al. (2022), mais recente, possuía 2 citações (também de acordo com o *Google Scholar*) e mais de 6.585

visualizações (mais visualizada do que 82% de todos os artigos publicados pelo grupo *Frontiers*).

## **1.2 O uso do aprendizado de máquina como meio para a reconstrução tridimensional de espinhos dendríticos de neurônios humanos impregnados pela técnica de Golgi**

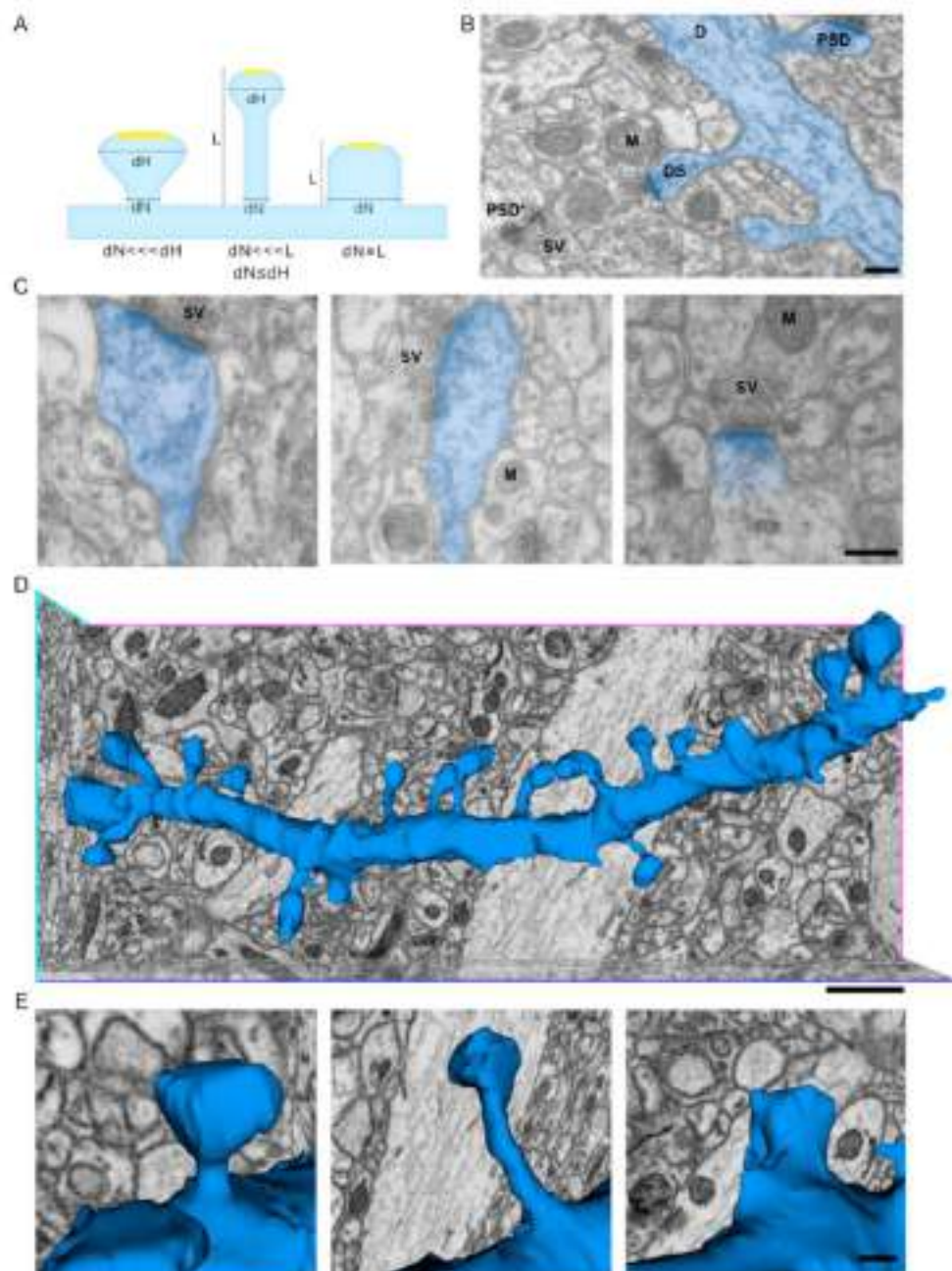
Tipicamente, os espinhos dendríticos são formados por uma “cabeça” esférica que se conecta ao dendrito por um “pescoço” (Figura 1; Parajuli; Koike, 2021). Tanto o tamanho da cabeça quanto o comprimento, largura e volume do pescoço variam consideravelmente entre os espinhos (Walker; Herskowitz, 2021). Em estudo fundamental em que foram analisados os espinhos dendríticos de neurônios do neocórtex de ratos por meio da técnica de Golgi aliada ao microscópio de luz e, adicionalmente, por microscopia eletrônica, Peters e Kaiserman-Abramof (1970) dividiram os espinhos dendríticos em três grupos distintos tendo como base seus tamanhos e formatos. De acordo com os autores, o primeiro grupo, formado pelos espinhos *stubby* (achatados), são os espinhos curtos e grossos sem um pescoço nitidamente definido. O segundo grupo, os espinhos *mushroom* (com formato de cogumelo), possuem um pescoço espesso evidente que se conecta a uma grande cabeça esférica. Por fim, os espinhos do tipo *thin* (fino), possuem um pescoço delgado que se conecta a uma pequena cabeça ovóide ou arredondada. Desde então, essa classificação foi adotada e utilizada em um grande número de publicações científicas que buscaram estudar os espinhos dendríticos (Arellano et al., 2007; Ofer et al., 2021).

No entanto, a classificação de Peters e Kaiserman-Abramof (1970) que separa os espinhos em categorias morfológicas fixas possui muitas limitações e tem sido amplamente desafiada (Runge; Cardoso; Chevigny, 2020). Isso acontece uma vez que a transição entre os grupos *stubby*, *mushroom* e *thin* ocorre bruscamente na classificação feita pelos autores (Pchitskaya; Bezprozvanny, 2020), sendo que, na realidade, existe um *continuum* de formas e tamanhos de espinhos dendríticos (Yuste; Bonhoeffer, 2001; Arellano et al., 2007; Benavides-Piccione et al., 2013; Mancuso et al., 2013; Dall’Oglio et al., 2015; Correa-Júnior et

al., 2020; Pchitskaya; Bezprozvanny, 2020; Rasia-Filho et al., 2021; Fuentealba-Villarroel et al., 2022; Ofer et al., 2022; Rasia-Filho, 2022) em que não é possível definir certamente onde os limites de uma classe de espinhos termina e onde uma outra começa (Tønnesen et al., 2014; Ofer et al., 2021).

Pelo fato de serem estruturas plásticas que podem sofrer alterações constantes, esse *continuum* de formas e tamanhos é extraordinariamente variado (Rodriguez et al., 2008). Além dos *stubby*, *mushroom* e *thin*, os espinhos também têm sido classificados como ramificados, *wide* (espesso), formas com aspecto transicional entre os formatos já citados, atípicos (quando são observados espinhos com formato complexo em que não é possível uma definição simples e/ou única da sua forma) e multilobulados (Dall'Oglio et al., 2015; Correa-Júnior et al., 2020; Rasia-Filho et al., 2021). Há, ainda, formatos adicionais de espinhos dendríticos que foram nominados por diversos grupos de pesquisa, no entanto, nem todas as tentativas de classificação são amplamente utilizadas nas áreas das neurociências (Pchitskaya; Bezprozvanny, 2020).

Essa heterogeneidade de formas e a possibilidade de mudança de formatos frente à atividade neuronal reflete a diversidade de funções dos espinhos (Rodriguez et al., 2008). Por exemplo, acredita-se que os espinhos do tipo *stubby* representam um tipo de espinho imaturo ou transicional uma vez que eles tendem a desaparecer ao longo do desenvolvimento humano (Harris; Jensen; Tsao, 1992; Spacek; Harris, 1997; Hayashi; Majewska, 2005) ao passo que os espinhos do tipo *mushroom* possuem uma forma estável ao longo do tempo (Pfeiffer et al., 2018) e se relacionam com o processo de aprendizado em adultos (Berry; Nedivi, 2017; Helm et al., 2021). Espinhos do tipo *thin* têm cabeças e pescoços pequenos e são estruturas altamente plásticas que podem aumentar de tamanho para formar espinhos do tipo *mushroom* (Walker; Herskowitz, 2021). O tamanho e a forma da “cabeça” dos espinhos estão relacionados com o número de vesículas ancoradas na estrutura pré-sináptica e com o número de receptores na densidade pós-sináptica (Nusser et al., 1998; Schikorski; Stevens, 1999; Rodriguez et al., 2008). Os “pescoços” dos espinhos, por sua vez, também influenciam a resposta sináptica ao permitirem, por exemplo, a compartimentalização elétrica e bioquímica entre a cabeça do espinho e o dendrito (Helm et al., 2021; Ofer et al., 2021).



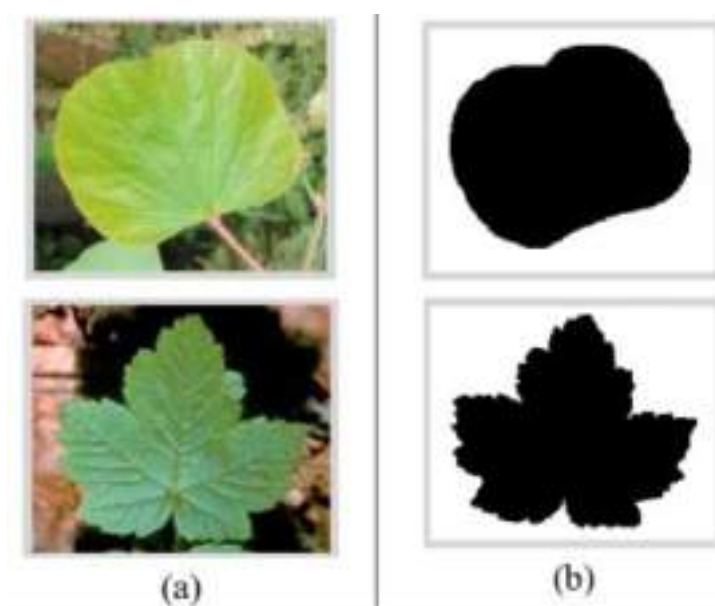
**Figura 1.** Forma e classificação dos espinhos dendríticos. **(A)** Classificação dos espinhos dendríticos com base na observação em microscopia óptica e critérios para atribuição de espinhos a cada classe, com base no diâmetro do pescoço ( $dN$ ) e diâmetro da cabeça do espinho ( $dH$ ) e comprimento do espinho ( $L$ ). Os espinhos dendríticos podem ser classificados como tendo forma de cogumelos ( $dN < dH$ ), finos ( $dN < L$ ,  $dN \leq dH$ ) ou achatados ( $dN \approx L$ ), dentre outras possibilidades. **(B)** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) representativa da região CA1 do hipocampo de camundongo, onde um segmento de um dendrito (D) e várias sinapses podem ser observadas no neurópilo local. Espinhos protruído de ramo dendrítico (DS, coloridos em azul para destaque), sinapses excitatórias com densidades pós-sinápticas (PSD, uma mais complexa indicada

como PSD\*) e terminal pré-sináptico reconhecível pela presença de vesículas sinápticas (SV) e mitocôndrias (M) estão indicados na figura. Barra de escala = 200 nm. **(C)** Imagens de TEM representativas da região CA1 do hipocampo de camundongo mostrando espinhos dendríticos do tipo cogumelo (esquerda), fino (centro) e achatado (direita), todos destacados em azul. Barra de escala = 200 nm. **(D)** Reconstrução 3D de um dendrito de um neurônio da região CA1 do hipocampo de rato. As imagens foram obtidas com microscopia eletrônica de varredura de bloco em série (SBF-SEM). O dendrito com os espinhos passaram pelo processo de segmentação para a elaboração da reconstrução tridimensional (3D) de imagem. Barra de escala = 1  $\mu$ m. **(E)** Imagens de maior aumento de espinhos selecionados do dendrito representado em "D". Da esquerda para a direita é possível observar o aspecto 3D de espinhos em forma de cogumelo, fino e achatado. Barra de escala = 200 nm. Imagem reproduzida de Colombo et al. (2021).

Observa-se, portanto, que os espinhos são estruturas complexas e que sua forma e tamanho impactam diretamente suas funções. Assim, os estudos que buscam descrever a geometria 3D plena dos espinhos dendríticos são de grande valor. Isso porque a visualização 3D dos espinhos (obtida por meio de reconstruções) possibilita a análise de muitas propriedades morfológicas que não são levadas em consideração na observação microscópica bidimensional (2D) (Luengo-Sanchez et al., 2018). A forma 3D detalhada dos espinhos foi estudada por meio de reconstruções elaboradas a partir de diferentes técnicas de microscopia associadas a muitas técnicas histológicas para visualização de tecido nervoso, como a microscopia confocal (Basu et al., 2016, 2018), microscopia de depleção de emissão estimulada (STED) (Willig; Nägerl, 2012; Tønnesen; Nägerl, 2016), microscopia eletrônica de transmissão (Bosch et al., 2015; Dall'Oglio et al., 2015; Ofer et al., 2021), microscopia de luz em campo claro (Dall'Oglio et al., 2015; Al-Absi et al., 2018; Reberger et al., 2018; Vásquez et al., 2018; Correa-Júnior et al., 2020; Fuentealba-Villaruel et al., 2022) e outras (Mancuso et al. (2013) para uma revisão sobre o tema).

Para obter as reconstruções 3D dos espinhos a partir das imagens de microscopia sequencialmente capturadas ao longo do eixo 'z', métodos computacionais de segmentação de imagens desempenham um papel essencial. A segmentação pode ser definida como o processo de agrupar uma imagem em sub-regiões coerentes de acordo com características extraídas da própria imagem como, por exemplo, atributos de cor e/ou textura, e classificar cada sub-região da imagem em classes pré-determinadas (Tripathi et al., 2012; Seo et al., 2020;

Minaee et al., 2021). Simplificando, a segmentação é o processo de separar o objeto alvo do fundo em uma imagem (Figura 2; Liu et al., 2021). No caso dos espinhos dendríticos, uma vez que uma série de imagens é capturada ao longo do eixo 'z' de um dendrito com espinhos, a segmentação da imagem é realizada para diferenciar as estruturas neuronais (dendritos e espinhos) do fundo da microscopia. Em seguida, o resultado da segmentação de imagem é “renderizado” em um volume 3D em que é possível rotacionar, em vários ângulos, as reconstruções dos espinhos e visualizar sua forma 3D plena em todas as dimensões espaciais (Reberger et al., 2018).



**Figura 2.** Exemplos de segmentação de imagem. **(a)** Fotografias de folhas de árvores a serem segmentadas. **(B)** Resultado do processo de segmentação de imagens das imagens de “a” em que o objeto (folha) é separado do fundo da imagem. A porção da imagem representada pela cor preta é o objeto (folha) e a cor branca representa o fundo da imagem. Imagem reproduzida de Nikbakhsh; Baleghi e Agahi (2019).

A técnica de Golgi aliada ao microscópio de luz continua sendo um método importante para visualizar neurônios (Milatovic et al., 2010) e que possibilita a reconstrução 3D de dendritos e espinhos (Al-Absi et al., 2018; Reberger et al., 2018; Correa-Júnior et al., 2020; Fuentealba-Villarroel et al., 2022). Desses, alguns estudos descreveram a forma 3D plena de espinhos por meio de reconstruções desenvolvidas a partir de neurônios impregnados pela técnica de Golgi, como o

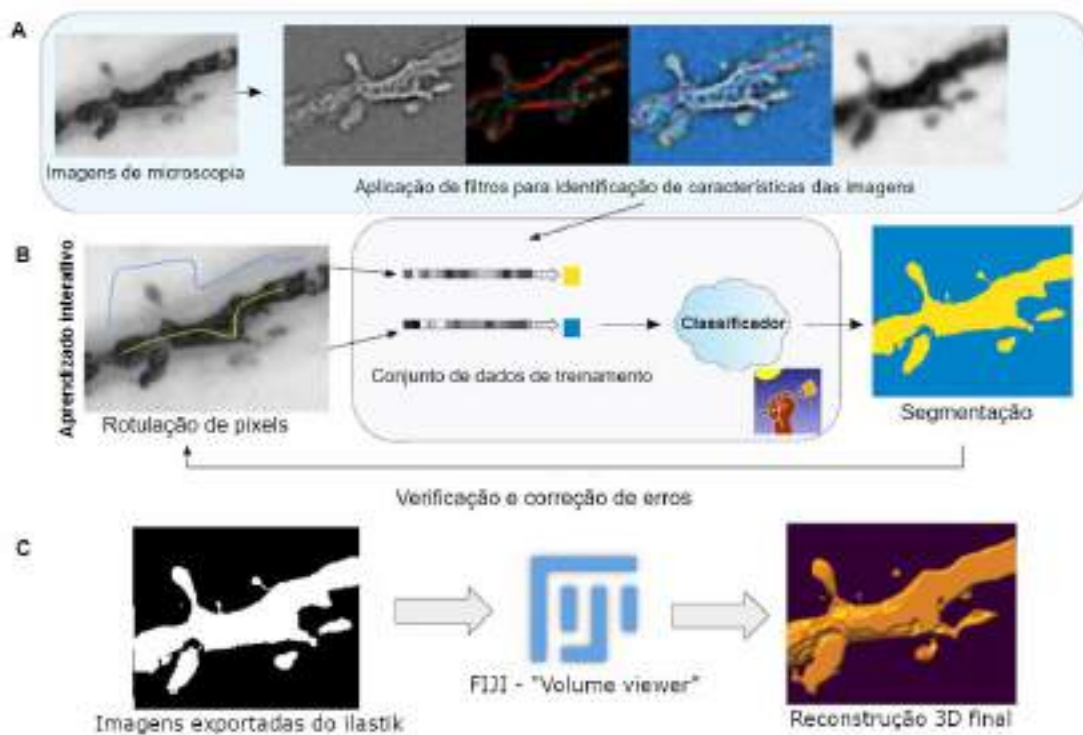
trabalho de Reberger et al. (2018). Novamente, um algoritmo foi elaborado e implementado na plataforma MATLAB em que o seu modelo de segmentação de imagem é baseado no limiar dos valores de intensidade da imagem do dendrito/espinho ao longo do eixo espacial 'z' (Reberger et al., 2018). O método mostrou-se confiável para a visualização 3D dos espinhos humanos analisados. Por exemplo, esse algoritmo já foi usado para descrever espinhos de neurônios do núcleo cortical da amígdala de humanos (Vásquez et al., 2018), da região CA3 do hipocampo humano (Reberger et al., 2018) e, recentemente, foi usado para descrever os espinhos de neurônios de von Economo do ACC humano (Correa-Júnior et al., 2020) e de *spindle-shaped neurons* (neurônios com o corpo celular em forma de fuso e, nesse caso específico, sugestivos de neurônios de von Economo) do PC humano (Fuentealba-Villaruel et al., 2022).

Além do trabalho de Reberger et al. (2018), são escassas as publicações que buscam métodos para reconstruções de espinhos dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi e observados com a microscopia de luz em campo claro. Um desses escassos trabalhos é o de Al-Absi et al. (2018), em que foram reconstruídos espinhos dendríticos de seis neurônios piramidais impregnados pela técnica de Golgi pertencentes às camadas II/III do córtex frontal de ratos. Para tal, os autores utilizaram o “software” comercial Imaris (Bitplane, CH) para a detecção dos espinhos na arborização dendrítica e, após isso, utilizaram o “software” MATLAB para a classificação dos espinhos em grupos distintos (Al-Absi et al., 2018). No entanto, esse estudo tinha como objetivo principal quantificar e classificar os espinhos como *stubby*, *mushroom* ou *thin*, excluindo todas as outras formas observadas. Portanto, embora o trabalho de Al-Absi et al. (2018) possibilite a contagem e a classificação dos espinhos em três grupos fixos, ele não pode ser usado para a observação da forma 3D plena dos espinhos.

Ainda que trabalhos como os de Reberger et al. (2018) e Al-Absi et al. (2018) avancem consideravelmente as possibilidades de pesquisa na área, a reconstrução 3D de espinhos dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi e observados com a microscopia de luz permanece um grande desafio. A significativa heterogeneidade de formas e tamanhos dos espinhos juntamente com as sutis variações de “coloração” e contraste inerentes à técnica de Golgi tornam a

segmentação de imagens ao longo do eixo 'z' de dendritos uma tarefa computacional complexa e que demanda muito poder computacional. A resolução inerente ao microscópio óptico, que restringe a observação de estruturas de até 250 nanômetros (MacDonald; Baldini; Storrie, 2014; Sezgin, 2017; Schermelleh et al., 2019), também dificulta a identificação dos bordos verdadeiros de estruturas muito pequenas, como os espinhos (Mishchenko et al., 2010; Mukai et al., 2011; Vidaurre-Gallart et al., 2022). Adicionalmente, a aplicação de métodos de reconstrução 3D por meio de “software” comerciais ou com códigos fechados (como os “software” Imaris e MATLAB) pode ser uma restrição significativa para o desenvolvimento de pesquisas nas quais as reconstruções 3D seriam extremamente valiosas para estudo da forma neuronal. Sabe-se, ainda, que o uso de “software” comerciais diminui a reprodutibilidade de pesquisas científicas que os utilizam (Nederbragt, 2014; Gezelter, 2015).

A fim de contornar esses problemas, uma das possibilidades é utilizar “software” *open-source* para a segmentação de imagem e, mais especificamente, algoritmos computacionais que usam estratégias de aprendizado de máquina (ou *machine learning*) para tal (Figura 3). O aprendizado de máquina é um ramo da inteligência artificial (IA) que busca construir algoritmos computacionais que sejam capazes de “aprender” (Naqa; Murphy, 2015; Bi et al., 2019; Paixão et al., 2022). Esses algoritmos se adaptam com base nos dados fornecidos para que se tornem cada vez melhores na realização da tarefa desejada (Naqa; Murphy, 2015). O objetivo do aprendizado de máquina é elaborar um sistema que consiga fornecer um modelo de predição, detecção e classificação dos dados analisados (LeCun; Bengio; Hinton, 2015; Min; Lee; Yoon, 2017; Carleo et al., 2019; Paixão et al., 2022).



**Figura 3.** Fluxo de trabalho para a segmentação de imagens utilizando aprendizado de máquina a partir de imagens microscópicas de neurônio cortical humano impregnado pela técnica de Golgi. **(A)** As imagens microscópicas capturadas sequencialmente do segmento dendrítico de interesse (à esquerda) são processadas no “software” gratuito ilastik. Filtros de imagem são selecionados e utilizados (imagens centralizadas) para uma melhor detecção de bordos, texturas e cores, o que servirá para executar a segmentação da imagem em estudo. Quanto mais filtros forem aplicados (para aprimorar a imagem, sem alterá-la completamente), melhor será a segmentação. Na imagem, são mostrados quatro exemplos de filtros aplicados, da esquerda para a direita: *Difference of Gaussians*, *Structure tensor eigenvalues*, *Hessian of Gaussian eigenvalues* e *Gaussian smoothing*. **(B)** “Pixels” são rotulados pelo usuário de acordo com as classes pré-determinadas para “dendrito/espinho” (traços em amarelo) e “fundo de microscopia” (traços em azul). A seguir (centro da imagem), as informações sobre os conjuntos de pixels (ilustrados pelos diferentes tons de cinza enfileirados) rotulados como “dendrito/espinho” ou “fundo de microscopia” são somadas às imagens após o uso dos filtros, forma-se o conjunto de dados de treinamento para ação de um “classificador” (que opera com algoritmos de aprendizado de máquina) e determina-se a qual classe pertence cada um dos “pixels” de toda a imagem. Assim, é gerada a primeira segmentação (imagem à direita em que as cores amarela e azul representam, respectivamente, “dendrito/espinho” e “fundo de microscopia”). Comparando com as imagens de microscopia, o usuário pode verificar e corrigir possíveis erros de segmentação ao rotular corretamente os pixels que foram classificados de forma inadequada pelo ilastik. Essa última etapa pode ser repetida até a segmentação adequada final. Imagens adaptadas de Arganda-Carreras et al. (2017). **(C)** A etapa subsequente envolve carregar as imagens exportadas pelo ilastik (à esquerda) no “software” FIJI/NIH. A seguir, utiliza-se o *plugin*

“Volume-Viewer” para a “renderização” de todas as imagens segmentadas ao longo do eixo ‘z’ em um volume 3D. Com isso, se obtém a reconstrução 3D final (à direita) em que é possível observar os espinhos dendríticos e suas características morfológicas nos três eixos espaciais.

Felizmente, nos últimos anos houve um progresso significativo na elaboração de “software” mais precisos que se utilizam de algoritmos de aprendizado de máquina supervisionados e não supervisionados para a segmentação de imagens (Seo et al., 2020). Resumidamente, enquanto o aprendizado de máquina supervisionado incorpora conhecimentos prévios sobre a tarefa de segmentação por meio de treinamento e correção de erros (por exemplo, um usuário pode “treinar a máquina” para segmentar uma imagem fornecendo exemplos representativos de classes pré-determinadas e corrigindo os erros existentes, fazendo com que o algoritmo “aprenda” e erre cada vez menos), o aprendizado de máquina não supervisionado não exige dados prévios de treinamento e são utilizados em situações “atípicas” (Aganj et al., 2018; Seo et al., 2020). Dentre alguns “software” que se destacam no uso de aprendizado de máquina para segmentação de imagens biológicas estão disponíveis o Vaa3D (Li et al., 2015), o Cytomine Data Mining Module (Marée et al., 2016), o Trainable Weka Segmentação (Arganda-Carreras et al., 2017) e o ilastik (Berg et al., 2019).

Esse avanço tecnológico em relação aos “software” que utilizam aprendizado de máquina, particularmente o supervisionado, para a segmentação de imagens é extremamente conveniente para a reconstrução 3D de espinhos dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi e visualizados com a microscopia de luz. Devido ao procedimento da técnica de Golgi, a intensidade da impregnação sofre variações sutis em diferentes ramos dendríticos de um mesmo neurônio bem impregnado, resultando em segmentos dendríticos mais claros ou mais escuros quando vistos na microscopia (Reberger et al., 2018). Portanto, como os dendritos e os espinhos não possuem cores homogêneas, é impossível adotar um método de segmentação de imagem simples. O aprendizado de máquina supervisionado contorna esse problema. Como as regras de processamento de dados são “aprendidas” a partir de exemplos dados pelo usuário do “software”, o aprendizado de máquina supervisionado é mais flexível do que as técnicas

convencionais de processamento de imagem para resolver esse tipo de segmentação de imagem (Kreshuk; Zhang, 2019).

Considerando isso, o segundo objetivo da presente dissertação foi elaborar um método adicional, simples, rápido, gratuito e confiável para reconstrução 3D de espinhos dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi com o uso de “software” *open-source*. O método aqui apresentado usa a ferramenta de classificação de pixels do “software” ilastik (Berg et al., 2019) para realizar a segmentação de imagens provenientes de microscopia de luz. O Ilastik é uma ferramenta interativa de fácil utilização que permite a análise de imagens biológicas por meio de métodos baseados em aprendizado supervisionado de máquina para usuários que não possuem experiência com métodos computacionais (Berg et al., 2019). Foi realizada a segmentação de imagens seriadas (*image stacks*) de dendritos com espinhos de neurônios pertencentes ao núcleo cortical do complexo amigdalóide e de neurônios do córtex cerebral humanos. Conseguimos, com isso, realizar reconstruções 3D confiáveis que não distorceram, criaram ou apagaram elementos estruturais dos neurônios. Todos os “software” utilizados neste estudo são gratuitos para download e uso, o que viabiliza o desenvolvimento de pesquisas nas quais as reconstruções 3D sejam extremamente valiosas para o estudo da forma neuronal. Todas as aprovações por Comitê de Ética para tanto encontram-se documentadas nos Anexos (ao final desta dissertação).

### **1.3 Neurônios de von Economo (VENs)**

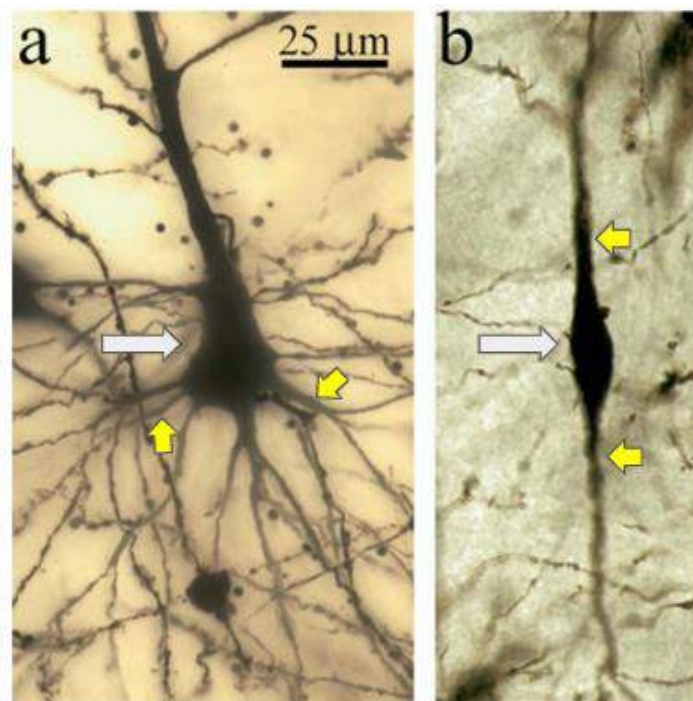
Dois artigos da presente dissertação de mestrado são sobre os VENs (Correa-Júnior et al. (2020) e Fuentealba-Villaruel et al. (2022), a seção “3. Artigos Científicos” a seguir). Este presente tópico não tem como objetivo fazer uma repetição exaustiva da literatura sobre os VENs, uma vez que as publicações mencionadas são recentes e possuem referencial teórico discutido em ambos os artigos. O objetivo desta presente seção é, no entanto, abordar a relevância do tópico de estudo aprofundado em ambas as publicações.

O primeiro pesquisador a descrever com grande detalhamento as características morfológicas e as distribuições corticais e laminares dos VENs em

humanos foi Constantin von Economo (von Economo, 1926; Butti et al., 2013; Banovac et al., 2021). Por esse motivo, esses neurônios carregam o seu nome (González-Acosta et al., 2022). Os VENs são neurônios com o corpo celular caracteristicamente fusiforme e alongado, com dois dendritos primários longitudinais surgindo de polos opostos somáticos (Figura 4; Nimchinsky et al., 1995; Watson; Jones; Allman, 2006; Fajardo et al., 2008; Jacot-Descombes et al., 2020). Desses, um dendrito apical gera uma projeção ascendente em direção à pia-máter e outro dendrito basal é descendente em direção à substância branca, ambos com espinhos dendríticos de distribuição heterogênea (Seeley et al., 2012; Raghanti et al., 2015; Correa-Júnior et al., 2020). Análises comparativas iniciais da citoarquitetura cortical de diferentes espécies sugeriam que os VENs eram células observadas apenas em humanos e em grandes macacos (bonobo, chimpanzé, gorila e orangotango) (Nimchinsky et al., 1999; Allman et al., 2005). Porém, pesquisas posteriores descreveram a presença de VENs em outros mamíferos como guaxinins, vacas, ovelhas, cavalos, porcos, elefantes e baleias (Butti et al., 2013; Evrard et al., 2012; Hakeem et al., 2009; Hof; Gucht, 2007; Raghanti et al., 2015, 2019; Jacob et al., 2021). Em humanos, os VENs foram descritos principalmente nas lâminas corticais III e V do córtex fronto-insular (FI; região anterior do lobo insular) e do ACC (Nimchinsky et al., 1995; Nimchinsky 1999; Allman; Hakeem; Watson, 2002; Allman et al., 2010; Fajardo et al., 2008; Raghanti et al., 2015; Evrard, 2019; Yang et al., 2019; Correa-Júnior et al., 2020), mas também estão presentes no córtex pré-frontal dorsolateral (Fajardo et al., 2018), córtex fronto-polar medial (González-Acosta et al., 2018) e, possivelmente, no PC (Fuentealba-Villarreal et al., 2022).

Além do formato característico do corpo celular e dos dendritos proximais, pouco se sabia sobre o aspecto morfológico desses neurônios presentes nas poucas regiões corticais humanas (Hodge et al., 2020). Watson, Jones e Allman (2006), depois de usarem a técnica de Golgi para descrever os VENs presentes no ACC e FI humanos, especularam que os VENs formavam uma população única de células, com poucas variações entre si. Por conta dos critérios de inclusão para estudo, tais autores consideraram que tanto o dendrito apical quanto o dendrito basal de VENs apresentavam-se basicamente retilíneos, com ramificação

dendrítica esparsa e número de espinhos dendríticos muito menor que neurônios piramidais adjacentes na mesma lâmina cortical. Por esses motivos, por muito tempo teve-se que os VENs pudessem ser neurônios morfologicamente mais “simples” ou “piramidais modificados” e que, aparentemente, deveriam ocupar menos volume, realizar menos conexões e ter uma menor quantidade de funções integrativas de informação quando comparados com os neurônios piramidais de mesma lâmina V neocortical (Watson; Jones; Allman, 2006; Butti et al., 2013).



**Figura 4:** Fotomicrografias do corpo celular e dos dendritos proximais de neurônios corticais humanos impregnados pela técnica de Golgi. **(a)** Corpo celular (flecha cinza) e dendritos basais proximais (flechas amarelas) de neurônio piramidal comum a diversas áreas do neocórtex humano. **(b)** Soma (flecha cinza) e dendritos proximais (flechas amarelas) típico de neurônio de von Economo presentes no córtex cingulado anterior e fronto-insular humanos. A barra de escala se aplica a ambas as imagens. Imagem adaptada de Watson, Jones e Allman (2006).

Recentemente, porém, os achados de Correa-Júnior et al. (2020) adicionaram um maior grau de complexidade na discussão sobre os aspectos morfológicos dos VENs. Isso porque esse estudo mostrou que os VENs presentes no ACC humano, embora apresentem o mesmo aspecto de corpo celular e dendritos primários, são morfologicamente heterogêneos quanto à quantidade e extensão das ramificações dendríticas e pela presença, distribuição, densidade e

formas de espinhos dendríticos. Ou seja, tais neurônios variam desde aspectos como o descrito anteriormente por Watson, Jones e Allman (2006) até comprimentos dendríticos totais maiores, com alta ramificação e espinhos dendríticos com alta densidade e pleomorfismo. Consequentemente, esses dados também impactaram na discussão sobre o papel funcional dos VENs no ACC humano (Correa-Júnior et al., 2020). Some-se a isso o fato de que estudo de expressão gênica demonstrou características específicas para VENs no ACC, contrastando com neurônios piramidais, e sua implicação com funções neurais complexas (Yang et al., 2019). Esses dados abrem questionamentos sobre o aspecto morfológico e funcional dos VENs de outras áreas, como o FI humano. Neste sentido, embora a conectividade exata dos VENs ainda não seja completamente conhecida (Evrard et al., 2019; Jacot-Descombes et al., 2020), o perfil transcriptômico dos VENs presentes no FI humano sugere que sejam neurônios excitatórios com projeções subcorticais extratelencefálicas, como as corticotalâmicas (Hodge et al., 2020), e envolvidos com interocepção, emoção e cognição em humanos (Evrard et al., 2012).

Ademais, VENs expressam fatores de transcrição associados a neurônios de lâmina V com projeções subcorticais (Cobos et al., 2015; Hodge et al., 2020). A região insular anterior, onde se localiza o FI, possui conexões recíprocas com o ACC e córtex pré-frontal ventromedial, mas também com núcleos do complexo amigdalóide e corpo estriado ventral (Namkung et al., 2017). Saleh et al. (2014) demonstraram que, em macacos, os VENs do FI têm projeções axonais que seguem em direção à substância cinzenta periaquedutal e núcleo parabraquial, o que poderia modular comportamentos como ansiedade e medo e/ou a frequência ventilatória. Essa possibilidade também é corroborada pelo fato de que VENs possuem projeções axonais em direção a núcleos do hipotálamo e ao núcleo do trato solitário, possivelmente também modulando a atividade cardiovascular (Cobos et al., 2015). Em humanos, VENs expressam os fatores de transcrição FEZF2 e CTIP2 (que são necessários para projeções subcorticais em ratos) e SATB2, fator de transcrição associado com projeções axonais via corpo caloso (Cobos et al., 2015; Hodge et al., 2020).

O fato de os VENs estarem presentes no FI e no ACC, ambas regiões corticais envolvidas com o processamento social e emocional (Dijkstra et al., 2018), e terem conexões com regiões subcorticais também envolvidas com essas funções, sugere que esses neurônios estejam implicados em funções cognitivas complexas como percepção e julgamentos de cunho social e do estado emocional de outras pessoas e as respostas comportamentais em decorrência disso (Yang et al., 2019). Dados de ressonância magnética funcional (fMRI) demonstraram o FI e o ACC coativados ao se elaborar com empatia o contexto social de estímulos para interpretação emocional e percepção de dor em outras pessoas (Gu et al., 2013). Uma possibilidade funcional é que os VENs dessas áreas corticais, devido ao seu maior corpo celular e calibre de axônio, permitam que o ACC e o FI façam conexões rápidas com regiões encefálicas distantes e que, por isso, possibilitam uma rápida integração de informações e tomada de decisão em situações sociais complexas (Allman et al., 2005; Yang et al., 2019), como descrito para o processamento de informação por coerência de atividade entre neurônios (e ou circuitos) integrados (Bruton, 2021).

De forma consistente com a visão de que os VENs estejam implicados nessas funções, anormalidades em relação à forma e quantidade de VENs foram descritas em doenças neurológicas e psiquiátricas em que os pacientes apresentam déficits sociais e emocionais, como a variante comportamental da demência fronto-temporal (Pasquini et al., 2020), esquizofrenia (Brüne et al., 2010), espectro do autismo (Santos et al., 2011), agenesia do corpo caloso (Kaufman et al., 2008), doença de Alzheimer (Gefen et al., 2018) e “disautonomia” familiar (Jacot-Descombes et al., 2020). A vulnerabilidade específica dos VENs no FI e ACC e as evidências clínicas de suas alterações nessas doenças sugerem que esses neurônios estão relacionados com funções neurais complexas multi-modais na nossa espécie (Bruton, 2021).

Neste cenário, o estudo da ramificação dendrítica e dos espinhos dendríticos dos VENs tornaram-se particularmente importantes para o entendimento do funcionamento e da conectividade neuronal dessas células no cérebro humano. Expondo de maneira sucinta os resultados, em Correa-Júnior et al. (2020) foi descrita, pela primeira vez, a presença de *continuum* morfológico em relação às

características das ramificações dendríticas e dos espinhos dendríticos dos VENs presentes em lâmina cortical V no ACC humano. Isto é, foram observados VENs com poucas ramificações dendríticas nos seus dendritos ascendentes e descendentes primários ao mesmo tempo em que também foram vistos VENs com uma extensa ramificação dendrítica a partir dos ramos dendríticos primários com presença de grande número de ramos dendríticos colaterais. Entre os VENs, também foram descritas diferenças em relação ao número, forma e densidade dos espinhos ao longo da extensão dendrítica. Esse trabalho foi pioneiro ao utilizar reconstruções 3D para o estudo dos espinhos dendríticos dos VENs presentes no ACC humano. Esses dados complementam estudos morfológicos anteriores sobre a organização da citoarquitetura local e propõem possibilidades funcionais adicionais para os VENs presentes em lâmina cortical V do ACC humano. A heterogeneidade morfológica observada estimula mais estudos sobre como esses neurônios especializados evoluíram filogeneticamente e se desenvolvem ontogeneticamente para fornecer computações neurais que aumentam a complexidade e integram o processamento de informações no cérebro humano (Correa-Júnior et al., 2020). As possíveis implicações morfofuncionais dos dados aqui apresentados em circuitos neurais com implicações também em doenças neurológicas e/ou psiquiátricas estão detalhadas no artigo correspondente.

Em Fuentealba-Villaruel et al. (2022), com as mesmas técnicas empregadas no trabalho de Correa-Júnior et al. (2020), descreveu-se, pela primeira vez, a presença, a “arquitetura” dendrítica e as características dos espinhos dendríticos de neurônios com o corpo celular fusiforme (com dois dendritos primários longitudinais) em lâmina cortical V das regiões anterior e intermediária do PC, região que compõe o córtex posteromedial (PMC) humano. Esses neurônios possuíam uma forma de corpo celular e dois ramos dendríticos primários com uma orientação espacial semelhante aos VENs descritos em outras áreas do cérebro humano (Nimchinsky et al., 1995; Allman et al., 2005, Watson; Jones; Allman, 2006; Fajardo et al., 2008; Allman et al., 2010; Cobos; Seeley, 2015; Raghanti et al., 2015; González-Acosta et al., 2018; Evrard, 2019). Também no PC foram descritos neurônios com corpos celulares fusiformes com poucas ramificações dendríticas ascendentes e descendentes ao mesmo tempo em que foram

observados neurônios com um maior número de ramificações dendríticas nos dendritos primários com vários dendritos colaterais em diferentes ângulos e extensões ao longo do neurópilo circundante. A quantidade de espinhos dendríticos variou de esparsa a moderada ao longo da extensão dendrítica e as formas, tamanhos e volumes dos espinhos também apresentaram heterogeneidade. Uma vez que essa foi a primeira descrição desses neurônios nessa região cortical humana, conseqüentemente foi o pioneiro a utilizar reconstruções 3D para o estudo de espinhos dendríticos. Esses resultados adicionam um importante conhecimento à citoarquitetura e ao processamento sináptico e de informações no PC humano integrado em redes multimodais relevantes para o DMN (*Default Mode Network*) e inteligência geral (*g*) no cérebro humano. Igualmente indicaram a necessidade de uma caracterização aprofundada dessas células fusiformes tanto em indivíduos saudáveis quanto em condições neurológicas e psiquiátricas envolvendo o PC no contexto do funcionamento do PMC, como está discutido em Fuentealba-Villarroel et al. (2022). A identificação neuroquímica e transcriptômica dessas células deve ser determinada para estabelecer sua classificação definitiva como VENs (Yuste et al., 2020; Fuentealba-Villarroel et al., 2022).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

1) Elaborar reconstruções 3D dos VENs do ACC e dos neurônios com corpo celular fusiforme, sugestivos de VENs, das regiões anterior e intermediária do PC humano.

2) Elaborar reconstruções 3D de espinhos dendríticos de neurônios humanos impregnados pela técnica de Golgi e observados pela microscopia de luz utilizando aprendizado de máquina supervisionado.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Elaborar reconstruções 3D a partir de imagens microscópicas sequenciais capturadas ao longo do eixo 'z' de neurônios impregnados pela técnica de Golgi para estudo detalhado da forma somática, do padrão de surgimento e ramificação dos ramos dendríticos ascendentes e descendentes e seus ramos colaterais para detalhamento pleno da forma neuronal nas três dimensões espaciais, mormente (e de forma inédita) dos VENs do ACC e PC humanos;

2.2.2 A partir das reconstruções 3D, obter dados morfométricos do corpo neuronal e das ramificações dendríticas dos neurônios de interesse relacionados a área e volume de corpo celular e de diâmetro e comprimento de dendritos;

2.2.3 Descrever, com base nos dados obtidos, as semelhanças e diferenças morfológicas entre os VENs do ACC e os neurônios com corpo celular fusiforme do PC humanos;

2.2.4 Utilizar algoritmo desenvolvido na plataforma MATLAB e recursos adicionais de computação para reconstrução 3D das imagens microscópicas de maior aumento dos ramos dendríticos para descrever detalhadamente a presença,

distribuição, densidade e os tipos de espinhos dendríticos em dendritos descendentes e ascendentes, desde a parte proximal até a distal desses ramos e seus colaterais;

2.2.5 Testar e empregar o “software” gratuito ilastik com o intuito de utilizar a estratégia de aprendizado de máquina para a segmentação de imagens e reconstrução 3D de espinhos dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi sob microscopia de luz;

2.2.6 Utilizar os resultados de segmentação de imagem para elaboração de reconstrução 3D dos espinhos e descrição da forma plena dessas estruturas e, a seguir, comparar as reconstruções 3D com as imagens originais de microscopia a fim de conferir se o resultado final das reconstruções são fidedignas em relação às imagens de microscopia ao longo do eixo espacial ‘z’.

2.2.7 Associar os dados morfológicos encontrados com as funções complexas já descritas para o ACC e PC humanos, buscando novos dados sobre conexão aferente e eferente dessas áreas corticais na espécie humana;

### **3. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

Seguindo as normas vigentes para a elaboração de dissertações de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, a metodologia e os resultados obtidos neste estudo estão em formato de artigos científicos redigidos em língua inglesa. Os dois primeiros artigos encontram-se da mesma forma como publicados e em acesso livre à comunidade científica. O terceiro artigo está redigido em inglês e formatado de acordo com as normas da revista à qual foi submetido para publicação (e atualmente em fase de revisão).

**Artigo 1 – *Dendritic and Spine Heterogeneity of von Economo Neurons in the Human Cingulate Cortex***

**Periódico em que o artigo foi publicado:**

*Frontiers in Synaptic Neuroscience* (ISSN: 1663-3563)

**Fator de impacto de acordo com o Journal Citation Report (2022):**

3.5

**Endereço eletrônico para visualização e *download* da publicação:**

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsyn.2020.00025/full>

**Endereço eletrônico para visualização e *download* do *Research Topic* que o artigo faz parte:**

<https://www.frontiersin.org/research-topics/10560/latest-advances-on-excitatory-synapse-biology#articles>



# Dendritic and Spine Heterogeneity of von Economo Neurons in the Human Cingulate Cortex

Nivaldo D. Correa-Júnior<sup>1†</sup>, Josué Renner<sup>1†</sup>, Francisco Fuentesalba-Willmore<sup>2†</sup>, Arlete Hilbig<sup>3</sup> and Alberto A. Rasia-Filho<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup> Graduate Program in Biosciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (FECISQ), Porto Alegre, Brazil, <sup>2</sup> Laboratory of Morphology and Physiology, Department of Basic Sciences/Physiology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil, <sup>3</sup> Graduate Program in Neuroscience, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, <sup>4</sup> Department of Medical Clinic/Neurology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

The human cingulate cortex (CC), included in the paralimbic cortex, participates in emotion, visceral responses, attention, cognition, and social behaviors. The CC has spindle-shaped/fusiform cell body neurons in its layer V, the von Economo neurons (VENs). VENs have further developed in primates, and the characterization of human VENs can benefit from the detailed descriptions of the shape of dendrites and spines. Here, we advance this issue and studied VENs in the anterior and midcingulate cortex from four neurologically normal adult subjects. We used the thionin technique and the adapted "single-section" Golgi method for light microscopy. Three-dimensional (3D) reconstructions were carried out for the visualization of Golgi-impregnated VENs' cell body, ascending and descending dendrites, and collateral branches. We also looked for the presence, density, and shape of spines from proximal to distal dendrites. These neurons have a similar aspect for the soma, but features of spiny dendrites evidenced a morphological heterogeneity of CC VENs. Only for the description of this continuum of shapes, we labeled the most common feature as VEN 1, which has main dendritic shafts but few branches and sparse spines. VEN 2 shows an intermediate aspect, whereas VEN 3 displays the most profuse dendritic ramification and more spines with varied shapes from proximal to distal branches. Morphometric data exemplify the dendritic features of these cells. The heterogeneity of the dendritic architecture and spines suggests additional functional implications for the synaptic and information processing in VENs in integrated networks of normal and, possibly, neurological/psychiatric conditions involving the human CC.

**Keywords:** dendritic spines, Golgi method, human brain/cytology, neocortical layer V, modified pyramidal neurons, paralimbic cortex, 3D reconstruction

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Alvaro Camarero,  
Federal University of Rio Grande do  
Norte, Brazil

### Reviewed by:

Zdravko Peteržek,  
University of Zagreb, Croatia  
Ramasoa Razafindralandy,  
Embrak Medical University, Austria

### \*Correspondence:

Alberto A. Rasia-Filho  
rasiafilho@ufrgs.br  
rasiafilho@yahoo.com

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

Received: 03 March 2020

Accepted: 26 May 2020

Published: 08 July 2020

### Citation:

Correa-Júnior ND, Renner J,  
Fuentesalba-Willmore F, Hilbig A and  
Rasia-Filho AA (2020) Dendritic  
and Spine Heterogeneity of von  
Economo Neurons in the Human  
Cingulate Cortex.  
*Front. Synaptic Neurosci.* 12:25.  
doi: 10.3389/fpsy.2020.00025

## INTRODUCTION

The cingulate cortex (CC) is part of the "proisocortex" in the paralimbic cortex, which is phylogenetically older than the neocortex along with the evolution of the mammalian brain (Ilinsk, 1979; Kulb and Whishaw, 2015; Pandya et al., 2015). The human CC begins adjacent to the genu of the corpus callosum corresponding to the cortical area 24 of Brodmann and the agrular

anterior limbic area with the subdivision area 33. The CC extends from the precingulate to the area fusiform, numbered areas 36–38 by von Economo and Koskinas (Tziachou, 2009; see further subdivisions and classification in Vogt, 2015; functional and connectivity-based organization in Cauda et al., 2013; Glasser et al., 2016). The anterior cingulate cortex (ACC), initially considered a component of the superior limbic lobe (Talamoni and Tournaud, 1993; Tziachou, 2009), is adjacent to the functionally distinct midcingulate cortex (MCC) (Vogt, 2015). Anterograde and retrograde tracing data showed CC-connections with the prefrontal, premotor and motor, orbitofrontal, insular, and anterior temporal cortex as well as with some amygdaloid, hypothalamic, and thalamic nuclei and the periaqueductal gray matter in primates (Nieuwenhuis et al., 1988; Craig, 2002; Watson, 2006; Pandya et al., 2015 and references therein). In our species, the parietal cortex and the ventral striatum are also included (Vogt, 2015). The CC integrates specialized networks for attentional processes/executive functions with sensory, high-order associative and limbic brain areas. In this regard, the human CC elaborates focused attention for problem-solving, goal-directed, and exploratory behaviors; long-term memory and cognitive processing; premotor planning with motivational features; social awareness and emotions as love, trust, empathy, deception, guilt, and fear; feeding and aggression; and sympathetic and parasympathetic responses to modulate heart rate and arterial pressure, respiratory, and gastrointestinal responses (Allman et al., 2001, 2010, 2011a; Watson, 2006; Watson et al., 2006; Juan et al., 2016; Rangneela et al., 2017 and references therein).

The human CC has a specialized neuronal type with an elongated “spindle-shaped” or rod-shaped cell body in its layer V (Nimchinsky et al., 1995). These cells, named von Economo neurons (VENs; Tziachou, 2009; Seeley et al., 2012), differ morphologically from the adjacent layer V pyramidal neurons (Feldman, 1984; Braak and Braak, 1985) and are larger than small-layer VI fusiform neurons (Nimchinsky et al., 1999). Congruent results with Nissl/thionin staining, Neu-N neuronal nuclear antigen, and immunoreactivity for functional biomarkers (Nimchinsky et al., 1995; Fajardo et al., 2006; Simpson et al., 2011) identified VENs with vertically oriented fusiform soma and two main perpendicularly oriented primary dendrites emerging from opposite extremes, one directed to the superficial cortical layers and another directed to the white matter (Nimchinsky et al., 1995, 1999; Fajardo et al., 2006; Raghani et al., 2015; González-Acosta et al., 2018), with few and usually short side branches (Watson, 2006). VENs do not express immunoreactivity for interneuron markers (i.e., parvalbumin, calbindin, or calretinin) but project axons to the subcortical white matter, some entering into the cingulum bundle (Nimchinsky et al., 1995), toward the brainstem or spinal cord regions (Cobos and Seeley, 2013).

The CC VENs have a characteristic phylogenetic and ontogenetic development (Allman et al., 2011a,b; Cauda et al., 2014). The ACC VENs evolved with a clustering pattern in our species and our closest relative living primates, the great apes (Nimchinsky et al., 1999; Allman et al., 2011b; Raghani

et al., 2015). VENs correspond to only 5.8% compared to the number of layer V pyramidal neurons (Nimchinsky et al., 1999) and approximately 3% of all neurons in layer V in the human ACC (Fajardo et al., 2006). Most human VENs mature along with the postnatal brain development (Allman et al., 2010, 2011a; Butti et al., 2013; Raghani et al., 2015). Indeed, VENs are rare during gestation, and numbers increase during the first 8 months after birth, decrease and reach the adult number at 4–8 years (Allman et al., 2010, 2011a), and remain constant throughout aging in individuals with average cognition, but are comparatively more numerous in individuals ( $\geq$  age 80) who show outstanding memory abilities (Gefen et al., 2018).

The pattern of dendritic branching and the presence of pleomorphic spines provide relevant morphological criteria for the classification of neurons (Ramón y Cajal, 1909–1911; Ramón-Moliner, 1962; Braak, 1981; Galbraith et al., 1997; Vaquer et al., 2018). This is an important issue because the dendritic architecture relates to the biophysical properties of the neuron, the membrane available for contacts and integration of excitatory and inhibitory inputs, and the establishment of spatiotemporal domains for the synaptic computations (Spruston, 2008; Spruston et al., 2013; Rollohagen and Lübke, 2016). Furthermore, dendritic spines are specialized postsynaptic units for most excitatory inputs, increasing the density of synapses in each cell as well as the possibilities for modulation and plasticity of information transmission (Bourne and Harris, 2008; Rochefort and Konnerth, 2012; Spruston et al., 2013; Brusco et al., 2014; Stewart et al., 2014; Woolfrey and Srivastava, 2016). Spines show varied shapes and sizes whose complexity is more evident in the human brain (Ramón y Cajal, 1909–1911; Yuste, 2013; Dall’Oglio et al., 2015). Dendritic spines can have various region-specific and neuron-specific functional implications (Fiala et al., 2002; Higashi-Takagi et al., 2015; Nakahata and Yuste, 2018) and show structural changes in neurological and psychiatric disorders (Pavoni et al., 2011; Hems and Dworkin, 2016).

There are few studies describing the dendritic architecture and spine diversity of layer V VENs in the human CC. For example, VENs were reported as fusiform cells with sparse dendritic trees and symmetric apical and basal branches with fewer spines than pyramidal neurons (Watson et al., 2006). Two types of spiny VENs in the human ACC with different dendritic lengths were defined, the small VENs with a total dendritic length of 1,500–2,500  $\mu\text{m}$  and the large ones with 5,000–8,000  $\mu\text{m}$  (Buzovic et al., 2019). We obtained further morphological data to depict the heterogeneity of the VENs in the human CC. The VENs in layer V were identified by the thionin technique and further visualized by three-dimensional (3D) reconstruction of Golgi-impregnated neurons. Although having a spindle-shaped cell body with similar longitudinal length, CC VENs show heterogeneity in their dendritic branching pattern, ranging in a morphological continuum from sparsely branched to more extensively ramified cells. The 3D images evidenced additional differences in the distribution, density, and shapes of dendritic spines in these VENs. The morphological and likely functional implications are provided below.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

The subjects were two men and two women. Age, postmortem interval, cause of death, and type of tissue fixation are shown in Table 1. All ethical and legal procedures were carried out in accordance with the international regulatory standards based on the Helsinki Declaration of 1964. Written informed consent for brain donation was obtained with a next of kin during an autopsy at the morgue. The privacy rights of subjects were always observed. The Brazilian Ethics Committee from the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA; #62536118.6.0000.5345 and 18718719.7.0000.5345) approved this study.

Donors' clinical and comorbidity information was also obtained by interviewing a next of kin at the morgue. Subjects were reportedly healthy neurologically and psychiatrically, had no previous neurosurgical interventions, and were rated screened for cognitive decline using the "Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly" (IQCODE; Noto et al., 2017). This is a validated interview procedure for which cutoff point scores of  $\geq 3.27$  or 3.48 are considered indicative of dementia in the Brazilian population (Vanches and Lourenço, 2008; Carrilho et al., 2015). Only cases below these edge values were studied (Table 1). Besides, brain tissue from each subject was analyzed histologically and immunohistochemically by a neurologist/neuropathologist (AH) to confirm the absence of common vascular lesions or neurodegenerative disorders (data not shown).

### Tissue Processing for the Thionin Staining

All brains were kept immersed in 10% laboratory-grade, unbuffered formaldehyde solution at room temperature (RT) for approximately 5 years before the present procedure. The medial border of the cerebral hemisphere, the corpus callosum, and the characteristic aspect of the CC served as anatomical references (Talainch and Tournois, 1993). The left hemisphere CC was studied from  $-36.0$  mm to  $5.4$  mm from anterior to posterior position related to the midpoint of the anterior commissure (plates 5–26 according to Mai et al., 2008).

From each brain, tissue blocks containing the CC were sectioned and postfixed at RT for 30 days using a phosphate buffer solution (PBS, 0.1 M, pH = 7.4) with 4% formaldehyde and 1.5% picric acid. Then, the samples were sectioned in the coronal plane with a vibrating microtome (10006; Leica, Germany) in an alternating fashion. One series was sectioned at  $50 \mu\text{m}$  for the thionin technique. The other series was sectioned at  $200 \mu\text{m}$  for the Golgi method.

The thionin staining was used to identify the different cells and layers in the CC (Figures 1, 2). Staining began by placing serial sections from each tissue block on gelatin-coated slides and left to dry at RT for 1 day. Afterward, the slides were (1) immersed in a 4% formaldehyde in PBS for 1 week at 4°C protected from light; (2) dried for 1 day at RT and placed in a 70% ethanol solution for another day; (3) immersed in solutions of increasing

concentrations of ethanol; (4) cleared in absolute xylene; (5) immersed in decreasing solutions of ethanol and washed in distilled water; (6) immersed in a solution of 0.25% thionin (Merck, Germany) for 3 min; (7) immersed again in solutions of increasing ethanol concentration; (8) dipped in a solution of 95% ethanol with 1% acetic acid and absolute xylene; and (9) mounted with synthetic balsam (Soldan, Brazil) and coverstipped (Dall'Oglio et al., 2013).

### The Golgi Method and the 3D Reconstruction Procedure

The "single-section" Golgi method was adapted to provide reliable results for the neuronal cell body and the dendritic and spines features in long-term fixed human brains (Dall'Oglio et al., 2010). The consistency of the present procedure is the same that served for previous characterization of neurons and dendritic spines in subcortical and cortical human brain areas (e.g., the medial and cortical amygdaloid nuclei and the CA3 hippocampal area; Dall'Oglio et al., 2013, 2015; Reberger et al., 2018; Vinquez et al., 2018).

The CC sections were kept for 3 days immersed in the post-fixation solution at RT. Afterward, sections were (1) rinsed in PBS and transferred to a solution of 0.1% osmium tetroxide (Sigma Chemicals Co., United States) in PBS for 20 min; (2) rinsed in PBS and immersed in 3% potassium dichromate (Merck) at 4°C in the dark for 2 days; (3) rinsed again in distilled water; "sandwiched" between coverslips, and placed in a solution of 1.5% silver nitrate (Merck) at RT in the dark for 1 day; (4) washed in distilled water; (5) placed on gelatin-coated histological slides, dried at RT, and dehydrated in an ascending series of ethanol (from 70 to 100% for 3 min each); (6) cleared in ethanol and absolute xylene; and (7) covered with non-acidic synthetic balsam (refractive index = 1.518–1.521, Permount Mounting Medium, EMS, USA or similar product, Soldan, Brazil) and coverslips.

We used the following including criteria to select neurons for analysis: (1) have cell bodies located within the boundaries of the ACC and MCC and in the cortical layer V; (2) have the cell body shape and primary dendrites characteristic of VNEs; (3) be isolated from neighboring cells to avoid "tangled" dendrites; (4) have dendrites with defined borders and, as much as possible, tapering after branching or at distal locations; and (5) have dendritic spines distinguishable from the background.

The general morphology of selected neurons was studied at  $\times 260$  (using an objective plan apochromatic lens UPlanSApo 0.6 NA, Olympus, Japan) in a light microscope (Olympus BX-61, Japan) equipped with a  $z$ -stepping motor and coupled to a CCDDP72 high-performance camera (Olympus, Japan). Each image was acquired after advancing  $0.5 \mu\text{m}$  for each  $z$  stack, under high resolution ( $1360 \times 1024$  pixels), and submitted to dynamic deconvolution using the Image-Pro Plus 7.0 software (Media Cybernetics, United States) during the acquisition process (Dall'Oglio et al., 2013; Reberger et al., 2018). Files were recorded as TIFF files. The selected images were converted to 8-bit monochromatic pictures before processing.

We first performed a two-dimensional (2D) reconstruction of Golgi-impregnated neurons by summing microscopic images

**TABLE 1** | Characteristics of the human cases.

Case	Age (years)	Sex	PMI (hours)	ICCODE	Cause of death	Fixation	Technique
1	91	F	± 6:00	1:32	Pharyngitis	Immersion	Thionin/Golgi
2	62	F	± 0:00	3:00	Undetermined	Immersion	Thionin/Golgi
3	79	M	± 0:00	3:10	Cerebral Artery	Immersion	Thionin/Golgi
4	48	M	± 0:00	3:00	Undetermined	Immersion	Thionin/Golgi

PMI, post-mortem interval; F, female; M, male.

at sequential focal planes that included the cell body and all visible dendrites (Figure 3). The features of the soma and the primary dendritic shaft thickness as well as the branching pattern and spatial orientation of main dendritic shafts in the neuropil supported the classification of CC layer V neurons as VEMs. Small adjustments of brightness and background contrast were done in final reconstructed images using Adobe Photoshop CS3 software (Adobe Systems, Inc., United States) without altering the original neuronal features.

Based on the 2D general morphology, we performed the 3D reconstruction of VEMs using the Neuroanatomic free software (v1.6.3 programmed in Borland C++ Builder, University of Reading, United Kingdom). Semiautomatic tracing of the cell body and dendrites was done for the original stack of microscopic images acquired along with the three spatial coordinates. Reconstructions were achieved as a sequence of 3D points with an ASCII-based format representing dendritic trees as a series of connected cylinders of varying radii identified by orthogonal lines from edge to edge (Niyati et al., 2012). The luminosity was inverted to allow more details to be observed in the dendritic shafts contrasting with the background. The contrast was adjusted for the visualization of thin branches. Algorithm and image processing are depicted in Myatt et al. (2012). Final images were saved as SWC + format for storing neuron morphologies (Pavlok and Ascoli, 2013). Morphometric data were obtained from the L-Measure free software (Scorcioni et al., 2008) using the 3D reconstructed images. Representative examples of VEMs in the CC were studied. Values were calculated for the cell body length, main diameter and volume, dendritic diameter of the primary shafts, total number of branches (i.e., the sum obtained starting from primary dendrites, including segments between branching points, and toward the end of tapered main or collateral branches), and total length and total volume of the dendritic tree.

We obtained 33 VEMs that randomly fulfilled the including criteria for study. From our sample, 15 neurons were labeled as VEN 1, 10 were VEN 2, and 5 were VEN 3 (see Results). The number of these Golgi-impregnated VEMs per studied case and their location in the CC is shown in Table 2.

Afterward, for the 3D reconstruction of dendritic spines, bright-field images were acquired at a final magnification of  $\times 1,300$  using an  $\times 100$  oil immersion objective lens (plan apochromatic UPlanSApo 1.4 NA, Olympus, Japan). Each image was acquired with high resolution ( $2870 \times 1948$  pixels) and submitted to dynamic deconvolution using the Image-Pro Plus 7.0 software. Spines were imaged from proximal to distal branches in each neuron studied. Data were obtained by

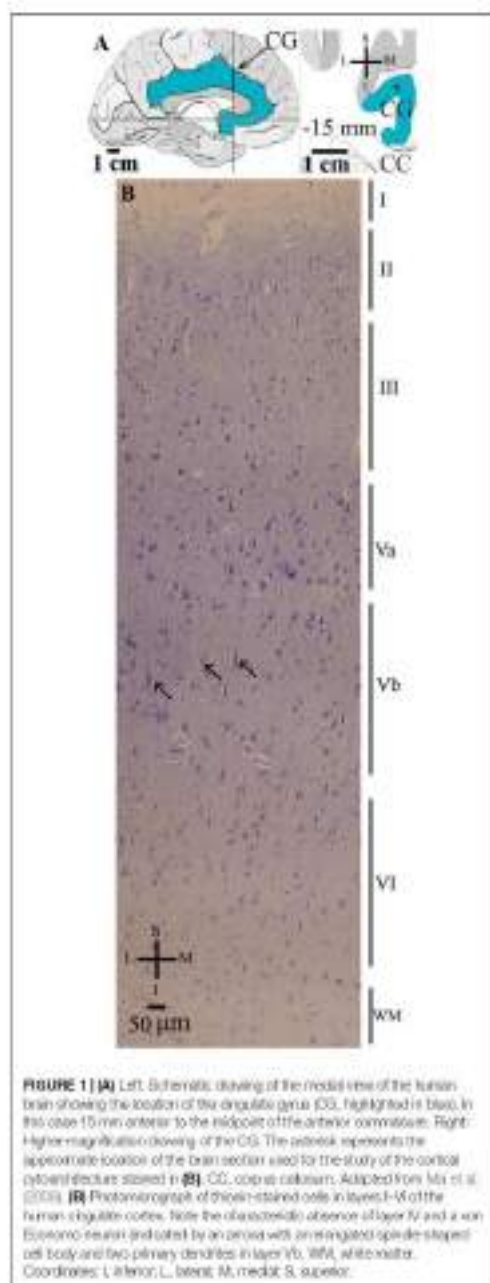
controlling the focus in the "z" axis and acquiring z-stacks at sequential 0.1  $\mu\text{m}$  steps. Corresponding images were stored as TIFF files and converted to 8-bit monochromatic pictures. Each spiny dendritic segment imaged consisted of approximately 100–200 sequential frames saved as TIFF files.

Following Ruberg et al. (2015), spines were 3D reconstructed using an algorithm performed in the MATLAB software (R2015b, The MathWorks, United States). That is, after processing the gray-scale slices independently or using median 3D filters in smaller sub-volumes, images were processed using the following steps: (a) outlier removal; (b) edge enhancement using a variant of the "unsharp masking method" and image-filtering approach based on domain transforms ("edge-aware"); (c) binarization using an adaptive thresholding approach; (d) false-positive pruning; (e) 2D flood-fill operation with each slice of the binary volume; (f) tricubic interpolation to smooth transitions between adjacent slices; and (g) visualization of the final volume of the sampled images containing the selected dendritic shafts and their spines (Vizquez et al., 2018) using the "Fiji" [ImageJ] software (Schindelin et al., 2012) with the "Volume Viewer" plug-in. Images had final adjustments of brightness and contrast made in Photoshop CS3 without altering spine counting or classification.

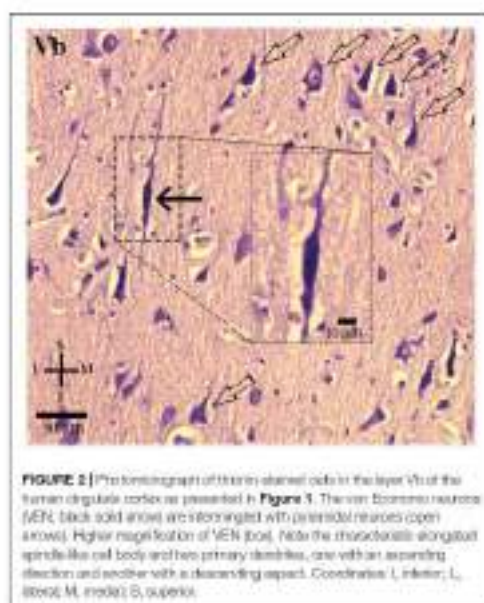
The identification and classification of each type of 3D-reconstructed dendritic spine was based on previous descriptions (Pala and Harris, 1999; Arellano et al., 2007a,b; Brusco et al., 2010, 2014; González-Ramírez et al., 2014; Dall'Oglio et al., 2015). By rotating the reconstructed images, spines were inspected at different angles to determine their presence and distribution from proximal to distal dendrites and their number, shape, and size (Ruberg et al., 2018). For each spine, we observed (1) the presence, length, and diameter of a neck, (2) the number of protrusions from a single stalk, (3) the head diameter, and (4) the head shape. According to these morphological features, spines were classified as (1) thin, (2) stubby, (3) wide, (4) mushroom-like, (5) ramified, (6) having a transitional aspect between these classes, or (7) "atypical" (or "multimorphic") spines with usually more complex and varied shapes (Dall'Oglio et al., 2015 and references therein). Small protrusions extending from the head of a spine were classified as spinules (Fetsko et al., 2014; Petralia et al., 2018). Spine density was calculated as the number of spines per dendritic length in proximal and distal segments. We counted 55, 104, and 493 dendritic spines in these segments of representative VEMs 1, 2, and 3, respectively.

Not all cells were impregnated by the Golgi method. Therefore, descriptive data are provided for representative VEMs

<sup>1</sup> <http://imagej.nih.gov/ij/plugins/volumerender.html>



**FIGURE 1 | (A)** Left: Schematic drawing of the medial view of the human brain showing the location of the cingulate gyrus (CG), highlighted in blue. In this case 15 mm anterior to the midpoint of the anterior commissure. Right: Higher magnification drawing of the CG. The red box represents the approximate location of the brain section used for the study of the cortical cytoarchitecture stained in (B). CC, corpus callosum. Adapted from Liu et al. (2003). **(B)** Photomicrograph of thionin-stained cells in layers I–VI of the human cingulate cortex. Note the characteristic absence of layer IV and a von Economo neuron (indicated by an arrow) with an elongated spindle-shaped cell body and two primary dendrites in layer Vb. WM, white matter. Coordinates: L, inferior; L, lateral; M, medial; S, superior.



**FIGURE 2 |** Photomicrograph of thionin-stained cells in the layer Vb of the human cingulate cortex as presented in Figure 1. The von Economo neurons (VENs, black solid arrow) are elongated with spindle-shaped cell bodies (open arrow). Higher magnification of VEN (box). Note the characteristic elongated spindle-like cell body and two primary dendrites, one with an ascending direction and another with a descending aspect. Coordinates: L, inferior; L, lateral; M, medial; S, superior.

in layer V of the human CC, but the number of completely impregnated VENs in the ACC and MCC precluded additional extensive statistical analysis. Quantitative data are provided to address how local VENs appear in a continuum of morphological features. It has to be mentioned that these morphometric values are not actual ones (as might exist *in vivo*) due to changes in the brain tissue following the postmortem period and the various steps of the histological processing (Dall'Oglio et al., 2015, 2013, 2015; Seiberger et al., 2018; see also Ziffo et al., 2008 for additional discussion). These quantitative data have to be considered with caution and are used as indicators of the relative differences between VENs described here.

All computational procedures were run using Windows Microsoft® (version 10), Intel® Core™ i7-8750H CPU @2.20 GHz, 16.0 GB RAM memory, NVIDIA® GeForce GTX 1050 Ti with 4 GB for image processing.

## RESULTS

Thionin-stained sections served to identify the local cortical cytoarchitectonics and, in the CC, the absence of the inner granular layer IV (Figure 1). Morphological criteria were used to identify CC VENs in layer V. VENs have a typically large and elongated spindle-shaped cell body with two symmetric, vertically oriented primary dendritic shafts (Figure 2). The cell body shape of these cells is similar to those reported by other authors (e.g., Nimchinsky et al., 1995; Allman et al., 2000). All identified VENs in layer V presented the neuronal chromatin

**TABLE 2** | Number of Golgi-impregnated VENs in the human cingulate cortex (CX) per studied case.

Case	VEN type 1	VEN type 2	VEN type 3
1	0 [–5.0 mm]		1 [–5.0 mm]
2	4 [–30 mm]		
3	4 [2.7 mm]	3 [2.7 mm]	
4	1 [–1.0 mm]	7 [–8.3 mm]	4 [8.0 mm]
Total	9	10	5

Approximate location in the CX for the three types of neurons are indicated in the brackets.

aspect and an evident nucleolus. VENs were intermingled with pyramidal neurons and adjacent glial cells (Figure 2). The identification of VENs was reinforced by the Golgi results.

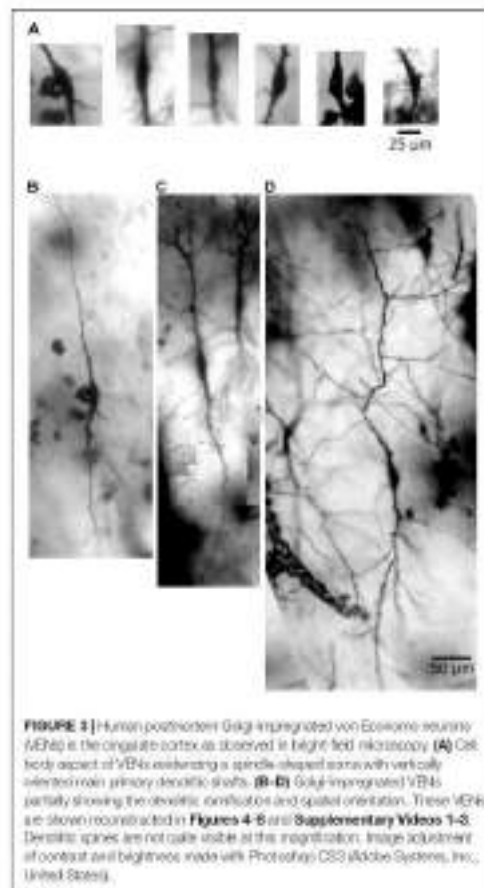
Golgi data provided the shape of VEN dendrites and added new information on spines (Figure 3). In this regard, all studied VENs are spiny neurons. Dendritic spines showed a variety of shapes and sizes. Their types ranged from small to large stubby and wide, thin and mushroom-like, ramified, transitional aspects and/or more complex shapes with multiple bulbous structures, including double spines (i.e., a spine with a neck ending in a bulb, from which a second neck protruded that will end in another bulb; González-Ramírez et al., 2014; Dall'Oglio et al., 2015). These pleomorphic spines were found either isolated or forming clusters, and with different densities in main and collateral dendritic branches. Spinules were observed in different spine types.

Our results allowed the identification of a continuum of dendritic shapes for VENs in the human CX. We selected representative Golgi-impregnated neurons to exemplify the heterogeneity of their dendritic branching pattern (Figures 4–8 and Supplementary Videos 1–3). There is not a strict separation of VENs into different subtypes at this moment. Rather, the general aspect of these neurons was labeled as VENs 1, 2, and 3 only for easy reference when describing the present data.

The continuum of VEN shapes ranged from cells with few dendritic branches and sparse simple spines (VEN 1, Figure 4 and Supplementary Video 1), an intermediate aspect regarding the dendritic branching pattern and the slight increase in the number and types of spines (VEN 2, Figure 5 and Supplementary Video 2), and a more profuse dendritic ramification and the highest density of pleomorphic spines beginning close to the soma and extending through distal dendritic segments (VEN 3, Figures 6, 7 and Supplementary Video 3).

Furthermore, VEN 1 shows both ascending and descending dendrites with a straight course and few ramifications (Figure 4), absence or sparse spines in proximal segments (Figures 4a,d), and a small increase in spine density toward distal segments (Figures 4b,c,e,f). These dendritic spines usually have a simple shape, and most were classified as stubby or wide ones (Figures 4a–f), few as atypical ones with spinules (Figures 4c1,f2). An example of VEN 1 after 3D reconstruction is shown in Supplementary Video 1.

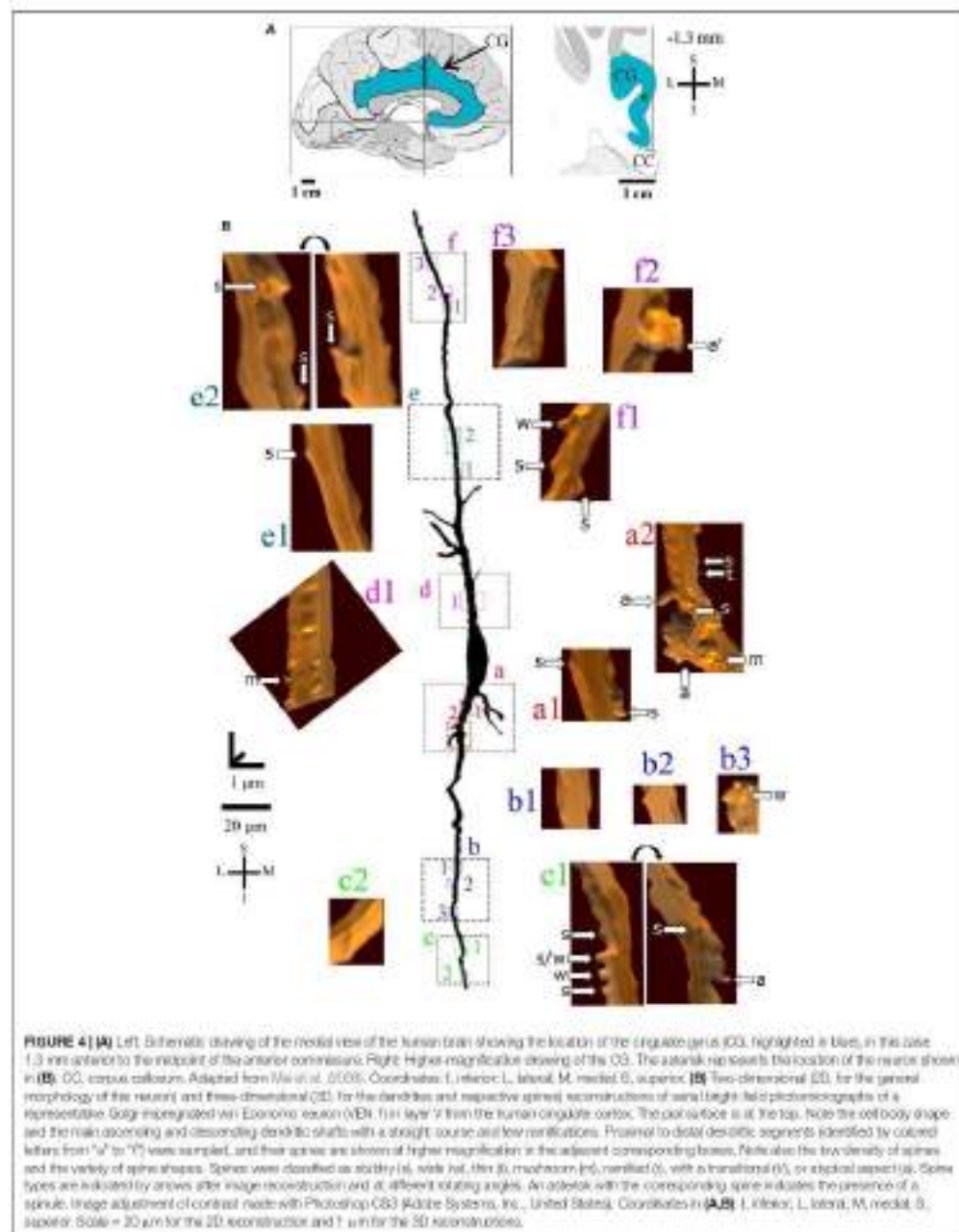
VEN 2 has proximal branching points at both the main ascending and descending primary dendrites (Figure 5).

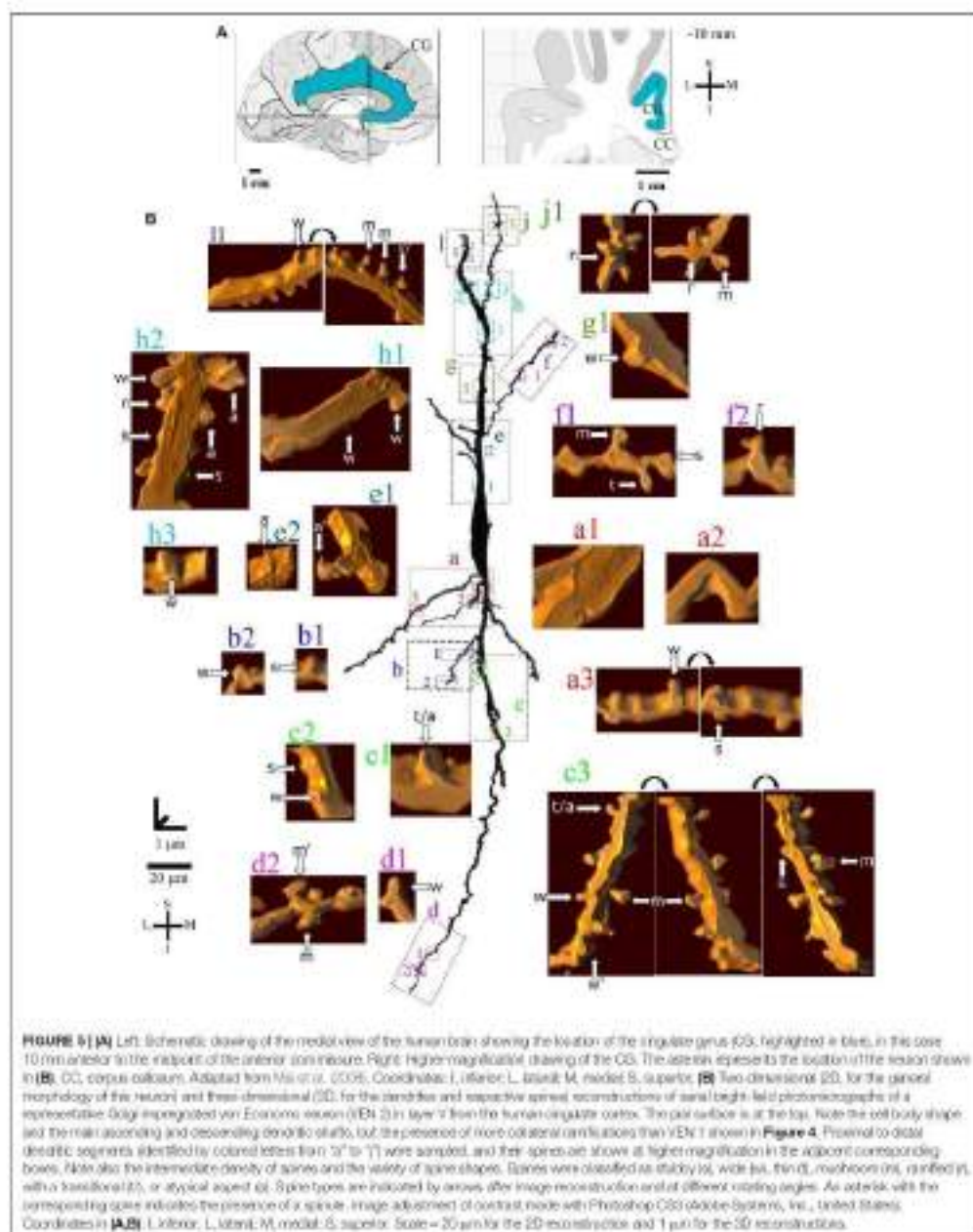


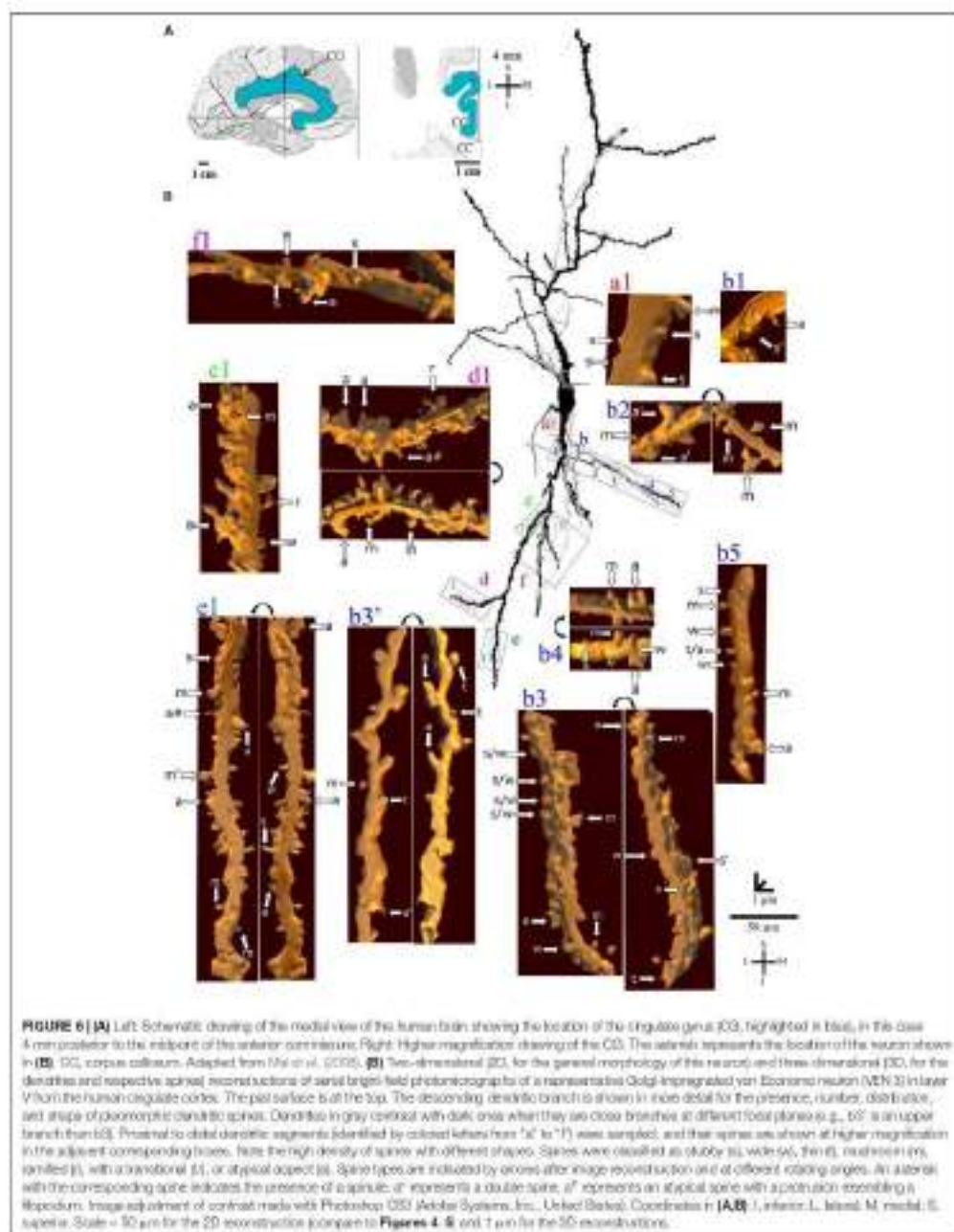
**FIGURE 3** | Human postmortem Golgi-impregnated von Eschscholtz neurons (VENs) in the cingulate cortex as observed in bright field microscopy (A) Cell body aspect of VENs exhibiting a spindle-shaped soma with vertically oriented main primary dendritic shafts. (B–D) Golgi-impregnated VENs partially showing the dendritic configuration and spatial orientation. These VENs are shown reconstructed in Figures 4–6 and Supplementary Videos 1–3. Dendritic spines are not quite visible at this magnification. Image adjustment of contrast and brightness made with Photoshop® CS3 (Adobe Systems, Inc., United States).

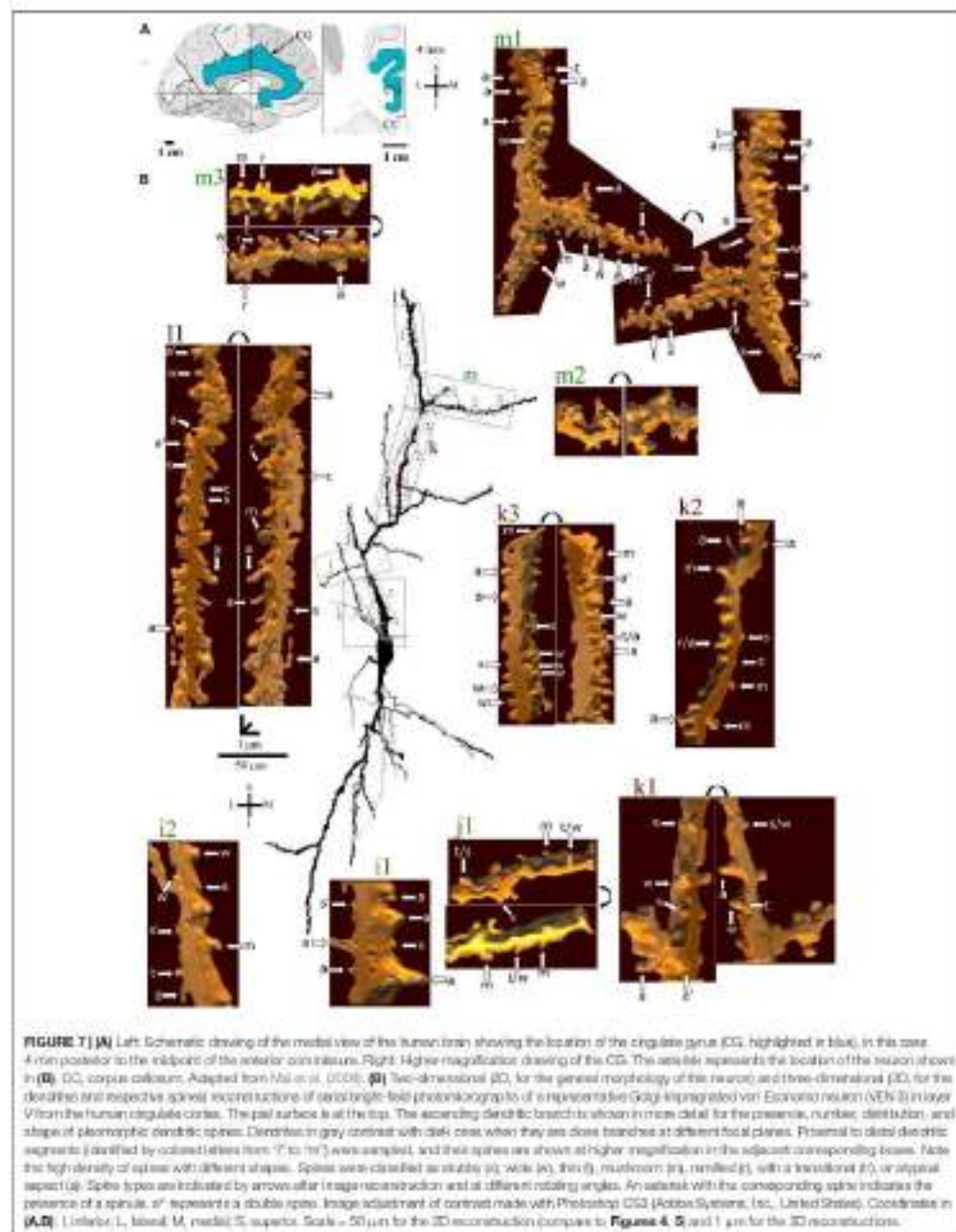
The number of collateral branches is more numerous than VEN 1 but is still limited. The proximal dendritic shafts characteristically show an absence or few spines (Figures 5a1–3,b1,b2,c1,c2) usually with stubby and wide (Figures 5a3,b1,b2) or atypical shapes (Figures 5c1,c2). The presence of intermingled mushroom spines increases in main shaft dendrites from proximal to distal segments (Figures 5c3,d2,h1,j1). This also occurs for transitional/atypical spines (Figures 5c1,c3,e1,h2). Various large stubby or wide spines were found (Figures 5g1,h1–3). Some ramified spines were observed (Figures 5f2,h2,j1). Spinules were present in different spine types (Figures 5c3,d2,e1,j1). An example of VEN 2 after 3D reconstruction is shown in Supplementary Video 2.

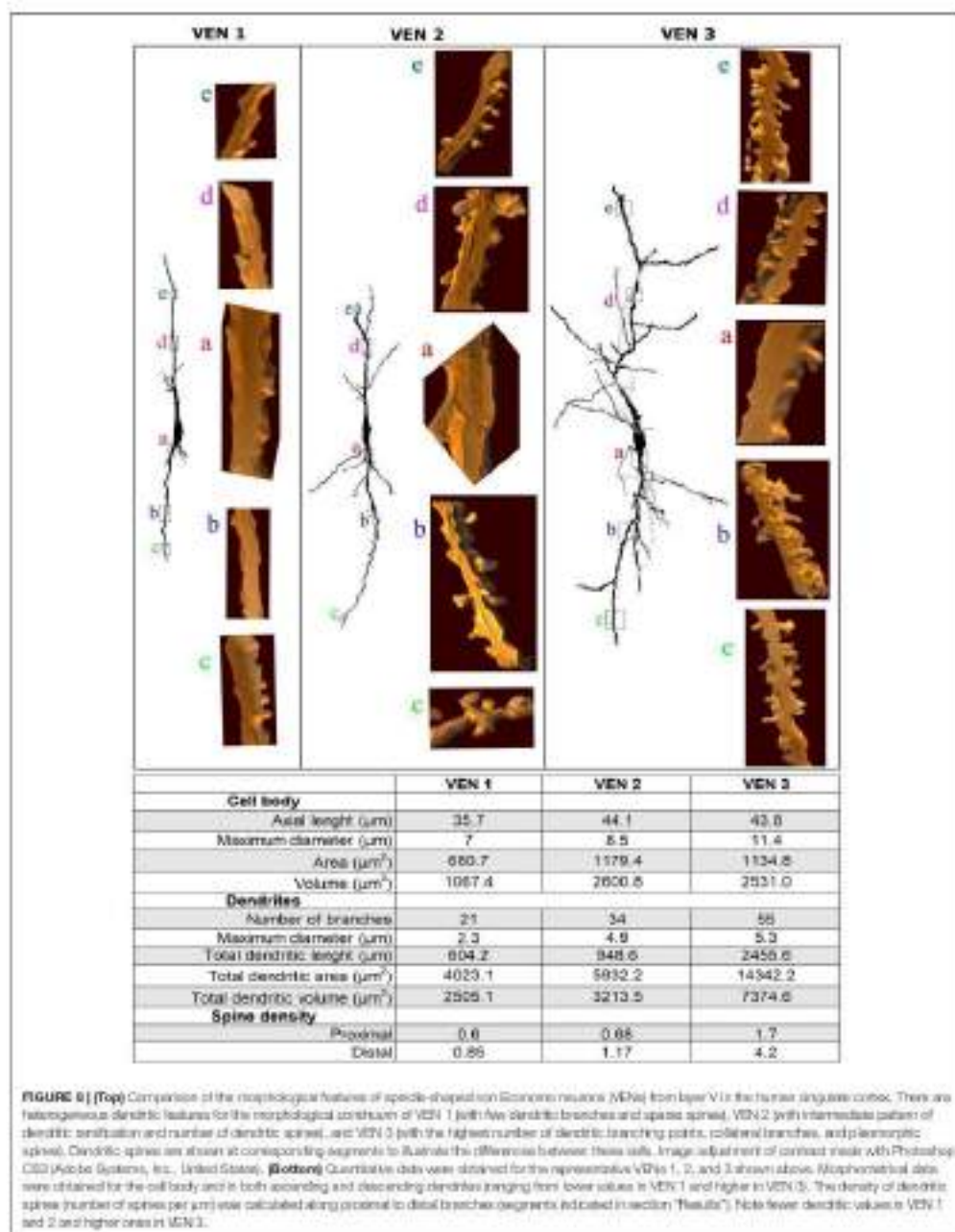
VEN 3 displays both high arborization and density of intermingled pleomorphic dendritic spines in main shafts and collateral branches (Figures 6, 7 for the descending and











ascending dendrites, respectively). The branching pattern is more profuse and begins close to the cell body in proximal thick branches. Main dendritic shafts maintain the vertical orientation for the ascending and descending branches, whereas the collateral dendrites ramify at different radial angles, including some in a horizontal position (Figures 6, 7). Primary dendrites have various spines, including stubby and wide ones, many atypical aspects, or mushroom shape (Figures 6a1,b1, 7i1,i2), a pattern that also occurs in collateral branches (Figures 6b3-b5, 7j1). The number of pleomorphic dendritic spines increases in intermediate (Figures 6c1, 7k2,k3) and distal segments (Figures 6d1,d1, 7m1-3,j1). There is a myriad of intermingled spines of all sizes and types, i.e., stubby, wide, thin, mushroom, ramified, with transitional shapes, many atypical and complex multimorphic aspects (Figures 6a-h, 7e-n), such as double spines (Figures 6b3,d1, 7m1), and a protrusion resembling a Hopodium (Figure 6e1). Pleomorphic spines are found apical from each other (Figures 6a1,b1,b3/d1, 7k2,j1,k1) or, more usually, in clusters along different parts of the same dendritic branch (Figures 6c1,d1, 7k3,m1,j1). Spinules were found in different spine types, such as in stubby (Figures 6b1,b3, 7i2), mushroom (Figure 6e1), and atypical spines (Figures 6b5, 7k1,k3,j1). An example of VEN 3 after 3D reconstruction is shown in Supplementary Video 3.

The heterogeneity for layer V VENs in the human CC is also exemplified by morphometric data of the cell body and spiny dendrites. All VENs have a spindle-like cell body and close values of somatic longitudinal axis length. The number of branches and total dendritic length as well as the density of proximal and distal spines are more abundant in VEN 3 (Figure 8).

## DISCUSSION

Golgi-impregnated VENs show a morphological continuum of dendritic and spine features in the human CC. The heterogeneity ranges from few dendritic branches in the main ascending and descending dendritic shafts to a higher arborization with many collateral branches. Differences also occur for the number, shape, and clustering of dendritic spines from proximal to distal segments. Our results add to the characterization of human CC VENs and have likely implications for the synaptic processing in these cells.

### Morphological Implications

First, there are some inherent difficulties for the study of the human postmortem brain tissue that contrast with quickly fixed tissue samples from other species, including anoxic and autolytic disturbances beyond control. However, we do not have evidence to support that VENs 1 and 2 are artifacts of a worst Golgi impregnation of the more complex VENs 3. Nor was the case for the previously published data showing similar VENs 1 in the human ACC (Watson et al., 2006). Axons are not usually visible using the present Golgi technique. This might be due to an insulating myelin sheath that precludes their silver impregnation. Alternatively, axons might not be arising exclusively from the cell body and it might not be easy to identify their emergence

in dendrites. It is also worth mentioning that the Golgi method randomly impregnates a few cells at each time per studied sample. This precluded further comparisons of the number of VENs and the dendritic spine density in each one of these VENs along with the human lifespan, the likely interindividual variability, or the existence of sex differences in our available samples. These are possibilities open to being investigated in future research (see also Mann et al., 2011).

The present Golgi data expanded the Nissl staining characterization of VENs by providing additional features and the heterogeneity of spiny dendrites in this particular population of neurons. Our data are discussed in the context of the current morphological description of the human VENs. The referential work of Nimchinsky et al. (1995) depicted VENs with closely related cell body shapes but with a certain degree of variation in the CC. Accordingly, a neuron "was considered a spindle cell on Nissl-stained material if it had an ovoid nucleus... and if it had a basal dendrite that was at least as thick as its apical dendrite... spindle neurons were readily distinguishable from pyramidal neurons and exhibited a variety of morphologies. Some were very slender and elongate, with apical and basal dendrites nearly as thick as the soma at its widest point. Others were shorter, more stout, and usually curved. Occasionally, neurons were encountered with a bifid basal dendrite or a third major dendrite emerging from the soma. In addition, lipofuscin deposits were common and were occasionally so large that they distorted the shape of an otherwise very slender neuron... Although only neurons with a truly spindle-like morphology were considered for this study, it is probable that these represent one end of a spectrum ranging in morphology from the classical pyramid to the most narrow spindle cell. The significance of this cellular variability is not clear, but it might be related to the cytoarchitectonic variability in this region..." (Nimchinsky et al., 1995). We agree with this description. The same possibility for the morphological feature variability of the VEN dendrites and spines was tested here.

VENs would be a subpopulation of pyramidal neurons or "modified pyramidal neurons" (MPN) (Nimchinsky et al., 1995; González-Acosta et al., 2014). Brink (1979) considered layer Vb "slender pyramids or spindles" as MPN in the class of primitively organized Betz-cells in the anterogranular region of the human telencephalon. Barakov et al. (2019) defined "VENs on Golgi staining as a neuron with the following morphological features: an elongated, stick-like cell body gradually continuing into thick apical and basal stem, a brush-like basal stem arborization and an axon origin distant from the cell body." These authors studied cells in the deep part of layer V and, additionally, in the upper part of layer VI in the human left ACC. Accordingly, other local MPN named "bipolar cells" (although with two primary dendrites, i.e., as multipolar neurons) show an oval soma that is "difficult to distinguish from smaller oval VENs based on the cell body and proximal dendritic morphology... However, ... on bipolar modified pyramidal neurons, the prominent basal dendrite is longer, and its thickness decreases gradually without terminal brush-like branching" (Zemirac et al., 2019). It is still debatable how a "bipolar MPN" with a close fusiform cell body might differ completely from layer V VENs.

It is worth noting that different nomenclatures would lead to discrepancies in the study of the same nerve cell. For example, Ramón y Cajal (1909–1911) described the morphology of “giant fusiform cells” in the human cingulate gyrus inner “large pyramidal and giant fusiform cell layer” close to “a deep medium-sized pyramidal cell layer.” These “fusiform cells have two dendrites, one of which is very long and seems to ascend to layer 1, whereas the other is sometimes rather long and descends before dividing at acute angles into a number of branches.” This description of giant fusiform cells close to large pyramidal neurons resembles that of layer V VENs at the same time that differs from small fusiform neurons in the inner layer VI (Nimchinsky et al., 1999). On the other hand, although showing a heterogeneous dendritic branching pattern, CC VENs are cells whose morphological aspect could be separated from other populations of cortical MPNs. No image for the various cortical MPNs corresponds exactly to the VENs in layer V as presented here (compared to Figure 2 in Brak, 1986; Figure 6 in Brak and Brak, 1985). These MPNs “deviate substantially from stereotypical pyramidal cells” to include cells with variations in their cellular processes, i.e., the apical dendrite is only a short and very thin process, basal dendrites that do not always have the same diameter and length, and, sometimes, one basal dendrite may be particularly thick and extend in various directions, or cells with various dendrites generated from the lateral surfaces of the soma (Brak, 1986; Brak and Brak, 1985). For example, MPNs from the multi-form layer VI of the isocortex emit only two stout dendrites, “one of them is oriented perpendicular to the cortical surface, the other runs in various directions. These cells are therefore referred to as “a pair of compass cells”...with two main dendrites disposed at different angles to each other... The formation of only two main dendrites gives the cell body a triangular or rhombic contour...” (Brak, 1986). The morphological descriptions of MPNs contrast with those for VENs in layer V, their size, and aspects of the cell body shape as well as the orientation and length of the two main primary dendrite shafts.

The criteria for classifying Golgi-impregnated neurons specifically as VENs by Watson et al. (2006) were “an elongated, large soma in layer 5 of the FI or ACC, a prominent basal dendrite, and symmetrical morphology along the horizontal and vertical axes of the cell...” In this regard, there are 29 human neurons labeled as VENs available at the open database “NeuroMorpho.Org” (version 7.8, released 08/19/2019, content: 112244 neurons). Nine of these reconstructed neurons were from the ACC, and 20 others were from the FI. Three of them show a clear “brush-like” basal dendrite, but 26 others do not display that clearly. No VEN specifically in the ACC shows a prominent brush-like basal dendritic branching in this above-mentioned sample. We are thus led to consider that “brush-like” basal dendrites of VENs is one of the possible morphological features for VENs, but it might not be the unique morphological feature for the descending branches. Here, although VEN 3 shows the “brush-like basal stem arborization,” the examples of VENs 1 and 2 do not have the same specific “brush-like” basal dendrites

<sup>3</sup><http://neuro-morpho.org>

(Figure 8). Otherwise, from the continuous of heterogenic shapes of VENs available at NeuroMorpho.org, it would be assumed that 25, 4, and 2 neurons would be VENs 1, 2, and 3, respectively, with similar characteristics as reported here.

## Functional Implications

The human CC VENs compose a salience-detection/attentional frontoparietal network, which may modulate complex function of self-awareness and social interpersonal relationships (Cauda et al., 2013, 2014 and references therein). These VEN functional properties rely on the features of dendritic branches and spines for proper synaptic integration, strength, and plasticity. Yang et al. (2019) combined laser-capture microdissection with RNA sequencing and described the transcriptomic profile of VENs from the human ACC. These authors used pyramidal neurons as reference cells and found 344 genes with VEN-associated expression differences related to morphogenesis, including dendrite branching and axon myelination, and human social-emotional disorders (Yang et al., 2019). The laminar distribution of synapses in the human CC suggests that VENs may be modulated by different neurotransmitters. For example, the cells in layer Vb show moderate to high expression of glutamate AMPA, NMDA, kainate, and mGluR2/3 excitatory receptors; GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> inhibitory receptors; adenosine A1 inhibitory receptors; acetylcholine M1 and M3 excitatory receptors, and M2 inhibitory ones; dopamine D1 excitatory receptor; serotonin 2 excitatory receptor; and noradrenaline/adrenaline/α1 excitatory and α2 inhibitory receptors (Palomero-Gallagher and Zilles, 2017). Specifically, VENs in the ACC have dopamine D3 and D5 receptors, serotonin-1b and -1b receptors (Watson, 2006), GABA receptor subunit β, and adrenoceptor α-1A (Tajkoti et al., 2018). Human VENs also characteristically express the activating transcription factor 5 of the CREB protein family likely involved in stress responses and pain sensitivity; interleukin-4 receptor alpha chain linked to inflammatory and allergic reactions; and neurexin 8 related to the digestive homeostatic integration, appetite control, gut feelings, and the modulation of appetite with a possible connection of interoception/visceral states with social awareness (Alhassan et al., 2010; Stimpson et al., 2011; Kaghani et al., 2015). Few human VENs express markers associated with callosal or corticostriatal projections; rather, they prominently express transcription factors of subcortical projection FEZF2 and CTIP2, which may reach parasympathetic/sympathetic control sites (Cohen and Sesay, 2015). Respectively, the left and the right ACC have been involved with parasympathetic- and sympathetic-associated emotions (Craig, 2003; Canda et al., 2014; Gos et al., 2016). Our presently described CC VENs could be tested for these neurochemical and functional profiles and compared to other previous data on VENs and MPNs (e.g., Watson et al., 2006; Baronec et al., 2019). Indeed, the “single-section” Golgi method used here was originally developed in rats to be combined with a variety of histochemical procedures (Gibbett and Somogyi, 1984; adapted for humans by Dell’Oglio et al., 2016; but see also Saper, 2003; Zeki et al., 2008).

Human VENs might be considered computationally simple compared to cortical pyramidal neurons, receiving few inputs

within individual mini-columns, and likely providing a rapid cortical radial signal transmission (Watson et al., 2006). The aspect of VENs 3, with more dendrites and spines than VENs 1, adds a high level of complexity to this field. More dendrites and varied spines can greatly enhance the computational power of neurons (Spruston et al., 2013; Brunel et al., 2014; Rollenhagen and Lübke, 2016). The use of theoretical models to simulate the electrophysiological dynamics of the heterogeneous human neurons is an alternative to presume the functions of VENs 1–3 at this moment (Brunel et al., 2014). In this regard, the geometry and the functional properties of more branched dendrites affect the linear and non-linear neuronal processing of information (Oakley et al., 2001; Spruston et al., 2013; Brunel et al., 2014; Rollenhagen and Lübke, 2016). Neocortical dendrites in humans can also have distinctive biophysical properties for signal processing that can enhance both synaptic charge transfer from dendrites to soma and spike propagation along the axon (Eyal et al., 2016). In addition, the spine activity-driven changes related to synaptic demand, stability, and plasticity can show region-specific and neuron-specific characteristics (Chen et al., 2011; Dall'Oglio et al., 2013; Berry and Nishii, 2017; Nakahara and Yasuda, 2018). Spines of different shapes and sizes differ in the membrane surface available for different receptors and their trafficking, the local electrical and biochemical compartmentalization, the degree of cooperativity between adjacent spines, and/or the capacity to dispense second messengers into the parent dendrite. That is, spines can control signaling mechanisms at individual synapses (Bourne and Harris, 2008; Chen et al., 2011; Brusco et al., 2018). In prefrontal pyramidal neurons, the density of dendritic spines shows a developmental pruning and dynamic remodeling in each phase of the human lifespan, becoming more stable afterward (Pezanek et al., 2011). All these mentioned features of dendritic spines are open avenues for further studies on the morphological and functional interplay of human VENs.

The impact of the structure and the functions of the different spine shapes (stubby/wide, thin, mushroom, ramified, or transitional/typical) for the fine-tuned synaptic processing were depicted elsewhere (Azeilani et al., 2007a; Rochefort and Konnerth, 2012; Yuste, 2013; Stewart et al., 2014; Dall'Oglio et al., 2015; Tamminen and Nägerl, 2016; Lu and Zuo, 2017; Nakahara and Yasuda, 2018). Large dendritic spines usually are more stable, have a large postsynaptic density, and make strong connections, whereas small spines can be rather transient (Woolfrey and Sawatsky, 2014) and/or indicative of connections with a lower resistance to reach the parent dendrite (Segal, 2010). Different spine types were observed along the VEN dendrites. Spines ranged from few spines in dendrites of VENs 1 to a high number of clustered spines of varied shapes and sizes along the dendritic branches of VENs 3. Clustered dendritic spines can modulate the cooperative interaction between neighboring synapses (Yadav et al., 2012) and the network function, thus influencing storage capacity, learning, and memory (Erisk et al., 2018). Tiny protrusions identified as spinules were also reliably observed in different Golgi-impregnated spine types in the human ACC. Spinules are functional elements that

modulate cellular trans-endocytosis (Spaack and Harris, 2009), representing additional possibilities for neuronal plasticity (Tao-Cheng et al., 2009), even as active zone-free invaginating structures (see further data in Petralia et al., 2018). Therefore, the morphological features of VENs 1–3 are suggestive of different properties for spatial and temporal synaptic processing regulated at every spine/dendritic segment. This would provide additional emergent properties for neural circuitries integrated for complex human information processing, as occurs in the human prefrontal cortex (Pezanek et al., 2011) and for the CC roles on attention, emotion, visceral responses, consciousness, social judgments, cognition, and adaptive behaviors (Allman et al., 2001, 2011a; Butti et al., 2013; Cauda et al., 2013, 2014; Raghanti et al., 2015; Vogt, 2015). However, it is also important to consider that the dendritic spine-free zone of cortical pyramidal neurons develops late in phylogenesis and ontogenesis (Brink, 1985), which suggest particularities and specializations for the excitatory and inhibitory synaptic processing along the dendritic segments of neurons with more or less spines (Peters et al., 1991; Spruston, 2008; Chen et al., 2011; Spruston et al., 2013; Dall'Oglio et al., 2015).

The development of specialized VENs can also bring about intrinsic vulnerabilities (Allman et al., 2001; Butti et al., 2013; Cauda et al., 2014). Proteomic analysis indicated that cytoskeletal dysfunction can be considered an important component of the neuropathology of the major psychiatric disorders involving the human ACC (Bensley et al., 2006). The ACC neurons – specifically the VENs in some cases – are more vulnerable and damaged in cases of the behavioral variant of the frontotemporal dementia and hindered social-emotional functions (Kim et al., 2012; Gurev-Polil et al., 2019; Liu et al., 2019); schizophrenia (Krause et al., 2017); suicide in victims with psychotic disorders (Berme et al., 2011); deficits in understanding non-literal language, humor, and scenes of social interactions related to partial or complete agenesis of the corpus callosum, the autism spectrum and bipolar disorders (Raghanti et al., 2013 and references therein); Alzheimer's disease (Geßen et al., 2018); altered cardiac vagal tone (Guo et al., 2016); and self-conscious emotional reactivity (Stamm et al., 2013). When further studying VEN shapes and their normal or altered functioning in brain circuitries, it is also important to consider the "... great possibility that interaction between psycho-social environments during brain development results in interindividual differences in brain structure observed later in adult human" (Zebis et al., 2008).

## CONCLUSION

The human CC shows a continuum of morphological features involving the architecture of dendrites and spines of layer V VENs. Our data add to previous morphological studies on the local cytoarchitectonic organization and propose additional functional possibilities for these neurons. The heterogeneity of VENs in the human CC encourages further studies on how these specialized neurons evolved phylogenetically and develop ontogenetically to provide neural

computations that, within various neural networks, enhance the complexity and integrate the information processing in the human brain.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/Supplementary Material. Data are public at figshare.com using doi: 10.6084/m9.figshare.11368076.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by The Brazilian Ethics Committee from the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA; 862336.118.6.9000.5343 and 18718719.7.0090.5345). The patients' next of kin provided written informed consent for brain donation for use in this study. Written, informed consent was obtained from the individuals' next of kin for the publication of any potentially identifiable data included in this article.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

NC-J, JR, FF-V, AH, and AR-E: study concept and design, acquisition of data, and elaboration of the manuscript. NC-J and AR-E: two-dimensional reconstructions. JR and AR-E: three-dimensional reconstructions. NC-J, JR, FF-V, and AR-E: interpretation of data. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## REFERENCES

- Alkawi, F. M., Häkern, A., Erwin, J. M., Nitschinsky, L., and Thal, P. (2001). The anterior cingulate cortex: The evolution of an interface between emotion and cognition. *Ann. New York Acad. Sci.* 935, 107–117. doi: 10.1111/j.1749-8652.2001.tb04078.x
- Alkawi, F. M., Tetsuka, N. A., Häkern, A. E., Maruy, K. E., Somsakulrat, K., Erwin, J. M., et al. (2018). The von Eschenro neurons in frontolateral and anterior cingulate cortex in great apes and humans. *Brain Struct. Funct.* 214, 495–517. doi: 10.1007/s00429-018-0234-9
- Alkawi, F. M., Tetsuka, N. A., Häkern, A. E., Maruy, K. E., Somsakulrat, K., Erwin, J. M., et al. (2019). The von Eschenro neurons in the frontolateral and anterior cingulate cortex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1220, 39–71. doi: 10.1111/j.1749-8652.2019.06811.x
- Alkawi, F. M., Tetsuka, N. A., Häkern, A. E., and Park, S. (2016). The von Eschenro neurons in apes and humans. *Am. J. Phys. Anthropol.* 140, 5–21. doi: 10.1002/ajpa.22156
- Andreasen, J. L., Børveides-Pedersen, B., DeFelipe, J., and Yuste, R. (2015). Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphology. *Front. Neurosci.* 9:111–145. doi: 10.3389/fnro.2015.01111.2015
- Andreasen, J. L., Espinos, A., Festré, A., Yuste, R., and DeFelipe, J. (2007). Non-synaptic dendritic spines in association. *Neuroscience* 145, 444–469. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.12.013
- Baccaro, I., Sedmak, D., Dujin, D., Jilkaev, D., Ivanov-Milosevic, M., Rubin, M. R., et al. (2018). Somato-dendritic morphology and axon origin site specify von Eschenro neurons as a subclass of modified pyramidal neurons in the human anterior cingulate cortex. *J. Anat.* 220, 651–660. doi: 10.1111/joa.13668

## FUNDING

This work was supported by the grants from the Brazilian Agencies CAPES and CNPq (Brazilian Ministry of Science Technology and Innovation) "ERED" (Grant Awards Nos. 481592/2010-3 and 306594/2014-1), SCR\_002876.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thankful to M.Sc. Roman Reberger (Germany) and Dr. Claudio B. Jung (UFMG, Brazil) for their efforts during the original development of the algorithm for 3D reconstruction of dendritic spines. We also thank due to Dr. Lucila L. Gutierrez (UFCSA, Brazil) for her participation in the first Golgi experiments.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnry.2020.00025/full#supplementary-material>

**VIDEO 01** | Three-dimensional reconstruction of layer V Golgi-impregnated VGLUT1 from the human orbitofrontal cortex.

**VIDEO 02** | Three-dimensional reconstruction of layer V Golgi-impregnated VGLUT2 from the human orbitofrontal cortex.

**VIDEO 03** | Three-dimensional reconstruction of layer V Golgi-impregnated VGLUT3 from the human orbitofrontal cortex.

- Basley, C. L., Pennington, K., Bokun, A., Wolt, R., Dixon, M. J., and Carter, D. (2006). Postnatal analysis of the anterior cingulate cortex in the major psychiatric disorders: evidence for disease-associated changes. *Neurosci.* 6, 3414–3423. doi: 10.1092/psyc.20060068
- Beyl, K. P., and Nedivi, E. (2017). Spine dynamics: are they all the same? *Neuron* 96, 43–55. doi: 10.1016/j.neuron.2017.08.038
- Bonini, J. N., and Harris, E. M. (2006). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Ann. Rev. Neurosci.* 31, 47–67. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.090307.123646
- Brak, H. (1979). Pigment architecture of the human telencephalic cortex. V. Region anteromedialis. *Cell Tissue Res.* 204, 401–431. doi: 10.1007/bf01225035
- Brak, H. (1980). *Anatomical Atlas of the Human Telencephalic Cortex*. Berlin: Springer-Verlag.
- Brak, H., and Brak, E. (1993). Golgi preparations as a tool in neuropathology: with particular reference to investigations of the human telencephalic cortex. *Prog. Neurobiol.* 25, 93–139. doi: 10.1016/0304-0040(93)90003-2
- Brown, M., Schöhl, A., Kawan, B., Fuentetaja, P. M., Dornstetler, E., Juckel, G., et al. (2011). Neuroanatomical correlates of suicide in psychosis: the possible role of von Eschenro neurons. *Mol. Brain* 2016. doi: 10.1177/1073900016020099
- Buzsáki, G., Hübner, V., and Richardson, M. J. B. (2014). Single neuron dynamics and computation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 25, 149–173.
- Buzsáki, G., DeFelipe, J., Körbe, L. B., Buzsáki, M. A., Moreno, J. E., and Buzsáki, A. A. (2010). Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial amygdala. *Neurosci. Lett.* 480, 152–156. doi: 10.1016/j.neulet.2010.07.083
- Buzsáki, G., Mészáros, S., Körbe, L. T., Petruska, R. S., Kádár, B., Buzsáki, A. A., et al. (2014). Multitiered and multisynaptic spines, and hemispherical synaptic

- specialization in the prefrontal medial amygdala of male and female rats. *J Comp Neurol* 522, 2073–2088. doi: 10.1002/cne.23518
- Fari, C., Sartori, M., Uppel, N., and Hof, P. R. (2015). von Economo neurons: clinical and evolutionary perspectives. *Cortex* 61, 312–326. doi: 10.1016/j.cortex.2014.10.004
- Garrabta, E. B. G., Meiri, G., Fiaschi, E. M., Loureiro, F., and Gomes, I. (2011). Características morfológicas das neuróns complexas e reduzidas do EGOEDE-IR no córtex da ínsula medial e cingulatória. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.* 18, 715–723. doi: 10.1590/S1809-9823.2013.04054
- Gesche, F., Trevis, D. M. E., Soares, K., D'Agostini, F., Costa, E., Dias, S., et al. (2011). Functional anatomy of cortical areas characterized by Von Economo neurons. *Brain Struct Funct* 218, 1–18. doi: 10.1007/s00429-011-0380-9
- Gesche, F., Gammann, U. C., and Veitsh, A. (2014). Evolutionary appearance of von Economo's neurons in the mammalian cerebral cortex. *Evol. Brain Neurosci* 8:104. doi: 10.3389/ebn.2014.00104
- Chen, X., Leinders-Zufall, U., Rochefort, N. L., Nölken, I., and Konnerth, A. (2011). Functional mapping of single spines in cortical neurons in vivo. *Nature* 475, 301–305. doi: 10.1038/nature10195
- Cohen, I., and Soltesy, W. W. (2015). Human von Economo neurons express transcription factors associated with Layer V subcerebral projection neurons. *Cereb. Cortex* 25, 213–228. doi: 10.1093/cercor/bhu219
- Craig, A. D. (2002). How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat Rev Neurosci* 3, 657–666. doi: 10.1038/15904
- Craig, A. D. (2005). Embodiment: emotional experience: a neurocognitive basis? *Trends Cogn. Sci* 9, 566–571. doi: 10.1016/j.tics.2005.10.005
- Delgado, A., Datta, A. C., Moreira, F. E., and Rasin-Filho, A. A. (2015). The human medial amygdala: structure, diversity, and complexity of dendritic spines. *J. Anat.* 227, 440–459. doi: 10.1111/joa.12338
- Delgado, A., Barros, D., Barros, J., Moreira, F. E., and Rasin-Filho, A. A. (2014). The "single-section" Golgi method adapted for formalin-fixed human brain and light microscopy. *J. Neurosci. Methods* 249, 35–55. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.03.024
- Delgado, A., Xavier, L. L., Hilbig, A., Forno, D., Moreira, F. E., Achard, M., et al. (2013). Cellular components of the human medial amygdala nucleus. *J Comp Neurol* 525, 569–611. doi: 10.1002/cne.23192
- Dilotta, A. A., Liu, L. C., Natta, A. L., Gao, X. E., and Soltesy, W. W. (2014). von Economo neurons and fork cells: a neurochemical signature linked to nociceptive function. *Cereb. Cortex* 28, 131–144. doi: 10.1093/cercor/bht258
- Eyal, G., Verhugge, M. B., Teza-Silva, G., Denzler, T., Ladditt, J. C., Benridha-Placiano, R., et al. (2014). Unique membrane properties and enhanced signal processing in human neocortical neurons. *eLife* 3:e01553. doi: 10.7554/eLife.01553
- Fariñas, C., Suárez, M. I., Barrios, E., Arévalo, G., Urbánik, J., Casanova, M. E., et al. (2008). von Economo neurons are present in the dorsolateral (hypocampal) prefrontal cortex of humans. *Neurosci. Lett.* 435, 215–218. doi: 10.1016/j.neulet.2008.02.040
- Feldman, M. L. (1986). "Morphology of the neocortical pyramidal neuron," in *Cerebral Cortex*, eds E. G. Jones and A. Peters. (New York, NY: Plenum Press), 407–421.
- Fiala, J. C., and Harris, K. M. (1999). "Dendritic structure," in *Dendrites*, eds G. Harris, N. Spruston, and M. Hübner. (New York, NY: Oxford University Press), 1–24.
- Fiala, J. C., Sprack, L., and Harris, K. M. (2002). Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Anat. Rec.* 38, 29–54. doi: 10.1002/ar.b.10156
- Funk, A. C., Huang, S., Zhou, M., Gidyczka, A., Kastellakis, G., Silva, T. K., et al. (2016). Elongation of dendritic spine necks facilitates clustered spine addition and learning and memory. *Nat. Commun.* 7:122. doi: 10.1038/ncom1467-017-02751-2
- Gabbott, P. L., Jays, P. R., and Sievick, S. I. (1987). Calretinin neurons in human medial prefrontal cortex (*area 24b*). *J. Comp. Neurol.* 263, 389–410. doi: 10.1002/cne.10186-9861198705193814-389and-410:330a3-4
- Gabbott, P. L., and Sievick, S. I. (1986). The "single-section" Golgi-impregnation procedure: methodology of description. *J. Neurosci. Methods* 11, 221–231. doi: 10.1016/0165-0278(84)90064-0
- Gesche, F., van Dijk, L., van Swieten, J. C., Pijnenburg, Y. A. L., Nethersheim, B., Bark, R., et al. (2015). Von Economo neurons are part of a larger neuronal population that are selectively vulnerable in C9orf72 frontotemporal dementia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 45, 671–688. doi: 10.1111/nao.12299
- Gesche, F., Papapanou, S. Y., Reveniot, A., Bigos, E. H., Westmans, S., Rogalski, E., et al. (2018). Von Economo neurons of the anterior cingulate across the lifespan and in Alzheimer's disease. *Cortex* 95, 69–77. doi: 10.1016/j.cortex.2017.10.025
- Gleason, M. F., Goshen, T. S., Robinson, E. C., Huelke, C. D., Harwell, J., Woods, E., et al. (2016). A multi-modal parcellation of human cerebral cortex. *Nature* 538, 171–178.
- Goebel-Ross, C. A., Escobar, M. I., Casanova, M. E., Faraone, H. J., and Bartnik, B. (2016). Von Economo neurons in the human medial frontopolar cortex. *Front. Neuroanat.* 10:64. doi: 10.3389/fnana.2016.00064
- Goñales-Ramirez, M. M., Velázquez-Santosa, D. A., Olfers-Correa, M. E., and González-Burgos, I. (2016). Changes in the plastic properties of hippocampal dendritic spines underlie the attenuation of place learning in healthy aged rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 139, 84–93. doi: 10.1016/j.nlm.2015.11.017
- Gou, C. C., Saura, V. E., Zhou, F., Gerschlager, W. R., Trullier, A. J., Hou, A. Y., et al. (2016). Disrupted transsynaptic lateralization of cortical postsynaptic control is revealed by frontotemporal dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E2436–E2439.
- Hayashi-Taniguchi, A., Yoshida, S., Nakamura, M., Shirai, F., Wu, Y. T., Imabayashi, A. I., et al. (2011). Labeling and optical imaging of synaptic sensory inputs in the motor cortex. *Nature* 475, 133–138. doi: 10.1038/nature10527
- Herron, J., and Dworkin, M. M. (2014). Dendritic spine pathology in neurodegenerative diseases. *Anat. Rec. Part B* 31, 221–230. doi: 10.1002/ar.b.12616
- Kim, E. J., Sefik, M., Goto, S. E., Hwang, H. J., Shi, P. R., Miller, R. L., et al. (2012). Selective loss of the neocortical von Economo neuron and fork cell loss in early behavioral variant frontotemporal dementia. *Cereb. Cortex* 22, 251–259. doi: 10.1093/cercor/bhr204
- Koh, R., and Whitlow, J. Q. (2012). *Foundations of Human Neuropsychology*. New York, NY: Worth Publishers.
- Krause, M., Thies, C., and Böhm, M. (2017). Ultrastructural alterations of von Economo neurons in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Anat. Rec.* 300, 2647–2654. doi: 10.1002/ar.a.23625
- Liu, C. C., Noss, A. L., Hupler, M., Pöyry, J. L., Gao, X. E., Sprack, L., et al. (2015). Prefrontal spine aggregation in von Economo neurons and fork cells in frontotemporal lobar degeneration with specific MAFF variants. *Anat. Neurobiol. Cognosci.* 7:154.
- Lu, J., and Zhao, Y. (2017). Clustered structure and functional plasticity of dendritic spines. *Brain Res Bull.* 138, 18–22. doi: 10.1016/j.brainbull.2016.09.008
- Mai, J. K., Paxinos, G., and Voss, T. (2008). *Atlas of the Human Brain*. New York, NY: Academic Press.
- Mann, S. L., Blitzer, E. A., Byne, W., Hol, F. R., Balabanian, M. S., Cohen, B. H., et al. (2011). Anterior and posterior cingulate cortex volume in healthy adults: effects of aging and gender differences. *Brain Res.* 1401, 18–25. doi: 10.1016/j.brainres.2011.05.030
- Myatt, D. H., Hallgrímsson, T., Jacob, G. A., and Naito, S. I. (2012). Neuroanatomic - from semi-automated to semi-automatic reconstruction of neuron morphology. *Front. Neuroinform.* 6:8. doi: 10.3389/fninf.2012.00008
- Nakahata, Y., and Yasuda, H. (2016). Plasticity of spine structure: local signaling, translation and cytoskeletal reorganization. *Front. Synaptic Neurosci.* 18:29. doi: 10.3389/fninf.2016.00029
- Ney, E. H., Fonseca, M. E., Gesche, A. C. B., Oliveira, P. H., Hilbig, A., and Fernandez, L. L. (2017). Neuropathological findings in cerebral cortex of subjects aged 30 years or older and their correlation with dementia in a sample from Southern Brazil. *Dem. Neurobiol.* 11, 24–35. doi: 10.1580/1948-5742.2016.11.02405
- Neuroanatomy, B., Vogel, L., and van Hagen, C. (1988). *The Human Central Nervous System*. Berlin: Springer-Verlag.
- Nitsch-Runkel, E. A., Gilman, E., Allen, J. M., Ford, D. P., Evans, J. M., and Hof, P. R. (1995). A neuronal morphology type unique to humans and great apes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3268–3273. doi: 10.1073/pnas.92.9.3268
- Nitsch-Runkel, E. A., Vogt, B. A., Morrison, J. H., and Hof, P. R. (1995). Spindle neurons of the human anterior cingulate cortex. *J. Comp. Neurol.* 355, 27–37.

- Oskley, J. C., Scherwin, F. G., and Coill, W. L. (2005). Dendritic column spines in layer 3 pyramidal neurons amplify and limit transmission of ligand-gated dendritic current to soma. *J. Neurophysiol.* 93, 514–527. doi: 10.1152/jn.2005.93.1.514
- Pelkewitz-Gallagher, N., and Zilles, K. (2017). Cortical layers: Cyto-, morpho-, receptor- and synaptic architecture in human cerebral cortex. *NeuroImage* 150: 815–8082–8099. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.08.030
- Purdon, D. N., Schatz, B., Petrides, M., and Cipolletti, P. B. (2015). *Cerebral Cortex – Architecture, Connections, and the Dual Origin Concept*. New York, NY: Oxford University Press.
- Ravish, K., and Ascoli, G. A. (2015). Neuronal morphology goes digital: a research tool for cellular and systems neuroscience. *Neuron* 77, 1047–1048. doi: 10.1016/j.neuron.2014.11.008
- Reuter, P., Gohel, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J. E., and Woolsey, K. M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Neurosci.* 16, 285–293. doi: 10.1002/ana.2291
- Praschke, Z., Ischi, M., Székely, G., Rosta, M. R., Uyllings, H. K., Rákos, P., et al. (2013). Ultrastructural anatomy of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 13281–13286. doi: 10.1073/pnas.1105940110
- Putz-Anderson, A., and Webster, H. (1991). *The Fine Structure of the Nervous System*. New York, NY: Oxford University Press.
- Rezaei, R. S., Wang, Y. X., Morrison, M. P., and Yao, F. J. (2011). Immunogold structure in mammalian synapses. *Front. Synaptic Neurosci.* 164. doi: 10.3389/fnyn.2011.00010
- Rughani, M. A., Sparlock, L. B., Uppal, N., Sherwood, C. C., Butt, C., and Hof, P. E. (2015). “New Endocrine neurons,” in *Brain Mapping: An Encyclopedic Reference*, eds E. Zilles and K. Amaro (Amsterdam: Elsevier Inc), 81–91.
- Rusakov, D. A. (1989–1991). “Histologic Description: Nervous System: The Vertebrate,” in *Atlas Histology: Textbook in English*, eds Swanson, and Swanson. (New York, NY: Oxford University Press).
- Rusakov, D. A. (1993). An anatomical classification scheme for the basis of their dendritic patterns. *J. Comp. Neurol.* 338, 211–227.
- Rugwala, S., Tobin, M., Bok, D., Butts, J. T., Nikas, D., and Hahn, Y. S. (2017). Spine in a child with anterior cingulate gyrus oligodendroglioma: case report. *Adv. Neurosci.* 32, 279–285. doi: 10.1155/2017/279285
- Ruberg, B., Dal’Oglio, A., Jang, C. R., and Rada-Esteban, A. A. (2006). Structure and diversity of human dendritic spines revealed by a new three-dimensional reconstruction procedure for Golgi staining and light microscopy. *J. Neurosci. Methods* 149, 27–36. doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.09.040
- Ruchoux, S. L., and Krasnow, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Rep.* 13, 699–708. doi: 10.1038/nrn3012102
- Rutherford, A., and Libbe, J. H. R. (2016). “Dendritic filopodia: morphology and chemistry” in *Neuroscience in the 21st Century*, eds D. W. Pfaff and N. D. Yankner. (New York, NY: Springer), 225–264. doi: 10.1007/978-1-4939-3474-1\_11
- Saunders, M. A. S., and Izquierdo, E. A. (2009). Informative questionnaire on cognitive decline in the elderly (IQCODE): adaptation transcultural para uso no Brasil. *Cad. Saude Pub.* 25, 1403–1405. doi: 10.1590/s0102-311x09000700000
- Saper, C. B. (2003). Editorial: an open letter to our readers on the use of antibodies. *J. Comp. Neurol.* 460, 477–478. doi: 10.1002/jcp.20039
- Schmidlin, J., Aguado-Carreras, E., Piro, L., Kaye, V., Longati, M., Petrosch, T., et al. (2012). Eye on open-source platform for biological image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–681. doi: 10.1038/nmeth.2030
- Seaton, R., Polvarinos, S., and Ascoli, G. A. (2008). I-Mosaic: a web-accessible tool for the analysis, comparison and search of digital reconstructions of neuronal morphologies. *Nat. Prot.* 3, 866–874. doi: 10.1038/nprot.2008.31
- Soley, M. W., Merkle, F. Y., Gura, S. E., Ong, A. D., Alkman, J. M., and Hof, P. E. (2012). Distinctive neurons of the anterior cingulate and frontocingular cortex: a historical perspective. *Cereb. Cortex* 22, 245–270. doi: 10.1093/cercor/bhr040
- Segal, M. (2018). Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. *Eur. J. Neurosci.* 31, 2138–2184. doi: 10.1111/ejns.14000
- Speck, L., and Harris, K. M. (2000). Trans-synaptic via spines in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 20, 4255–4260. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4127-00.2004
- Spratson, N. (2009). Pyramidal neuron dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 206–221. doi: 10.1038/nrn2285
- Spratson, N., Hiltzen, M., and Stuart, G. (2012). “Information processing in dendrites and spines,” in *Fundamental Neuroscience*, eds L. E. Squire, D. Berg, E. E. Blom, S. de Lac, A. Ghosh, and S. C. Spitzer. (Oxford: Academic Press), 250–280. doi: 10.1016/b978-0-12-385070-2.00011-1
- Stewart, M. G., Poppe, V. L., Kover, J. V., Medvedev, M., and Davies, H. A. (2014). “Structure and complexity of the synapse and dendritic spine” in *The Synapse*, eds V. Pickett and M. Segal. (New York, NY: Academic Press), 1–28. doi: 10.1056/978-0-12-418475-0-00001-8
- Strassman, C. D., Tetsuda, N. A., Alkman, E. M., Jacobs, B., Butts, C., HeC, P. R., et al. (2011). Biochemical specificity of non-Euclidean neurons in humans. *Am. J. Hum. Biol.* 23, 22–28. doi: 10.1002/ajhb.21113
- Stutz, V. E., Solberger, M., Seebis, W. W., Rankin, K. P., Anker, E. A., Rosen, H. L., et al. (2013). Role of right prefrontal anterior cingulate cortex in self-emotion attentional reactivity. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 8, 408–424. doi: 10.1093/acn/nns023
- Talbot, I., and Tourasson, P. (1993). *Spherically Oriented Cortical Area Analysis: An Atlas of Stereotaxic Anatomical Coordinates for Gray and White Matter*. New York, NY: Thieme Medical Publishers.
- Tao-Cheng, F.-H., Rosenzweig, A., Gallar, P. E., Miles, S., Gähwiler, J. A., Watanabe, C. A., et al. (2006). Rapid turnover of spines at synaptic terminals. *Neuroscience* 140, 42–50. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.02.031
- Taraska, J., and Niggel, V. (2016). Dendritic spines as tunable regulators of synaptic signals. *Front. Behav. Neurosci.* 10, 1–10. doi: 10.3389/fnbeh.2016.01010
- Treisman, L. C. (2009). *von Economo and Kluver’s Atlas of Cytoarchitectonics of the Adult Human Cerebral Cortex*. Basel: Karger.
- Waggon, C. E., Ruberg, B., Dal’Oglio, A., Galagorzo, M. E., and Rada-Esteban, A. A. (2016). Neuronal types of the human cortical amygdaloid nucleus. *J. Comp. Neurol.* 546, 2776–2801. doi: 10.1002/cne.24527
- Vagt, E. A. (2013). “Mapping cingulate subregions,” in *Brain Mapping: An Encyclopedic Reference*, ed. A. W. Toga. (Oxford: Academic Press), 325–339. doi: 10.1016/b978-0-12-385070-2.100230-2
- Watanabe, K. K. (2006). *The von Economo Neurons: From cells to Behavior*. PhD Thesis, California Institute of Technology, Pasadena, CA.
- Watanabe, K. K., Jones, T. S., and Alkman, J. M. (2006). Dendritic architecture of the non-Euclidean neurons. *Neuroscience* 141, 1187–1212. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.04.084
- Woolsey, K. M., and Strassman, D. P. (2006). Control of dendritic spine morphology and functional plasticity by small GTPases. *Neural Plast.* 2005:962598. doi: 10.1155/2016/962598
- Xu, B., Mackie, M. A., Spagnoli, A., Wu, T., Tian, Y., Hof, P. E., et al. (2016). The activation of immature attentional networks. *NeuroImage* 129, 388–398. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.01.027
- Yador, A., Gao, Y. Z., Rodriguez, A., Dickerson, D. L., Warren, S. L., Luebke, J. L., et al. (2012). Morphologic evidence for spatial clustered spines in apical dendrites of monkey neocortical pyramidal cells. *J. Comp. Neurol.* 520, 2888–2902. doi: 10.1002/cne.23079
- Yang, L., Yang, Y., Tian, J., Sun, Y., Shi, L., and Su, E. (2019). Transcriptional landscape of non-Euclidean neurons in human anterior cingulate cortex revealed by microarrayed-cell RNA sequencing. *Cereb. Cortex* 29, 858–871. doi: 10.1093/cercor/bhy186
- Yang, B. (2013). Electrical compartmentalization in dendritic spines. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 128, 429–449. doi: 10.1111/nyas.12002
- Zahn, H., Jovanovic-Milosevic, N., and Petrasch, Z. (2008). Quantitative analysis of basal dendritic tree of layer III pyramidal neurons in different areas of adult human frontal cortex. *Cell. Anatomol.* 325(suppl. 1), 161–169.

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Correa-John, Berman, Jovanovic-Milosevic, Hiltzen and Rada-Esteban. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Artigo 2 – *Spindle-Shaped Neurons in the Human Posteromedial (Precuneus) Cortex***

**Periódico em que o artigo foi publicado:**

*Frontiers in Synaptic Neuroscience* (ISSN: 1663-3563)

**Fator de impacto de acordo com o Journal Citation Report (2022):**

3.5

**Endereço eletrônico para visualização e *download* da publicação:**

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsyn.2021.769228/full>



## Spindle-Shaped Neurons in the Human Posteromedial (Precuneus) Cortex

Francisco Javier Fuentealba-Villarroel<sup>1,2\*</sup>, Josuel Renner<sup>1,2,3</sup>, Ariete Hilbig<sup>1</sup>, Oliver J. Bruton<sup>4\*</sup> and Alberto A. Rasia-Filho<sup>1,2,5\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Basic Sciences/Physiology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; <sup>2</sup> Graduate Program in Neuroscience, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup> Graduate Program in Biomedicine, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; <sup>4</sup> Department of Medical Clinic/Neurology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; <sup>5</sup> Carlson Center for Neuroscience, University of Osnabrück, Osnabrück, Germany

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Andreas H. H. Lüdtke,  
Julich Research Center, Helmholtz  
Association of German Research  
Centers (HZ), Germany

#### Reviewed by:

Nashvink Hilbig,  
The Rockefeller University,  
United States  
Zdenko Petrášek,  
University of Zgreb, Croatia

#### \*Correspondence:

Oliver J. Bruton  
olbruton@uni-osnabrueck.de  
alberto.a.rasia-filho@ufrgs.br  
osj@cup.uni-osnabrueck.de

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

Received: 01 September 2021

Accepted: 25 November 2021

Published: 11 January 2022

#### Citation:

Fuentealba-Villarroel FJ, Renner J,  
Hilbig A, Bruton OJ and  
Rasia-Filho AA (2022)  
Spindle-Shaped Neurons  
in the Human Posteromedial  
Precuneus Cortex.  
*Front. Synaptic Neurosci.* 13:760228.  
doi: 10.3389/fnys.2021.760228

The human posteromedial cortex (PMC), which includes the precuneus (PC), represents a multimodal brain area implicated in emotion, conscious awareness, spatial cognition, and social behavior. Here, we describe the presence of Nissl-stained elongated spindle-shaped neurons (suggestive of von Economo neurons, VENs) in the cortical layer V of the anterior and central PC of adult humans. The adapted “single-section” Golgi method for postmortem tissue was used to study these neurons close to pyramidal ones in layer V until merging with layer VI polymorphic cells. From three-dimensional (3D) reconstructed images, we describe the cell body, two main longitudinally oriented ascending and descending dendrites as well as the occurrence of spines from proximal to distal segments. The primary dendritic shafts give rise to thin collateral branches with a radial orientation, and pleomorphic spines were observed with a sparse to moderate density along the dendritic length. Other spindle-shaped cells were observed with straight dendritic shafts and see branches or with an axon emerging from the soma. We discuss the morphology of these cells and those considered VENs in cortical areas forming integrated brain networks for higher-order activities. The presence of spindle-shaped neurons and the current discussion on the morphology of putative VENs address the need for an in-depth neurochemical and transcriptomic characterization of the PC cytoarchitecture. These findings would include these spindle-shaped cells in the synaptic and information processing by the default mode network and for general intelligence in healthy individuals and in neuropsychiatric disorders involving the PC in the context of the PMC functioning.

**Keywords:** human brain (cerebral cortex), cytology (CY), default mode network (DMN), dendritic spines, 3D reconstruction, general intelligence (g), von Economo neurons (VEN)

### INTRODUCTION

Von Economo neurons (VENs) have a peculiar phylogenetic and ontogenetic development and are characterized by an elongated spindle-shaped or rod-shaped cell body mainly found in the cortical layer V of restricted brain areas of some species, including humans and other primates, but not in all mammals (Nimchinsky et al., 1995; Allman et al., 2009, 2010; Hakeem et al., 2009; Casula et al., 2014; Raghuani et al., 2015; Hodge et al., 2020; Jacob et al., 2021). In humans, VENs have been reported

mainly in the anterior cingulate cortex (ACC) and frontoinsular cortex (FI; Raghani et al., 2015; Banovac et al., 2019, 2021; Correa-Junior et al., 2020 and references therein), but also in the dorsolateral prefrontal cortex (Brodmann area 9; Fajardo et al., 2004) and in the medial frontopolar prefrontal cortex (Brodmann area 10; González-Acosta et al., 2018). VENs might correspond to ~3% of all neurons in layer V in the ACC (Fajardo et al., 2008; see comments about their relative abundance in Banovac et al., 2021), being more numerous in the ACC and FI of humans than in apes (Allman et al., 2010).

Human VENs show features of excitatory projecting neurons (Nimchinsky et al., 1995; Evrad et al., 2012; Hodge et al., 2020). They may provide fast interconnections between neocortical areas, such as the ACC and FI cortices (Craig, 2009), and recent transcriptomic data suggest that human VENs may project to extracerebral, subcortical targets (Hodge et al., 2020). In gorillas, VENs also project to the inferior frontal gyrus, inferior temporal cortex, laterally to the hippocampus, as well as to the septum and amygdala (Allman et al., 2010). VENs innervate the midbrain periaqueductal gray and the parabrachial nucleus of dorsolateral pons of monkeys (discussed in Evrad et al., 2012), and may link emotion and control of sympathetic/parasympathetic sites in brainstem and spinal cord regions (Cobos and Seeley, 2015; Jacot-Descombes et al., 2020).

The identification of cells as VENs (or putative ones) has been based on Nissl/Thionin staining (Nimchinsky et al., 1995; Raghani et al., 2015), Golgi impregnation (Watson et al., 2006; Banovac et al., 2019, 2021; Correa-Junior et al., 2020), intracellular biocytin (Hodge et al., 2020), retrograde labeling with cholera toxin b and Alexa 594 fluorescent dextran nanoinjection (Evrad et al., 2012), immunoreactivity for different biochemical biomarkers including neurotransmitters' receptors, neuropeptides, and transcription factors (Allman et al., 2005, 2010; Stimpson et al., 2011; Dilatza et al., 2018), and/or different gene expressions (Allman et al., 2010; Evrad et al., 2012; Cobos and Seeley, 2015; Yang et al., 2019; Hodge et al., 2020). VENs are morphologically different from neighboring pyramidal neurons (Allman et al., 2005; Watson et al., 2006) and are larger than layer VI "fusiform" neurons (Nimchinsky et al., 1995). Although having some molecular profile in common with layer V pyramidal and fork neurons, human putative VENs showed distinctive intrinsic membrane properties in the FI (Hodge et al., 2020) and transcriptomic characteristics in the ACC (Yang et al., 2019). These data are fundamental to integrate morphological and genetic characteristics to identify phenotype-associated cells and to test the proposed functional roles for VENs in main control neural networks (Bunton, 2021), as well as their vulnerability in diseases with social and emotional deficits (Allman et al., 2005; Casda et al., 2014; Raghani et al., 2015).

The shape of VENs is also characterized by the presence of two main perpendicularly oriented thick primary dendritic shafts, one ascending toward more superficial cortical layers and another descending toward the inner cortical layer (Allman et al., 2005; Watson et al., 2006; Evrad et al., 2012; Seeley et al., 2012; Raghani et al., 2015). Indeed, the human ACC is a region where the cell body and the primary dendrites of VENs were identified using

different morphological, neurochemical, and transcriptomic approaches. Based on these data to guide the use of the Golgi method, the three-dimensional (3D) reconstruction of Golgi-impregnated layer V VENs indicated the heterogeneity of dendrites and spines of these cells in this brain area. That is, ACC VENs were described in a morphological continuum from sparsely branched (as previously reported by Watson et al., 2006) to more extensively ramified cells with varied collateral branches and differences in the distribution, density, and shape of dendritic spines (Correa-Junior et al., 2020). On the other hand, VENs should have a brush-like aspect for the descending dendrites with an axon in the ACC and in the FI, a morphological characteristic that was evidenced in the first drawings of these Golgi-impregnated neurons (Banovac et al., 2019, 2021); note the aspect of the axonal ramification in the original drawing from Ramón y Cajal shown as Figure 1 in Banovac et al. (2021). Dendrites and spines in VENs are important cellular elements to be studied because the geometry and biophysical properties of both are linked to the synaptic integration, strength, and plasticity (Yuste, 2010; Rochefort and Konnerth, 2012; Spruston et al., 2013; Hayashi-Takeji et al., 2013; Roffehagen and Lübke, 2014; Tamsson and Nägerl, 2014; Nakahata and Yasuda, 2014) for broad information processing in healthy individuals and in neurodegenerative diseases (Harris and Donovick, 2016). Dendritic spines are complex elements that can enhance the connectivity between neurons and increase the packing density of synapses without increasing the overall volume of the brain (Bohme and Harris, 2009). Moreover, dendritic spines are specialized postsynaptic units for most excitatory inputs (Spruston et al., 2013; Briscoe et al., 2014; Helm et al., 2021; but see Kubota et al., 2010 for the impact of inhibitory GABAergic terminals on spines), whose complexity is evident in the human brain (Cajal, 1909-1911; Yuste, 2010; DuRoiño et al., 2015).

The neuroanatomical and cytoarchitectonic maps of the posteromedial cortex (PMC), including the subdivisions of the precuneus (PC, former "quadrate lobule of Forster"), represent current research avenues on multimodal integrative areas in the human brain. The anatomical and functional development of the PC as well as the adjacent mediocentral areas in the PMC may have played a significant role in human brain evolution for somatosensory processing, motor behavior, mental imagery, attentional shift, self-awareness, and judgments about other persons' mental states, social and cognitive specializations (Wunderlich et al., 2009; Kenny et al., 2012; Bruner et al., 2014, 2017a,b). The human PMC may include the PC, the posterior cingulate cortex (Brodmann area, BA, 23), the retrosplenial cortex in the posterior callosal sulcus (areas 29 and 30), and the transitional zone (area 31) between the PC and the posterior cingulate cortex (Margulies et al., 2009). Some features are remarkable: (1) bulging of the parietal surface during the first year of life in *Homo sapiens* is a morphogenetic stage absent in chimpanzees and *Neandertals*; (2) the deep parietal areas show discrete cytoarchitectural differences between human and non-human primates, and (3) the extension of the PC is the principal source of midsagittal brain variability in adult humans (Bruner et al., 2014, 2017a,b) and references therein). In midsagittal sections, the PC is a fully differentiated isocortex located in

the superior parietal cortex, posterior to the postcentral sulcus and the marginal ramus of the cingulate sulcus, anterior to the parieto-occipital fissure and the cuneus, above the subparietal sulcus and adjacent to the transition area to the posterior cingulate and the retrosplenial cortex (Cavanna and Trimble, 2006; Scheperjans et al., 2008a,b; Margulies et al., 2009; Mai et al., 2016; Bruner et al., 2017a). Nevertheless, the human PC varies in its geometry (mostly in its longitudinal dimensions), in the patterns of convolution, and how sulci extend within it (Bruner et al., 2014, 2017a).

The human PC has been referred to as BA 7 (or 7m, further divided in 7a and 7b for its anterior and posterior parts, respectively) or, according to the von Economo and Koskinas cytoarchitectonic atlas, numbered as areas 62–64 (or P60, P62, and P63; cf. Teuber, 2009). The human PC would include BA 7 and 31 or, additionally, the 23 and 30 ones (e.g., see plates 72 and 77 in Mai et al., 2016; but see data in Cavanna and Trimble, 2006 and references therein). Otherwise, the cytoarchitectonic parcellation of structurally distinct microanatomical areas identified a heterogeneous medial border for the 7A, 7P, and 7M parts in the human PC, considering the existence of interindividual anatomical variability and interhemispheric topographic asymmetries (Scheperjans et al., 2008a,b). These PC parts would be located posterior to the postcentral sulcus, where areas 5L and 5M would still be occupying a variable volume of the anterior part of the Brodmann PC 7a (Scheperjans et al., 2008a,b). Functionally, the PC is a multimodal integrative heterogeneous area as revealed by resting-state functional MRI data (Margulies et al., 2009). That is, (1) the anterior PC can be a sensorimotor region, connected with the superior parietal cortex, paracentral lobe, and motor cortex, also including the insula; (2) the central PC can be a cognitive/associative/multimodal zone connected to the dorsolateral prefrontal, dorsomedial prefrontal, and antihomodal lateral inferior parietal cortex; and (3) the posterior PC is connected with contiguous visual cortical regions (Margulies et al., 2009).

Considering that VENS occur in cortical areas for higher sensorial and motor integration, emotional and cognitive functions, intuition and social behavior elaboration, and flexibility, we looked for the presence of “spindle-shaped” cells, which would be suggestive of VENS, in the human PMC. Our intention is not to cause a potential confusion with other uses of the term “spindle neuron” (also mentioned in Watson et al., 2006) or “spindle-transformed pyramidal cells” (as extensively reviewed in Banovac et al., 2011). Rather, we describe the morphology of these neurons in layer V until merging with layer VI of the human PC, based on their Nissl-stained and Golgi-impregnated features while we do not have complete data for their definitive neurochemical and transcriptomic characterization and classification. Here, we studied the anterior and central regions of the PC (BA 7), which correspond approximately to fMRI chosen regions of interest “seeds” 3–7 and 8–11 within the PC (Margulies et al., 2009); seeds data 11 and 15 from SI\_Approx were visually compared and considered as central PC). Our samples included the tissue posterior to the postcentral sulcus, mostly corresponding to the PC (although areas 5L and 5M would also be included;

Scheperjans et al., 2008a,b), and a small part of the transitional area 31 in the ventral limit close to the subparietal sulcus (but not advancing to the posterior cingulate cortex). First, we used Nissl staining to identify neurons with a characteristic elongated spindle-shaped cell body close to pyramidal neurons in the PC cortical layer V and in the transition to layer VI. Afterward, two-dimensional (2D) and 3D reconstructions of Golgi-impregnated spindle-shaped neurons evidenced two main shafts oriented perpendicularly, corresponding to the ascending and descending primary dendrites in these cells. We discuss the morphology of putative VENS in other human brain areas, the need for additional classification of these PC spindle-shaped cells as well as the implications for the local cytoarchitectonics and the functional possibilities for the presence of spindle-shaped (or putative VENS) in the human PC for both the “default mode network” (DMN) and high multimodal cortical processing.

## MATERIALS AND METHODS

The present procedure was adapted from the description published in Correas-Funior et al. (2020).

### Subjects

The subjects were two men and one woman reportedly healthy neurologically and psychiatrically, with no previous neurological interventions. Age, sex, postmortem interval, and cause of death are shown in Table 1. The next of kin provided written informed consent for brain donation during an autopsy at the morgue, as well as provided the donors' clinical and comorbidities information. Each subject was screened for cognitive decline using the “Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly” (IQCODE; Reis et al., 2017). This validated interview procedure has a cut-off point score indicative of dementia of  $\geq 3.27$  or 3.48 in the Brazilian population (Sanchez and Lourenço, 2009; Carrabba et al., 2015). Only cases below these values were included in the present study (Table 1). Brain tissue was also analyzed histologically and immunohistochemically by a neurologist/neuropathologist (AH) to confirm the absence of common vascular lesions or evident neurodegenerative disorders other than primary age-related alterations.

All ethical and legal procedures were carried out in accordance with the international regulatory standards based on the Helsinki Declaration of 1964. The privacy rights of subjects were observed at all times. There is no potentially identifiable data for any individual included in this article. The Brazilian Ethics Committee from the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCS/PA; #62336116.6.0000.5345; 18718719.7.0000.5345, and #6273619.7.0000.5345) and the Federal University of Rio Grande do Sul (#18718719.7.3001.5347) approved this study.

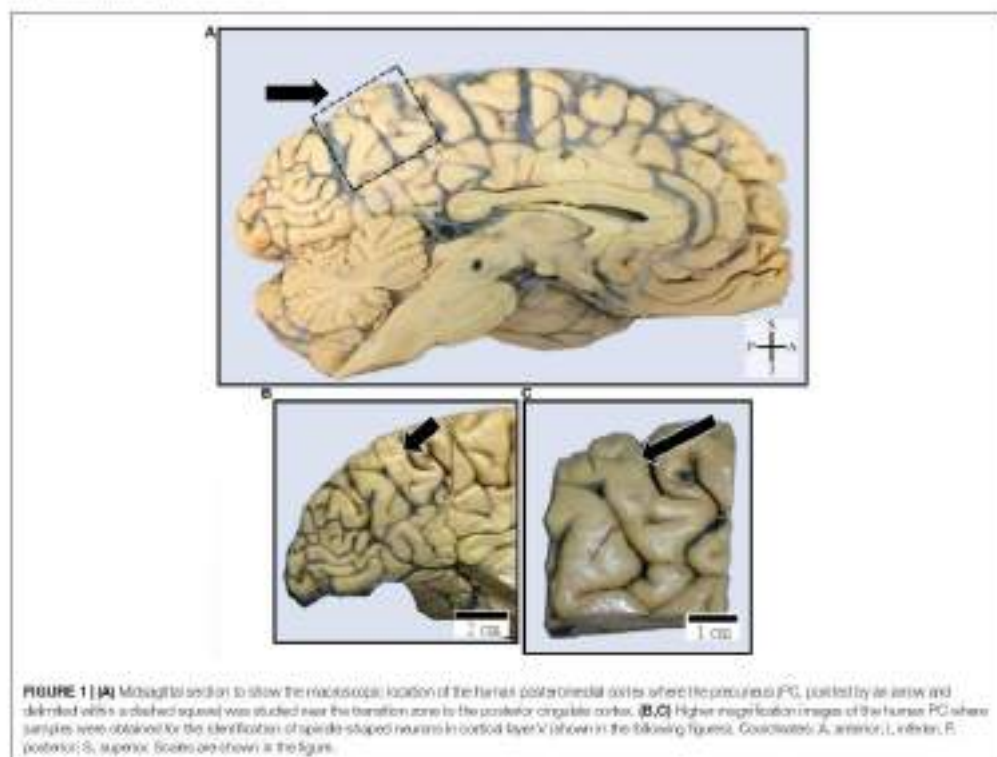
### Tissue Processing and the Nissl Staining Procedure

Brains were kept immersed in 10% laboratory-grade, unbuffered formaldehyde solution at room temperature (RT) for

**TABLE 1** | Characteristics of the human cases.

Case (code)	Age (years)	Sex	PMI (hours)	ICCODE	Cause of death	Tissue fixation	Technique
2	81	F	6-20	1.32	Procuria	Immersion	Thionin/Golgi
3	78	M	6-20	2.12	Cardio-Arrest	Immersion	Thionin/Golgi
4	48	M	6-20	3.05	Undetermined	Immersion	Thionin/Golgi

PMI, post-mortem interval; F, female; M, male.



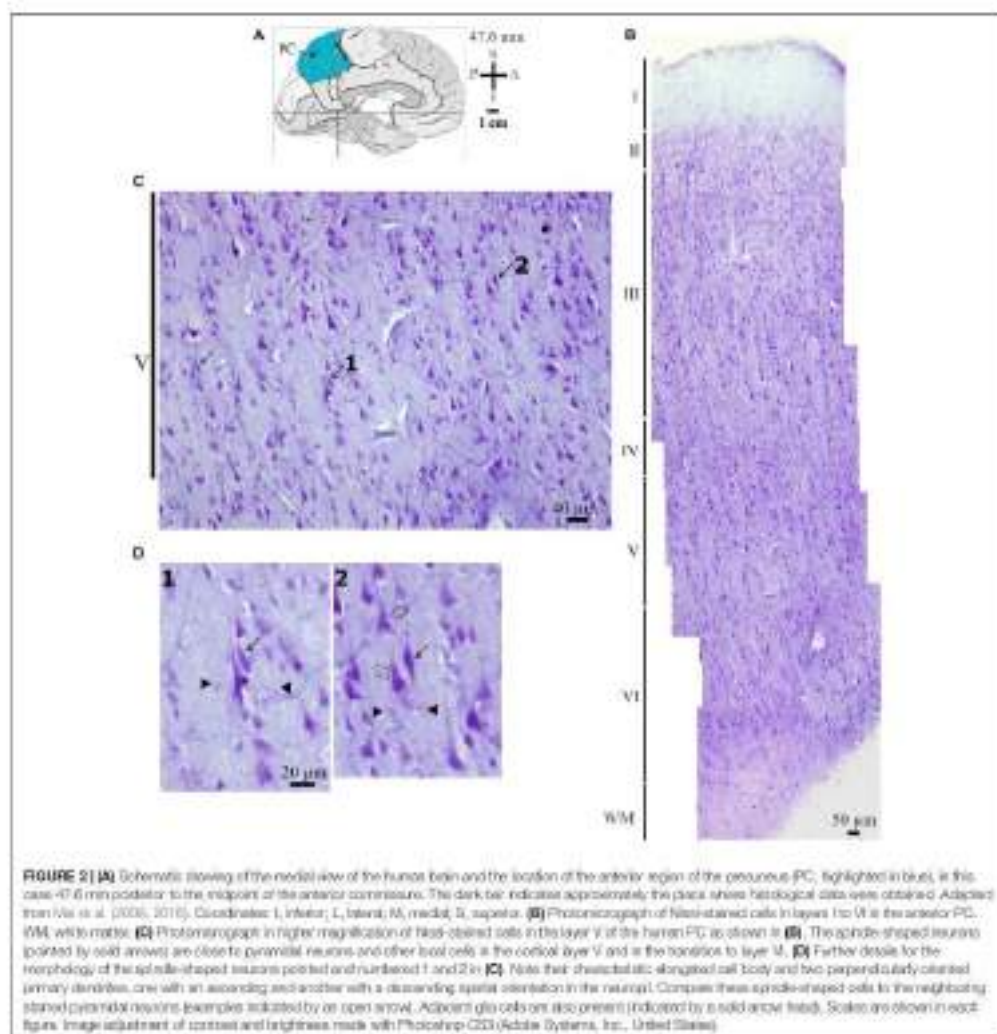
**FIGURE 1** | (A) Mid-sagittal section to show the macroscopic location of the human precentral sulcus where the precentral PG, pointed by an arrow and delimited with a dashed square) was studied near the transition zone to the posterior cingulate cortex. (B,C) Higher magnification images of the human PC where samples were obtained for the identification of spindle-shaped neurons in cortical layer IV (shown in the following figures). Coordinates: A, anterior; L, inferior; P, posterior; S, superior. Scale bars (shown in the figure).

approximately 6 years before study. The PC was located in the dorsal portion of the PMC, posterior to the marginal ramus of the cingulate sulcus, anterior to the parieto-occipital fissure and the cuneus, and including the subparietal sulcus as anatomical reference, as mentioned above (Figure 1; Margulies et al., 2009; Mai et al., 2011b; Bruner et al., 2017a). The anterior and central PC in the left hemisphere (the side available in these samples) were studied from 41.5 to 73.6 mm posterior to the midpoint of the anterior commissure (Mai et al., 2004, 2014; Figures 2, 3).

At the beginning of this study, tissue blocks were sectioned and post-fixed at RT for 30 days using phosphate buffer solution (PBS, 0.1 M, pH = 7.4), 4% formaldehyde, and 1.5% picric acid. Samples were coronally sectioned with a vibrating microtome

(10905; Leica, Germany) in an alternating fashion. One series was sectioned at 30  $\mu$ m for the Nissl technique, the other at 200  $\mu$ m for the Golgi method.

The Nissl staining identified the cortical layers and different cells in the PC (Figures 2, 3). That is, sections were (1) placed on gelatin-coated slides and left to dry at RT for 1 day; (2) then, slides were immersed in a 4% formaldehyde in PBS for 1 week at 4°C and protected from light; (3) dried for 1 day at RT and immersed in a 70% ethanol solution for 1 day; (4) immersed in increasing concentrations of ethanol and cleared in absolute xylene; (5) immersed in decreasing solutions of ethanol and washed in distilled water; (6) immersed in a solution of 0.25% cresyl violet (Merck, Germany) for 2 min; (7) immersed in distilled water to remove excessive dye, and in solutions of

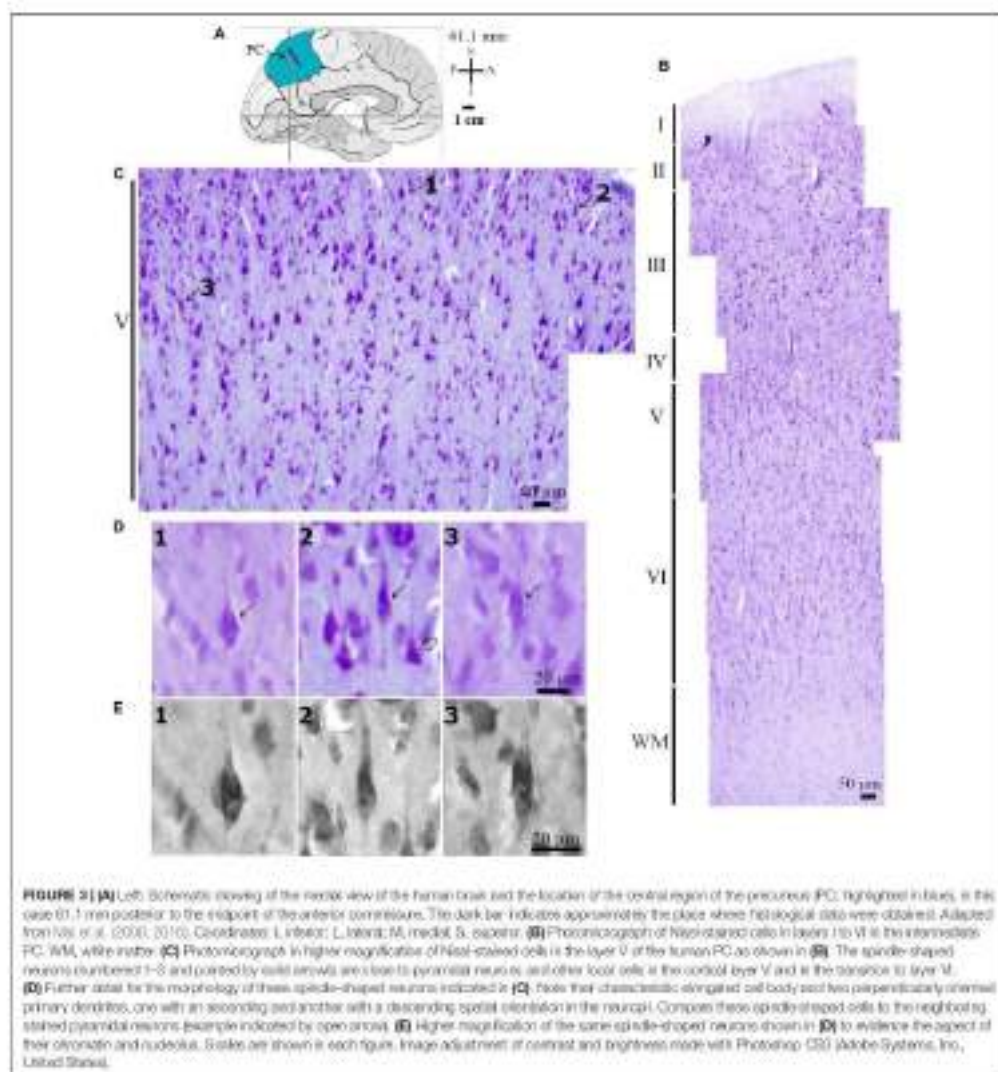


increasing ethanol concentration; (8) dipped in a solution of 95% ethanol with 1% acetic acid and absolute xylene and (9) mounted with synthetic balsam (Soldan, Brazil) and cover slipped.

### The Golgi Method and the Two-Dimensional and Three-Dimensional Image Reconstruction Procedures

We used the “single-section” Golgi method adapted for long-term fixed *postmortem* human brain (Dall’Oglio et al., 2010

on the original Cajal and Semogyi, 1984, developed for 3D image processing by Kolberger et al., 2018) as previously done for the characterization of neurons and dendritic spines in both subcortical (amygdaloid nuclei) and cortical human brain areas (Dall’Oglio et al., 2013, 2015; Vazquez et al., 2018; Correa-Júnior et al., 2020; Rasia-Filho et al., 2021). Brain sections were sectioned and kept immersed in the same post-fixation solution as mentioned above for three more days. Afterward, sections were: (1) rinsed in PBS and immersed in a solution of 0.1% osmium tetroxide (Sigma Chemicals Co., United States)



in PBS for 20 min; (2) rinsed in PBS and immersed in 3% potassium dichromate (Merck) at 4°C in the dark for 2 days; (3) rinsed in distilled water, "sandwiched" between coverslips, placed in a solution of 1.5% silver nitrate (Merck) at RT for 1 day and protected from light; (4) washed in distilled water, placed on gelatin-coated histological slides, dried at RT, dehydrated in an ascending series of ethanol, cleared in ethanol and absolute xylene, and (5) covered with non-acidic synthetic

balsam (refractive index = 1.518-1.521, Pennmount Mounting Medium, EMS, United States or similar product, Soltan, Brazil) and coverslipped.

We used the following criteria to select Golgi-impregnated neurons for further study: (1) cells should have their soma located within the boundaries of the PC; (2) spindle-shaped cells should be near to pyramidal neurons in the cortical layer V until the transition to layer VI; (3) cells should have two main primary

dendrites oriented vertically toward the white matter and apical surface; (4) cells should be relatively "isolated" in the neuropil to allow its best visualization; (5) dendrites should have defined borders and, as much as possible, be tapering after branching or at distal locations; and (6) dendritic spines should be visible and morphologically distinct than unspecific silver precipitated in the section background.

The general morphology of PC neurons was studied at 260 $\times$  (using an objective planapochromatic lens UPlanSApo 9.8 NA, Olympus, Japan) using a light microscope (Olympus BX-61, Japan) equipped with a  $z$ -stepping motor and coupled to a CCD/DF72 high-performance camera (Olympus, Japan). Each image was acquired after advancing 0.5  $\mu$ m for each  $z$  stack, under high resolution (1360  $\times$  1024 pixels), and submitted to dynamic deconvolution using the Image Pro Plus 7.0 software (Media Cybernetics, United States) during the acquisition process (Dall'Oglio et al., 2013; Reberger et al., 2018). Files were recorded as .TIFF files. The selected images were converted to 8-bit monochromatic pictures before processing (Correa-Junior et al., 2020). We initially elaborated a 2D reconstruction of the cell body and dendrites of Golgi-impregnated neurons by summing microscopic images at sequential focal planes. Small adjustments of brightness and background contrast were made in final reconstructed images using Adobe Photoshop CS3 software (Adobe Systems, Inc., United States) and/or Neuroanatomic free software (v1.6.3 programmed in Borland C++ Builder, University of Reading, United Kingdom), without altering the original neuronal features.

Based on this 2D general shape reconstruction, we proceeded next to the 3D reconstruction of selected neurons in accordance with the procedure described in Correa-Junior et al. (2020). That is, we used the Neuroanatomic software (as mentioned above), and a semi-automatic tracing of the cell body and dendrites was done for the original stack of microscopic images acquired along with the three spatial coordinates. Reconstructions were achieved as a sequence of 3D points with an ASCII-based format representing dendritic trees as a series of connected cylinders of varying radii identified by orthogonally lines from edge-to-edge (Myatt et al., 2012). The luminosity was inverted to evidence the dendritic shafts details contrasting with the background. Contrast was adjusted for the visualization of thin branches using the algorithm and image processing described in Myatt et al. (2012). Final reconstructions were saved as SWC format (Parelli and Avoli, 2013). Morphometric data were obtained using the L-Measure free software (Scorciari et al., 2008) on the 3D reconstructed images. Values were calculated for the cell body length, main diameter and volume, the dendritic diameter of the primary shafts, total number of branches (i.e., the sum obtained starting from primary dendrites, including segments between branching points, and toward the end of main or collateral branches), total length, and total volume of the dendritic tree. However, it must be mentioned that measurements of the neuronal cell body and dendrites can be affected by the fixation procedure and the tissue shrinkage due to such technique used. The morphometric values shown in Figure 8 might not be the actual ones (as occurs *in vivo*) due to unavoidable changes in the nervous tissue following death and the various steps

for the present histological processing (Dall'Oglio et al., 2010, 2013, 2015; Reberger et al., 2018; see also Zeba et al., 2008 for additional discussion).

The 3D reconstruction of dendritic spines was done using brightfield images acquired at a final magnification of 1300 $\times$ , using an 100 $\times$  oil immersion objective lens (planapochromatic UPlanSApo 1.4 NA, Olympus, Japan). Each image was saved with high resolution (2070  $\times$  1548 pixels) and submitted to dynamic deconvolution using the Image Pro Plus 7.0 software. Spines were imaged from proximal to distal branches. Data were obtained by controlling the focus in the  $z$  axis and acquiring  $z$ -stacks at sequential 0.1  $\mu$ m steps. Corresponding images were stored as .TIFF files and converted to 8-bit monochromatic pictures. Each spiny dendritic segment imaged consisted of approximately 100–200 sequential frames (Correa-Junior et al., 2020).

Following Reberger et al. (2018), spines were 3D reconstructed using an algorithm processed in the MATLAB software (R2015b, The MathWorks, United States), i.e., "after processing the gray scale slices independently or using a median 3D filters in smaller subvolumes, images were processed using the following steps: (a) outlier removal; (b) edge enhancement using a variant of the 'anisotropic method' and image filtering approach based on domain transforms ('edge-aware'); (c) binarization using an adaptive thresholding approach; (d) pruning false positives (i.e., correction for the maintenance or removal of small objects in the image of interest if they are a dendritic segment and spine or an obvious artifact); (e) 2D flood-fill operation for each slice of the binary volume; (f) trilinear interpolation to smooth transitions between adjacent slices; and (g) visualization of the final volume of the sampled images containing the selected dendritic shafts and their spines" (Vizquez et al., 2018) using the "Fig" Image J software (Schindelin et al., 2012) with the "Volume Viewer" plug-in<sup>1</sup>. Images had final adjustments of brightness and contrast made in Photoshop CS3 without altering spine counting or classification (Correa-Junior et al., 2020).

The identification and classification of each type of 3D-reconstructed dendritic spine was based on previous descriptions (Eidin and Harris, 1999; Arcilano et al., 2007a,b; Bracco et al., 2014; Gonzalez-Ramirez et al., 2014; Dall'Oglio et al., 2015; Vizquez et al., 2018; Correa-Junior et al., 2020; Basa-Filho et al., 2021). By rotating the reconstructed images, spines were observed at different angles to determine occurrence from proximal to distal dendrites, number, shape, and size (Reberger et al., 2018). For each spine, we considered: (1) the presence, length, and diameter of a neck, (2) the number of protrusions from a single stalk, (3) the head diameter, and (4) the head shape. According to these morphological features, spines were classified as (1) thin (2) stubby, (3) wide, (4) mushroom-like, (5) ramified, and (6) with a transitional aspect between these classes or as "atypical" (or "multiform") spines with more complex and varied shapes (Dall'Oglio et al., 2015 and references therein). Tiny protrusions extending from the head of a spine were classified as spinules (Bracco et al., 2014; Zaccari et al., 2020; Petralia et al., 2021).

<sup>1</sup> <http://imagej.nih.gov/ij/plugins/volumeviewer.html>

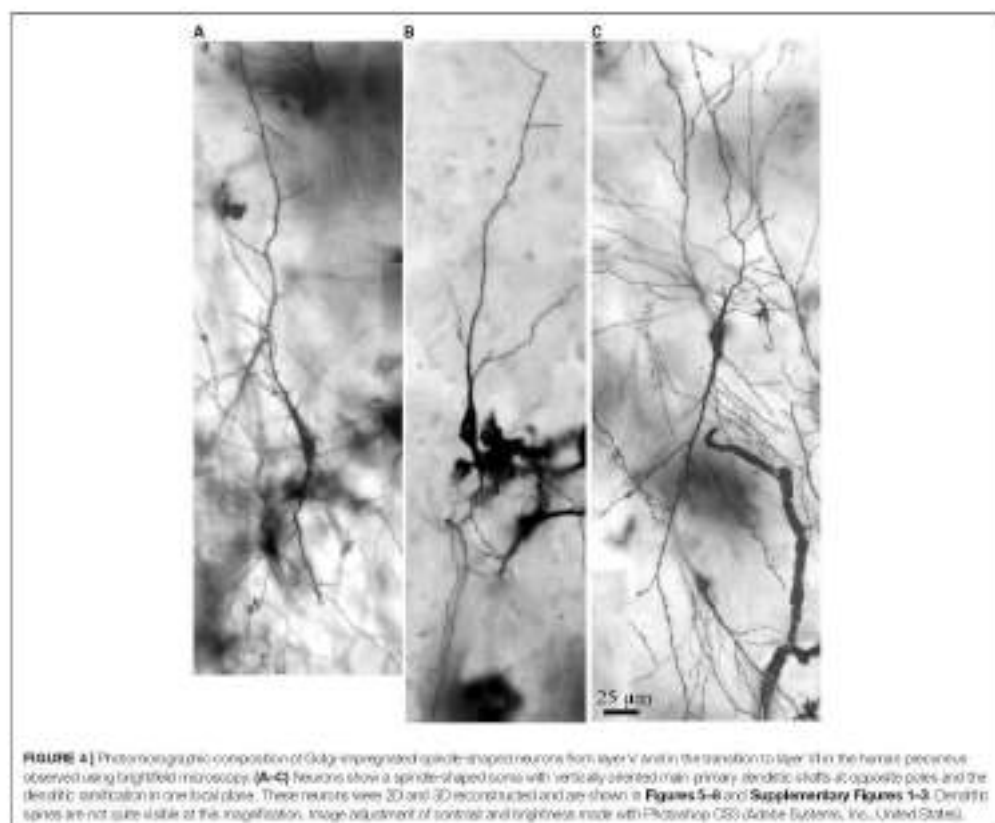
All computational procedures were run using Windows Microsoft® (version 10), Intel® Core™ i7-4750H CPU @2.20 GHz, 16.0 GB RAM memory, NVIDIA® GeForce GTX 1050 Ti with 4 GB for image processing.

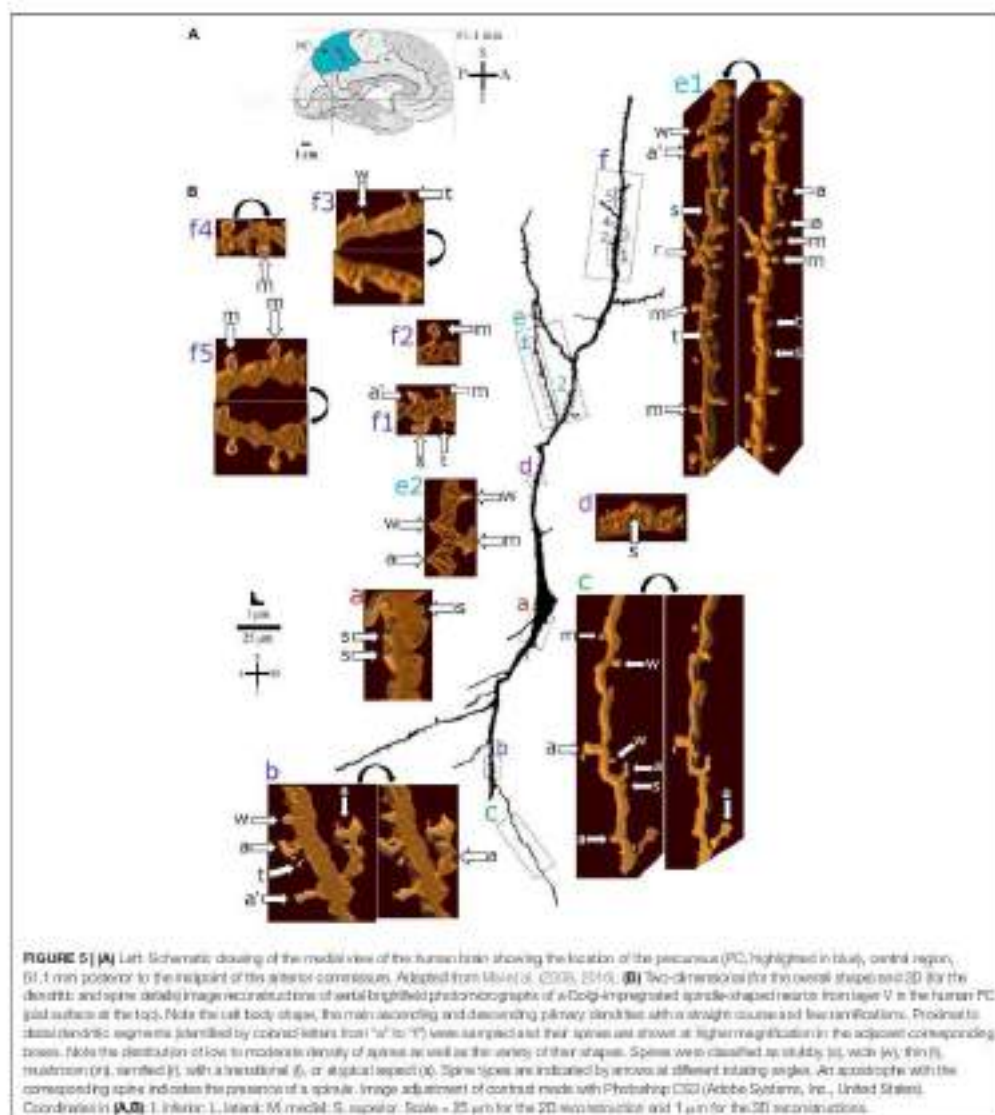
## RESULTS

The Nissl-stained sections served to identify the cortical cytoarchitectonics and the cell body shape of neurons in layer V in the anterior and central regions of the human PC (Figures 2, 3). Our interest was initially centered in Nissl-stained cells with an elongated spindle-shaped or rod-shaped cell body with two symmetric, vertically oriented primary dendritic shafts emerging at opposite somatic poles. The cell body shape of these cells should be similar to those reported previously for putative VEs (e.g., Nimchinsky et al., 1995; Allman et al., 2005, 2010; Hodge et al., 2020). We observed these cells in the PC layer V and in the transition to layer VI close to pyramidal

neurons, which ranged from small and intermediate to large size, and glial cells (Figures 2C, 3C). Nissl-stained spindle-shaped neurons displayed a longitudinal cell body length similar to some neighboring pyramidal neurons (Figures 2D, 3D) as well as the characteristic neuronal chromatin aspect and a prominent nucleus (Figure 3E).

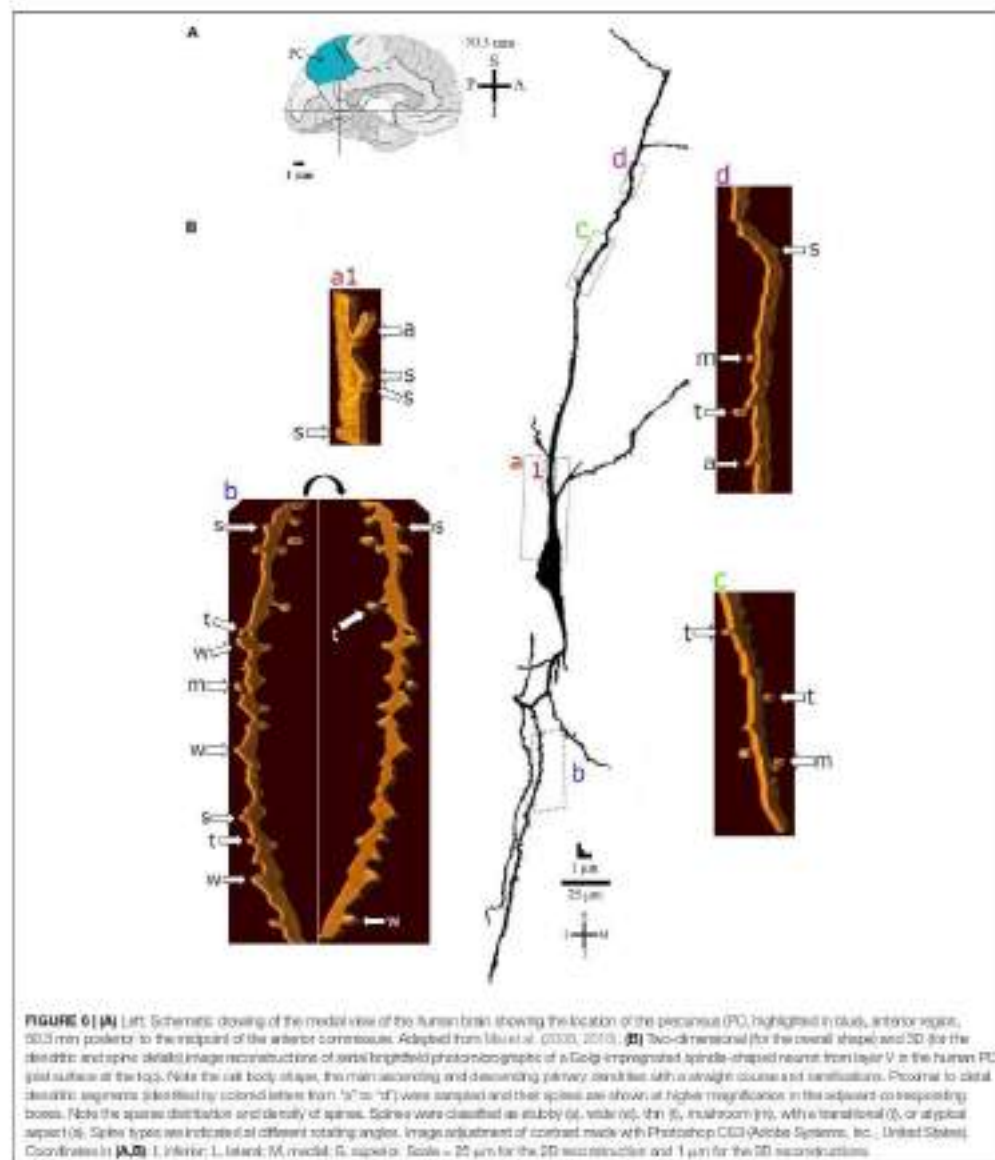
There are limitations for the Golgi method when studying adult human *postmortem* samples. That is, not all cells were completely impregnated in the human PC, and it was not possible to reliably determine the presence of an axon and its ramification in all neurons. Few well-impregnated spindle-shaped neurons randomly fulfilled the inclusion criteria for further study. Descriptive data are provided for those available neurons without further statistical comparisons. The three subjects studied here had neurons in layer V showing the spindle-shaped soma and two primary dendrites, but few cells were well-impregnated. We selected the Nissl staining and the best Golgi-impregnated spindle-shaped neurons that we could obtain, shown in Figures 2–10 and Supplementary Figures 1–3 from





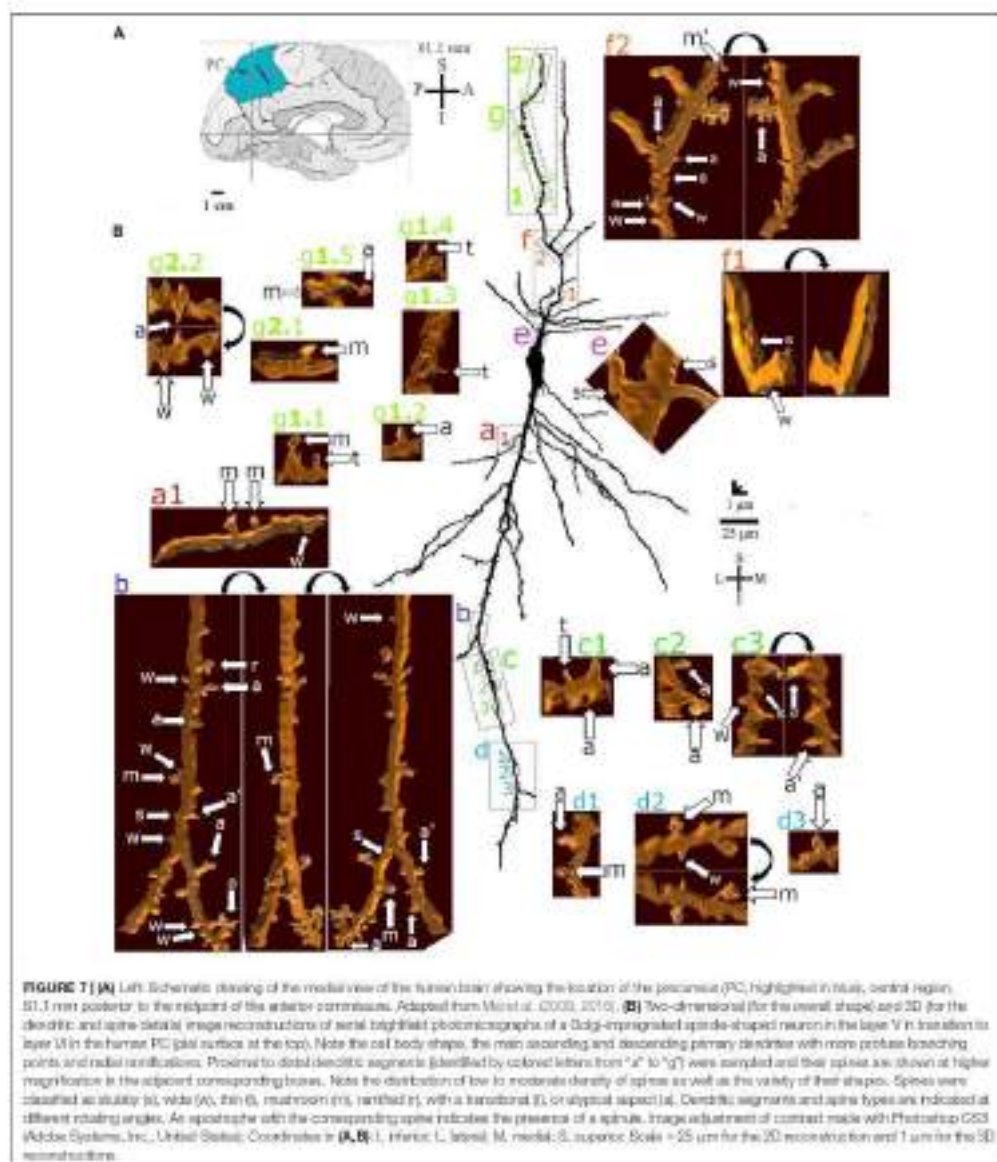
case #4 (described in Table 1). For example, in 7 serial sections from this specific case, we found 13 randomly impregnated pyramidal neurons (one example is shown in Supplementary Figure 4, most of the others were not completely impregnated) and 8 spindle-shaped cells (5 of them are shown here, the others had only the cell body and short "cut-off" proximal dendritic

branches visible). The sampled spindle-shaped neurons were observed along the anterior or the central parts of the PC (see legends of the corresponding Figures 2–10). We also observed some small fusiform and other pleomorphic neurons including a spindle-to-rod-shaped cell, in layer VI of the human central part of the PC (Figures 11, 12), as described below.



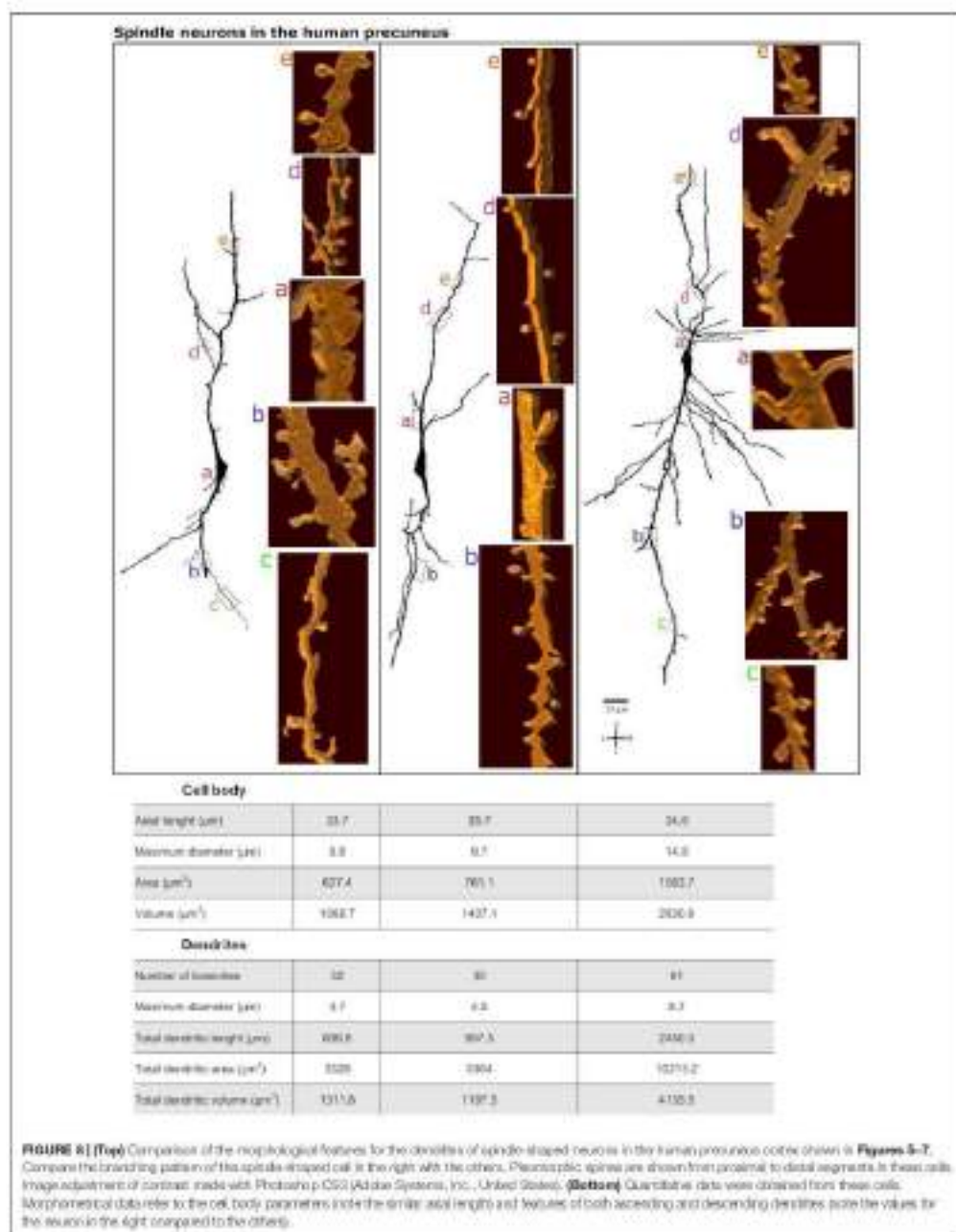
Using the Golgi results, we performed the 3D reconstruction of three spindle-shaped neurons found in layer V and in the transition to layer VI to evidence their dendritic and spines features in the human PC (Figures 4–8). The characteristic aspect

of the cell body at different viewing angle and the preferred vertical orientation of the two main dendritic shafts of these cells are shown in Supplementary Figures 1–3. These neurons have a similar cell body shape, but show some differences in the



dendritic branching pattern (Figures 4–6). That is, although they have two main longitudinal ascending and descending shafts with a straight course, dendrites varied in the number and aspect of the collateral branches (Figure 8 for comparison). Spindle-shaped

neurons can have few collateral dendritic branches with an oblique orientation (Figures 5, 6) or display more profuse ramification in both ascending and descending dendrites and collateral branches with a higher radial extension (Figure 7).



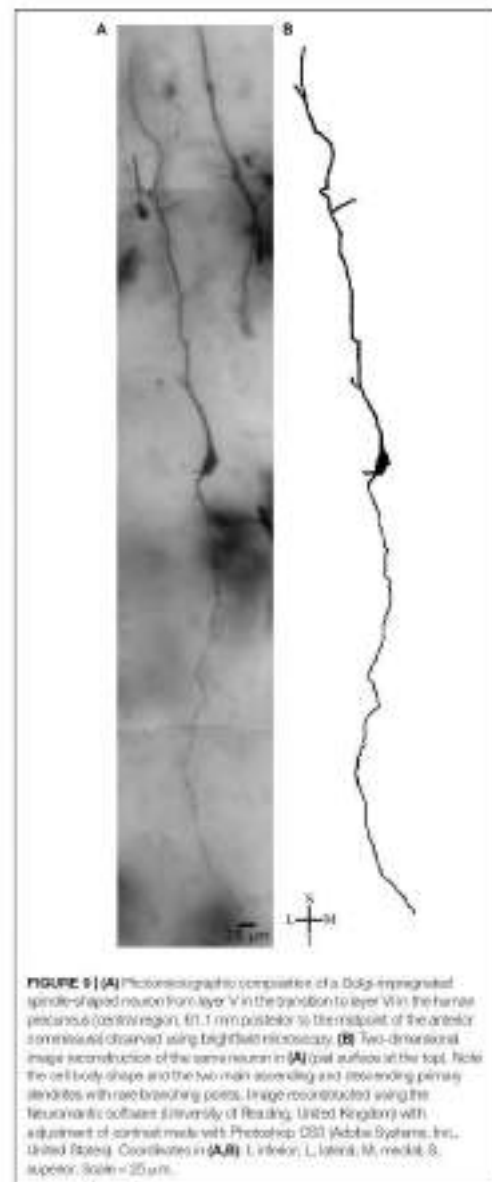
Morphometric data were obtained to exemplify the present observations (Figure 8). It is also worth noting that the spindle-shaped neurons shown in Figures 5–7 required 54, 142, and 31 serial  $z$  stacks (0.5  $\mu\text{m}$  each) for their 3D reconstruction, respectively (Supplementary Figures 1–3). That is, these neurons can display a 3D dendritic extension restricted to the same vertical axis where the cell body is or can also exhibit obliquely oriented dendritic branches with a higher extension toward the surrounding volume. For example, the spindle-shaped neuron shown in Figure 6 has more branches along the  $z$ -axis (and therefore needed more  $z$  stacks for its imaging), which is observed at different rotation angles after 3D reconstruction (Supplementary Figure 2).

Dendritic spines showed a variety of shapes and sizes intermingled in the same dendritic segments (Figures 5e1, 6b,d, 7b). Spine types ranged from small to large (Figures 6a1,b) with stubby, wide, thin, mushroom, ramified, transitional aspects or more complex shapes with different neck thickness and/or multiple bulbous structures (Figures 5e1, 7f2 right).

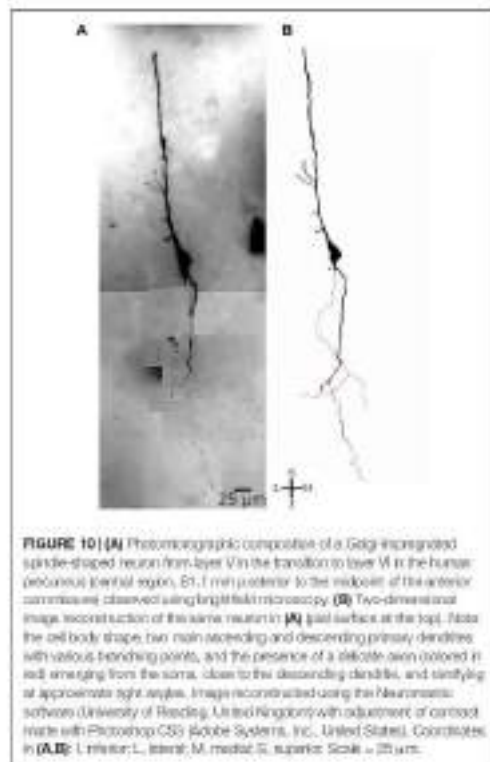
Mushroom spines showed heads with a bulbous or a perforated-like aspect (Figure 5e1, left). Spines with transitional or atypical aspects showed diverse shapes (Figures 5b,c, 7b,c,d1). Among them, there is a double spine with a neck and a bulb followed by a second neck giving rise to another ending bulb (Figure 5c, left image, “c” in the right side of the dendrite). Pleomorphic spines were found from proximal to distal ascending and descending dendrites, showing a sparse to moderate density toward more distal segments (Figures 5–7). Spines occurred either isolated or grouped (Figures 5b,c, 7b,f). Spines occurred either isolated or grouped (Figures 5b,c, 7b,f). Spines were also observed in different spine types (Figures 5e1,f1, 7b,c3).

There were some additional features for the spindle-shaped neurons in layer V and in the transition to layer VI in the human PC. We have also observed a spindle-shaped neuron (longitudinal length and higher diameter of 57 and 19  $\mu\text{m}$ , respectively) with straight dendritic branches devoid of main ramifications in both ascending and descending branches and with a moderate density of small spines (Figure 9), and another spindle-shaped neuron (longitudinal length and higher diameter of 38 and 19  $\mu\text{m}$ , respectively) with a delicate axon emerging from the cell body, close to the descending primary dendrite, and with few spines along the dendritic shafts (Figure 10). The axon in this latter cell emerges from a short hillock, is directed to the inner cortical layer, has a tiny aspect and few ramifications at approximate right angles (Figure 10).

Lastly, Golgi-impregnated cells with varied cell body shapes occur in the polymorphic layer VI of the human PC (Figures 11A,B). Some fusiform cells are smaller than layer V spindle-shaped neurons (compare the scale bar in Figure 11 and in Figures 5–7). For example, the cell body of two small fusiform neurons, measured after the cellular 3D reconstruction, had 18 and 20  $\mu\text{m}$  for the longitudinal length and 6 and 9  $\mu\text{m}$  for the higher diameter (Figures 11A,B, respectively). These neurons also show two vertically oriented primary dendrites arising from opposite somatic poles, but very short dendritic branches with a restrict extension in the neuropil (Figure 11A).



Some of the thin collateral branches radiate in various angles and show an oblique to horizontal projection (Figure 11B). Other fusiform cell displays two main primary dendritic shafts



but also other small primary branches that alter the shape of the cell body (Figure 11C, neuron in dark). This latter cell was observed adjacent to a “modified pyramidal neuron” (MPN, according to Braak, 1980; Figure 11C, arrow head) in this inner layer. Interestingly, an elongated spindle- to rod-shaped neuron (longitudinal length and higher diameter of 41 and 16  $\mu$ m, respectively) was found at the deeper part of layer VI in the PC (Figure 12). This spiny cell has two thick primary dendrites. The descending one is thicker than the ascending shaft, gives rise to two secondary branches with radially oriented collaterals, and a segment that appears to be the axon hillock. The ascending dendrite has a longer extension and some collaterals that radiate to the adjacent neuropil. There is a third dendritic branch, thinner than the others, emerging from the cell body and directed to the top of the section (Figure 12).

## DISCUSSION

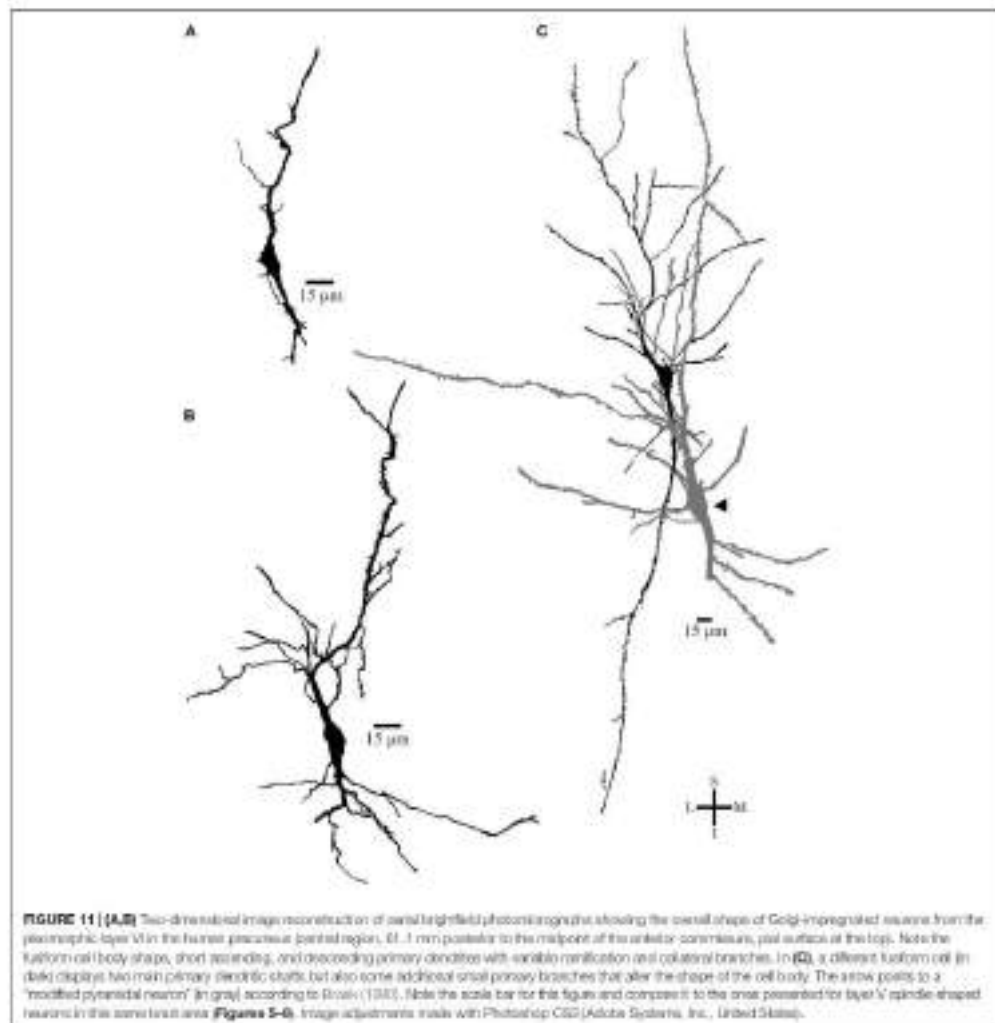
We describe the presence and the morphological features of Nissl-stained and Golgi-impregnated spindle-shaped neurons in the anterior and central regions of the PC in the human

PMC. They were found close to pyramidal cells in the cortical layer V and in the transition to polymorphic layer VI. In the PC, these spindle-shaped neurons display a similar cell body shape and two primary dendritic branches with a longitudinal spatial orientation as putative VENs described in other human brain areas (Nandhasky et al., 1993; Allman et al., 2005, 2010; Watson et al., 2006; Fajardo et al., 2008; Cobos and Seeley, 2015; Rughani et al., 2015). Nevertheless, the neurochemical and transcriptional identity of these cells have to be determined to establish their definite classification. Here, we will discuss the morphology of VENs and critically compare our Golgi data with those from other authors (Watson et al., 2006; Banovic et al., 2019, 2021) as well as with other congruent approaches that have been used to identify human VENs in the ACC and FI. These PC layer V spindle-shaped neurons showed few dendritic branches in the main ascending and descending dendritic shafts or a more ramified aspect with collateral dendrites at different angles and extension along the surrounding neuropil. In addition, dendritic spines ranged from sparse to moderate from proximal to distal segments. We observed intermingled spines of varied shapes and sizes, as well as the presence of spinules after 3D reconstruction. These results would add to the cytoarchitecture and to the synaptic and information processing in the human PC integrated in multimodal networks relevant for the DMN and general intelligence (*g*) in the human brain. These findings also underscore the need for an in-depth characterization of these spindle-shaped (or putative VENs) in both healthy individuals and in neurological and psychiatric conditions involving the PC in the context of the PMC functioning, as commented below.

## Neurons Might Be Classified as Von Economo Neurons by Concurring Techniques

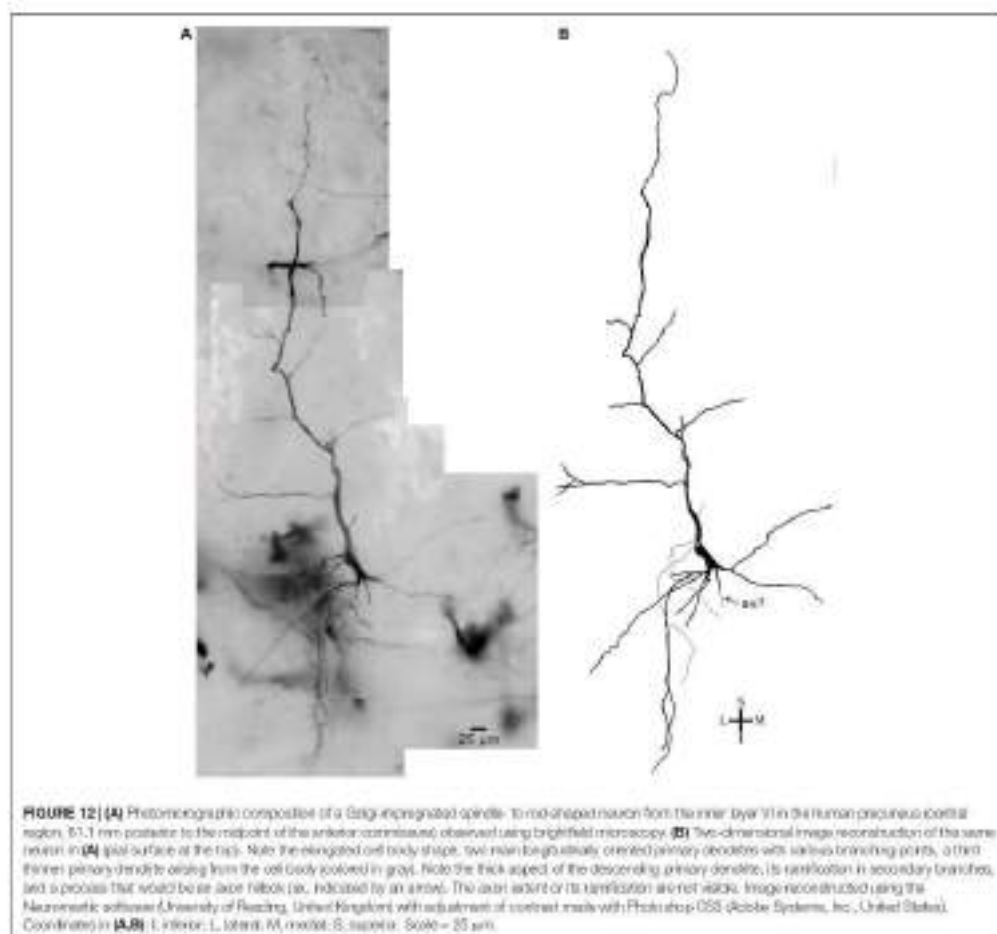
There is an important current discussion on what can be considered a VEN based on morphological criteria (Nissl and Golgi techniques), after using *in situ* hybridization and immunohistochemistry assays for VEN-associated distinctive expression of cellular markers and/or by employing single nucleus RNA sequencing to obtain transcriptome data and to predict cellular functional properties. In a recent paper, Banovic et al. (2019) defined “VENs on Golgi staining as a neuron with the following morphological features: an elongated, stick-like cell body gradually continuing into thick apical and basal stem, a brush-like basal stem arborization and an axon origin distant from the cell body,” i.e., at least 100  $\mu$ m away from the cell nucleus. These authors also recommended that “the identification of von Economo’s specialized cells in other cortical regions and non-primates should be done by demonstrating the dendritic and axonal morphology or by identifying specific markers or marker combinations that would enable the identification of VENs without relying solely on morphology” (Banovic et al., 2021).

Let us comment on the current data that include the cell body, the dendritic and axonal morphology with the identification of VEN markers focusing in cells from the layer V of the human ACC and FI. We will exclude small fusiform or MPNs in layer VI from the present discussion. First, it is important to consider



that von Economo and Koskinen identified "VENs" in humans using the Nissl staining (see Figures 4 and 5 in Banovac et al., 2021). That is, it was the cell body shape, its relative size compared to adjacent cells, and the aspect of two main primary dendrites of these neurons located in the layer V of restricted brain areas that led to the identification of "VENs as VENs." The "stick- or corkscrew-shaped cell body were clearly distinguishable from other spindle-shaped cells found throughout the cerebral cortex" (Banovac et al., 2021). This cell body shape described by von Economo and Koskinen resembles the elongated soma of neurons

previously drawn by Ramón y Cajal (Figure 1 from Banovac et al., 2021). However, it is also possible to observe a certain variability in the cell body shape of VENs drawn by Ramón y Cajal, including a likely "spindle" aspect (compare the cell body shape and the descending dendrites originating an evident axon in the four VENs marked as C and D in Figure 1 from Banovac et al., 2021; data from the PI of a 1-month-old human girl). Afterward, Nimchinsky et al. (1995) described Nissl-stained spindle neurons in the layer Vb of the human ACC with "...a basal dendrite that was at least as thick as its apical dendrite..." These "spindle



neurons were readily distinguishable from pyramidal neurons and exhibited a variety of morphologies. Some were very slender and elongate, with apical and basal dendrites nearly as thick as the soma at its widest point. Others were shorter, more stout, and usually curved. Occasionally, neurons were encountered with a bifid basal dendrite or a third major dendrite emerging from the soma. In addition, lipofuscin deposits were common and were occasionally so large that they distorted the shape of an otherwise very slender neuron. . . . The significance of this cellular variability is not clear, but it might be related to the cytoarchitectonic variability in this region. . . ." (see additional examples in Figure 4D from [Jout-Descombes et al., 2020]).

"While maintaining the particular elongated somatic aspect and two main primary dendrites at opposite somatic poles,

some variability for the rod and spindle shapes of the cell body of putative VENS in cortical layer V could be observed using additional techniques in human samples (e.g., for transcriptomic-related data, see Figure 1A, right image, and Figures 2b and 2c in Hodge et al., 2020; Figure 1A for the rod and spindle cell body shape of neurons expressing specific genes shown in Figures 4B' and C' in Yang et al., 2019; for the different immunocytochemical stainings of VENS, including cell body shape and primary dendrites, see Figure 3 in Allman et al., 2005; the cell body variability in Figures 10B and 11B in Allman et al., 2010; the somatic shape and primary dendrites in Figures 3D and 3F as well as the immunohistochemistry images in Figures 4D and 4F in Dijkers et al., 2018; and, the immunostaining pattern shown in Figures 2A and 2B in Simpson et al., 2011). Human

PC neurons are also examples of some spindle-shaped cells in the human brain in Figure 3A (Correa-Júnior et al., 2020), and this cell body feature directed further study of the ACC VENS shown in Figures 3B–D and Figures 4–8 in this report. Also worth noting are the cell body shape of a NeuN/SMI-32 double-immunolabeled VEN shown in Figure 11B in Banovac et al. (2019), the cell body shapes of presumed VENS after *in situ* mRNA hybridization (and high level expression) of FEZF2 in the FI layer V (Figure 4E' in Cobos and Seeley, 2015), and the fact that, using Golgi-Cox sections to identify VENS in the deep part of layer V and the upper part of layer VI in the human ACC, "most VENS had a more spindle-shaped cell body, and the point of demarcation between the soma and the stems was more apparent" (Banovac et al., 2019).

These findings would accompany the distinction made when classifying VENS, bipolar ovoid and rhomboid-shaped cell bodies or, if one considers the various results for putative VENS in cortical layer V, the identification of human VENS with a cell body shape with some variability between stick-like or rod and spindle shapes, for example. There is also some similarity between the cell body shape (used as the morphological parameter in this case) of a layer V "VEN" included in the original study of von Economo and Koskinas (shown in the bottom left of Figure 4 in Banovac et al., 2021) and the "bipolar" neuron (not considered a "VEN" shown in Figure 10A (leftmost neuron) from Banovac et al. (2019). A parallel discussion could be done on VENS shapes and markers in the macaque monkey (e.g., see Figures 2A and D–G, and Figures S1 E', F', and H' in Estrad et al., 2012). Moreover, the 3D reconstruction is a useful procedure that can provide complementary data to 2D images. When observed at different rotation angles, the cell body shape of the same 3D reconstructed Golgi-impregnated VEN can show a spindle shape or a slender aspect (for example, see the three Supplementary Figures in 3D animation in Correa-Júnior et al., 2020 and the present Supplementary Figures 1–3).

Von Economo neurons, fork cells, and a subset of pyramidal cells are transcriptionally similar to one another in the human FI (Hodge et al., 2020), and layer V VENS express some markers that can also be found in fork cells and large pyramidal neurons in the human ACC or FI (Allman et al., 2010; Simpson et al., 2011; Dikkes et al., 2018). A within cell class phenotypic variability may occur for VENS since not all of them are immunolabeled by the same marker at the same time in the FI layer V (see Figure 11B in Allman et al., 2010; Cobos and Seeley, 2015). These data would question how layer V VENS are a morphological diversification of an evolutionarily conserved cell type, a morphological modification of pyramidal neurons (as a spindle-transformed cell) or represent a regionally distinctive and selectively evolved specialized cell type in the human cerebral cortex (Allman et al., 2010; Cobos and Seeley, 2015; Banovac et al., 2019, 2021; Yang et al., 2019; Hodge et al., 2020).

Notably, thick-tufted layer V pyramidal neurons are a heterogeneous class of cells, but are morphologically different from their neighboring VENS (Watson et al., 2006; compare with Ramawamy and Markram, 2015; Combresoli and Spruston, 2019; Basso-Filho et al., 2021); see also comments on the likely coexistence of discrete and continuous variations that underlie

cell-type diversity in BRAIN Initiative Cell Census Network (BICCN), 2021. VENS emerge mainly after birth, increase in number until age 4 years (Allman et al., 2007), and can be susceptible to alterations in some neuropsychiatric disorders (as described below). Compared to pyramidal neurons, a recent transcriptomic profile study identified 344 genes with VEN-associated expression in the human ACC, including 215 higher and 129 lower expression genes, some for morphogenesis, dendritic branching and axon myelination or for neurological and psychiatric disorders in humans (Yang et al., 2019). Human ACC VENS have four lower-expression genes (HPCA, HPCALL, RALGDS, and NUBP2) that directly interact with RHOA, an important regulator of dendritic morphogenesis (Yang et al., 2019). Accordingly, "the single large basal dendrite of VEN might have resulted from a transformation of the genetic programs during evolution for pyramidal neuron development to modify the local dendrite in order to concentrate its growth in the primary component and suppress the secondary and tertiary branching" (Yang et al., 2019 and references therein). In these cells, the MEF2C high expression is also expected to induce the density of dendritic spines, whereas many myelination-related genes (such as MBP and PLP1) showed VEN-increased expression (Yang et al., 2019). This latter would make difficult the reliable identification of the VEN axon and to trace its pathway and ramification after myelination using the Golgi method, specially in samples obtained from adults. Some of these proposed implications for selective gene expression are supported by the morphological data obtained on dendrites and spines of putative VENS compared to pyramidal neurons, in the human ACC reported by Watson et al. (2006).

As occurs for the cell body shape, VENS would also display heterogeneity in the dendritic architecture. Banovac et al. (2019) proposed the division of VENS in two groups based on peak total dendritic length, i.e., small VENS with 1500–2500  $\mu\text{m}$ , and large VENS with 5000–6000  $\mu\text{m}$ . Correa-Júnior et al. (2020) suggested a continuous of branching patterns. Therefore, it would be interesting to consider how dendrites and spines can alter their shape, even within the same class of neuron, due to region-specific specializations and according to the local processing of the synaptic demand from different neural circuits. For example, there are clear variations in the branching pattern of basal dendrites, the length and distal apical ramification with a tuft aspect if pyramidal neurons are located in the superficial or deeper parts of the layer V in the rat frontal cortex (Morishima and Kawaguchi, 2006). Human pyramidal neurons also show a heterogeneity in dendritic morphology with four different main apical branching patterns in the hippocampal CA1 area (Benavides-Piccione et al., 2020). The axon in these cells can emerge either from the soma (66% of the cases) or from the initial portion of a basal dendrite (49% of the cases; Benavides-Piccione et al., 2020). Therefore, it would be plausible that a certain degree of plasticity and heterogeneity would also occur for VENS in specific areas, including the morphological features of their cell body shape (as mentioned above), dendritic branching, and spine features in the human brain. The 3D reconstruction of Golgi-impregnated VENS located in the layer V of the human ACC indicates a

continuum of dendritic and spine heterogeneity, ranging from less ramified to more branched ones, also including the presence and density of pleomorphic dendritic spines (Correa-Júnior et al., 2020). As mentioned in Cohen and Seeley (2015), "human VENs may be a heterogeneous population comprising projection neurons with diverse targets including the contralateral cortex." These are possibilities that deserve further development and interpretation with the available morphological data (Watson et al., 2006; Banovac et al., 2019, 2021; Correa-Júnior et al., 2020).

Let us consider again the fact that the cell body shape and the aspect of the primary dendrites served to identify putative VENs in the layer V of ACC and FI using different histological, neurochemical and transcriptomic markers, although there is not a single specific marker for these cells currently. Watson et al. (2006) used the characteristic cell body shape as one criteria for the identification of layer V human VENs, as follows: "The criteria for classifying a neuron as a VEN was an elongated, large soma in layer 5 of the FI or ACC, a prominent basal dendrite, and symmetrical morphology along the horizontal and vertical axes of the cell.... We further constrained the category to include only those neurons that had no additional dendrites or branching for a half-soma's distance along the length of the proximal dendrites." Even with this inclusion criteria, it would be that neurons in the layer V of the ACC shown in Watson et al. (2006) or in Correa-Júnior et al. (2020) are not identical to the MPN in the layer V of the prefrontal cortex (shown in Figure 5, right side, from Banovac et al., 2021). The neuron shown in Banovac et al. (2021) is a spindle-shaped cell with two ascending and descending dendrites devoid of any ramification along their long course, whereas the spindle-shaped neuron in Figure 4 from Correa-Júnior et al. (2020) displays a sparse ramification and no visible axon hillock arising from the cell body, for example. On the other hand, one spindle-shaped neuron in the PC (Figure 9) has both dendrites with a straight course and a sparse radial arborization, apparently more restricted than the neuron shown as a VEN in the ACC by Watson et al. (2006; shown in Figure 4B). This PC neuron would resemble the dendritic features of the neuron classified as a prefrontal MPN by Banovac et al. (2021; shown in Figure 3, right side). Let us also remember that VENs have been considered a subclass of MPNs (Banovac et al., 2019).

The description of the tuft aspect of the descending dendritic branches, from where the axon is observed (Banovac et al., 2019, 2021), is an important morphological feature evidenced in the original Golgi study of VENs, and the efforts to look for these specific cells in the human brain are impressive (Banovac et al., 2021). Notwithstanding, additional images for the descending dendrites in putative VENs have been reported. For example, an elongated rod-shaped neuron, classified as VEN and labeled with an antibody to vasopressin 1a receptor in the ACC of an adult male human, displayed a main descending dendrite with no tuft or brush-like branches (visible along approximately 100  $\mu\text{m}$  in Figure 3a in Allman et al., 2010). The same was found for two layer V rod-shaped and spindle-shaped VENs in the FI of a human male after immunocytochemical staining for DISC-1 (showing a straight descending dendrite visible along approximately 100  $\mu\text{m}$  in the left neuron in the Figure 11B from

Allman et al., 2010) and for a rod-shaped neuron stained for neurexin B (with a straight descending dendrite visible along approximately 125  $\mu\text{m}$  in Figure 10C in Allman et al., 2010). Hodge et al. (2020) provided the transcriptomic evidence that VENs are regionally specialized extracalcular-projecting excitatory neurons and included a biocytin-filled putative layer V VEN from the FI of an adult human in their report. This is the first electrophysiological single neuron patch-clamp recording for human putative VENs, whose data were obtained from *ex vivo* post-tumor insula tissue brain slices from a single human donor. These authors described some distinctive intrinsic membrane properties for putative VENs relative to neighboring pyramidal neurons. The local putative VEN had "the expected large spindle-shaped morphology with large caliber bipolar dendrites that extended into layer 6 (descending trunk), as well as toward the pial surface into upper layer 3 (ascending trunk). Dendritic branching was very simple, but with notable short and wispy lateral branches concentrated proximal to the soma. The axon could not be readily distinguished from these finer dendrites" (shown in Figure 5C in Hodge et al., 2020). Considering the likelihood of morphological heterogeneity within the same class of neurons (e.g., as occurs in pyramidal ones, Cambrinowski and Spruston, 2019; Benavides-Piccione et al., 2020; Ramo-Filho et al., 2021), it would be plausible to consider that the description of some morphological variability for the dendrites of VENs would not be conflicting; rather, they would be complementary to the original descriptions of these cells. The integration of multiple approaches and criteria are needed to reach a consensus in this field (Banovac et al., 2021).

There are few data on the axonal morphology of human VENs (but see relevant figures in Banovac et al., 2019, 2021). The adapted Golgi method used here for human postmortem brain (Dall'Oglio et al., 2010, 2013; Vicoque et al., 2018; Ramo-Filho et al., 2021) does not always provide the identification of the axon to trace its origin and ramification, which was also mentioned in Correa-Júnior et al. (2020). We described the diffuse axonal pattern (which would imply that the observed fibers would be not myelinated) in the neuropil of the human medial amygdaloid nucleus, and identified the axon hillock emerging from the cell body or in close primary dendrite in some local cells using this same Golgi technique (Dall'Oglio et al., 2013). However, the aspect of the axon is a limitation in the present study. In our samples (Figures 4–7), we were not confident to determine that a segment with varied tapering aspect would be an axon arising from a distal dendrite without having additional morphological evidence for the axonal diameter, angle of ramification, and caliber after branching (as shown by Ramón y Cajal in Figure 1 from Banovac et al., 2021) or having other supporting data from immunolabeled components of the axonal cytoskeleton, anterograde or retrograde tracing, intracellular dye, and/or electrophysiological recordings.

On the other hand, there was a spindle-shaped neuron in the PC with an axon hillock arising from the cell body (Figure 10). This would characterize it as a MPN according to Banovac et al. (2021). It is very important to determine if all VENs in the human FI and ACC (and, then, for all VENs to be considered true "VENs" in other areas of the human cerebral cortex) must have an

axon arising from a brush-like basal stem arborization (Banovac et al., 2019, 2021). Most histological, immunocytochemical, *in situ* hybridization, single nucleus RNA sequencing, and electrophysiological data will have to be reconsidered according to these results and checked for these specific basal dendritic and axonal characteristics. Alternatively, there might be a growing body of evidence in the literature that would indicate that layer V stick-like, rod- and/or spindle-shaped neurons are likely phenotypes of VENS that, independently of the determination of the strict aspect for their dendritic branching pattern, have been congruently reported as specialized cells with functional implications and abnormalities in various neuropathological conditions (see Figure 2 in Seeley, 2006; the morphological aspect of the soma and proximal dendrites of VENS in Figure 7 from Baghiani et al., 2015; Figure 2A and data in Jacot-Descombes et al., 2020) and Table 2 from Banovac et al., 2021).

The morphological description provided by Banovac et al. (2019, 2021) for VENS is an important piece for studying these cells. From other approaches, some variability in the spindle- to rod-shaped cell body or in the aspect of the descending dendrite of the cells identified as VENS were also obtained and/or are expected to occur. In this regard, the cellular components of the layer V of the FC represent an interesting area open to further research in the human brain. Here, spindle-shaped neurons might represent a spectrum that ranges from a morphology of two straight dendrites and rare ramification (Figure 9) or with an axon arising from the cell body (Figure 10) to a more profuse dendritic ramification, with various collateral branches and a radial extension, and no visible axon hillock in the cell body (Figures 6, 7). There are some hypotheses to be considered. These two former cells would resemble the description of MPNS (Banovac et al., 2021), the others would be a subtype of VENS. It would be also possible that VENS would show heterogeneity in their dendritic features, including "simple" forms observed in the ACC (Watson et al., 2006) in small and large VENS in terms of total dendritic length (Banovac et al., 2019). The possibility that spindle-shaped neurons can be VENS is consistent with the visualization of this cell body type by Ramón y Cajal in the FL. The length and aspect of the descending dendrites of putative VENS would allow some heterogeneity, as observed in rod-shaped neurons with a straight descending dendrite immunolabeled with antibodies to vasopressin 1a receptor, DISC-L, and for neurexedin B (Allman et al., 2005, 2010), after patch clamp recording and intracellular dye injection of a putative VEN with a large spindle-shaped soma and with no descending dendritic tuft (Hodge et al., 2020), and in rod-shaped neurons with a brush-like basal stem arborization and an axon origin distant from the cell body (Banovac et al., 2019, 2021). It is possible that not all spindle-shaped cell body cells be defined as VENS (Banovac et al., 2021), but putative VENS in layer V would be spindle-shaped, rod-shaped, stick, or corkscrew cells with regional specializations as observed with cooccurring techniques and neurochemical, electrophysiological, transcriptomic, and neuropathological characteristics (Allman et al., 2005, 2010; Baghiani et al., 2015; Yang et al., 2019; Hodge et al., 2020; Jacot-Descombes et al., 2020).

To advance this field, *Patch-seq* transcriptomes, a method relying on sequencing somatic RNA of single patch-clamp-recorded neurons, would help to identify if neuron types previously considered homogenous would be set into distinct subtypes (Fuzik et al., 2016; see a description on the difficulties related to the electrophysiological study of human VENS in Hodge et al., 2020). Highly multiplexed, high-resolution brain-wide cell type mapping, and high-throughput spatially resolved transcriptomics approaches would provide data to integrate individual cell type variability and connectivity-mapping information in specific brain areas (Close et al., 2021). These complementary experimental approaches can contribute with relevant data toward a unified, consensual neuronal classification based on a high-throughput single-cell transcriptomic-based taxonomy, building a probabilistic definition (Yuste et al., 2020) of spindle-shaped neurons as VENS (or not) in different brain areas and testing for intra- and inter-type variability in the phenotype of VENS at different ages. Importantly, "...the existence of cell states, spatial gradients of phenotypes and mixtures of differences and similarities in cross-species comparisons present challenges to a discrete and categorical perspective on defining cell types. Prematurely adopting an inflexible definition of types will obscure the significance of observed phenotypic variability and its biological interpretation..." while might raise a "...core and intermediate cells or the description of a cell type as a continuous trajectory in transcriptomic space" (Yuste et al., 2020).

It will be also crucial to determine if VENS emerge by differentiation of a prior cell within a cortical layer or migrate along the development toward specific parts of the cerebral mantle (Allman et al., 2005). We will have to determine if VENS exist only in cortical layer V. If so, it is interesting to question whether the spindle- to rod-shaped neuron observed in the inner layer VI of the FC (Figure 12) would resemble the shape of a layer V VEN or represents another molecularly different neuronal type in this polymorphic layer.

### Morphological Implications for Spindle-Shaped Neurons (or Putative Von Economo Neurons) in the Human Precuneus

Currently, there is no human or monkey neuron morphologically classified as VENS in the FC layer V available at the open database "NeuroMorpho.Org" (version 4.1.25, released 2021-07-22, content 151,303 neurons), where 70 reconstructed neurons are labeled as pyramidal ones in the layer III of Brodmann parietal area 7a of the rhesus monkey, and 14 reconstructed neurons in the layer III of Brodmann parietal area 7a of the baboon and vervet monkeys (original references available at <http://neuromorpho.org/KeywordResult.jsp?count=70&keywords=%22%20area%207a%22> and <http://neuromorpho.org/KeywordResult.jsp?count=14&keywords=%22brodmann%20area%207a%22>). Indeed, the cellular complexity, the inherent difficulties, and the technical limitations for studying the human postmortem brain tissue were reported previously (e.g., DaFoglia et al., 2013; Rebenberger et al., 2018; Visquez et al., 2018

and references therein; see also the effect of the embedding medium and tissue shrinkage in the VENs spiral-shaped and coiled aspect of primary dendrites in Banovac et al., 2019).

The emergence of VENs is not related to the relative brain size or encephalization of the studied species (Allman et al., 2010). There is a possibility that VENs might be associated with the mechanical challenges associated with larger, gyrencephalic brains along with other evolutionary adaptations (Jacob et al., 2021). Human VENs with sparse dendritic trees and symmetric ascending and descending main shafts were considered computationally simple compared to layer V pyramidal neurons, likely receiving few inputs within individual minicolumns for a rapid cortical radial signal transmission (Watson et al., 2006). Currently, VENs with particular neurochemical profiles, heterogeneous dendritic geometry and spine features can be part of a more complex scenario than previously perceived. VENs with more branched ascending and descending dendrites (Banovac et al., 2019; Correa-Júnior et al., 2020) can have additional biophysical properties with a higher surface for synaptic processing and plasticity modulated by pleomorphic spines. Together with the intrinsic properties of putative VENs' membrane (Hodge et al., 2020), the increased dendritic arbor might provide further possibilities for the connectivity repertoire, computational power, and elaboration of information by these cells, as described for other neuron types (Oakley et al., 2001; Wen et al., 2008; Spruston et al., 2013; Brunel et al., 2014; Eyal et al., 2018; Roffwagen and Lübke, 2016).

Von Economo neurons express dopamine D3 and D5 receptors, serotonin-1b and -2b receptors (Watson, 2006), GABA receptor subunit  $\beta$ , adenosine receptor  $\alpha$ -1A (Dulstra et al., 2018), activating transcription factor 3 of the CREB protein family, interleukin-4 receptor, and neurexin B with a possible connection of interoception/visceral states and social awareness (Allman et al., 2010; Stimpson et al., 2011; Raghani et al., 2015). The distribution of transmitter receptors in more superficial or deeper cortical layers in the human PC ("7A of the superior parietal lobule") suggests that ascending and descending dendrites from layer V cells may be modulated by different excitatory and inhibitory synaptic inputs (Palmieri-Gallagher and Zilles, 2019). It remains to be determined whether VENs have dendritic domains with different integrative, linear and non-linear properties, and specific neurochemically modulated firing pattern as well as if VENs have heterogeneous morphological and functional features related to their intracortical or extracerebral projections.

Furthermore, the presence, distribution, number, size, and shape of dendritic spines from proximal to distal dendritic segments in the PC spindle-shaped neurons need to be taken into account and compared to other VENs functional properties and electrophysiology in the future. Activity-driven changes in dendritic spines can occur in a region-specific manner and according to each network and neuron-specific synaptic demand, stability, and plasticity (Bermudez-Picocke et al., 2002; Chen et al., 2011; Araya et al., 2014; Hayashi-Takagi et al., 2015; Kasai et al., 2021). The spine-free dendritic zones are important for the synaptic integration (Kubota et al., 2016), but spines can provide

additional properties for the modulation of neural circuitries and balancing the multimodal information processing. Spines with different forms (including those with convoluted structure) can differ in their impact on the fine-tuned synaptic processing by having different postsynaptic density composition, number and type of postsynaptic receptors, subcellular components and organization, electrical and biochemical compartmentalization, clustering pattern, degree of cooperativity between adjacent spines and the parent dendrite, and impact on the neuronal voltage and output frequency (Rochefort and Konnerth, 2012; Yadav et al., 2012; Yuan, 2013; Stewart et al., 2014; Dall'Uglio et al., 2015; Tomassen and Nagerl, 2016; Berry and Nedivi, 2017; Lu and Zuo, 2017; Nakahata and Yasuda, 2018). Spindles, also found in PC spindle-shaped neurons, are active functional elements for synaptic development and maintenance that add to the neuronal plasticity repertoire and rapid integration of signals (Petralia et al., 2018, 2021). For example, NMDA activation can increase spine number, length, and contact with distal presynaptic elements (Zoccaro et al., 2020). There is a new avenue for research to establish the functional relation of layer V spindle-shaped neurons within the local cytoarchitecture of PC, including the activity of adjacent pyramidal and other "non-pyramidal" neurons and glia cells, in this same and in the adjacent cortical layers where ascending and descending dendrites are present.

#### Possible Functional Implications for Spindle-Shaped Neurons (or Putative Von Economo Neurons) in the Precuneus Within Integrated Brain Networks

The possibility of existence of VENs in the human PC is compelling. Some interesting points deserve further discussion. That is, primates have evolved cognitive mechanisms to understand and analyze complex social interactions (Freywald, 2020). Among the multiple cellular components with an intrinsic connectivity and functional networks in the human cerebral cortex (see further discussion in van den Heuvel et al., 2017), some large-scale circuits have been studied for their roles in resting state, attention and task-related activity or cognitive functions (Ng et al., 2016; Deming and Koenigs, 2020; Forlin et al., 2020; Kolb and Whishaw, 2021). High signal coherence within these networks makes the sub-components functionally coupled along varied timeframes (Ng et al., 2016 and references therein), such as in the DMN, which comprises the PC (Cavanna and Trimble, 2006) and the posterior cingulate cortex, the medial prefrontal cortex, and the bilateral intraparietal cortex/angular gyrus; in the "salience network" (SN), including the bilateral anterior insula and the dorsal ACC; and, in the "executive control network" (ECN) including the "frontoparietal network" (FPN) composed of bilateral middle frontal gyri and supramarginal gyri/inferior parietal lobe (Hidalgo-Lopez et al., 2021 and references therein), the intraparietal sulcus, and dorsal prefrontal cortex (Pak, 2012; Deming and Koenigs, 2020). The PC was also included in the ECN/frontoparietal control system for moment-to-moment tasks (Kolb and Whishaw, 2021).

As a hub region of the human brain, the PMEC components have been implicated in a broad array of cognitive and emotional

processes (Cavanna and Trimble, 2006; Cavanna, 2007; Yang et al., 2014; Zhang et al., 2014). Multimodal information processing is reflected in the patterns of functional connectivity of brain regions. The PMC can be subdivided into clusters exhibiting connectivity profiles that are positively and negatively correlated with areas of the DMN, with a gradual transition for the PMC's functional connectivity in the dorsal-ventral and anterior-posterior directions (Cauda et al., 2010). I.e., the dorsal-anterior parts were associated with regions subserving the control of attentional mechanisms, while the dorsal-posterior PMC, encompassing sections of Brodmann areas 7 and 31, was identified as a constituent of a FPN related to visual-spatial motion control (Cauda et al., 2010). On the other hand, the ventral-anterior PMC-compartment (Brodmann areas 23, 35, and 31) showed specific connections with a network strongly resembling of the task-negative DMN, while the central-posterior PMC (containing parts of Brodmann area 7) displayed links with a network related to visual information processing (Cauda et al., 2010). Employing diffusion tensor imaging and fiber tracking for the PMC, the dorsal-anterior PMC was linked up with sensorimotor areas whereas the dorsal-posterior portion was heavily tied to regions engaged in visual processing (Zhang et al., 2014). Another distinction was detected between the dorsal-central and dorsal-ventral PMC, with the former representing an associative area and the latter emerging as a transitional area between different circuitries as indicated by its highly varied set of cortical links (Zhang et al., 2014). The ventral-most section displayed extensive associations with limbic areas (Zhang et al., 2014). Taken together, these results underscore the PMC's relevance for a multitude of interacting, yet dissociable brain networks relevant for higher-level cognition. Notably, the human PC has one of the highest resting metabolic rates in the cerebral cortex and elaborates sensorimotor, visual, and cognitive/associative information (Margulies et al., 2009), also including self-centered mental imagery and consciousness (Cavanna, 2007), empathy and perspective-taking (Zeburadi et al., 2021), working memory (altered in cases of mild cognitive impairment, MCI, Yokoyama et al., 2010), episodic memory retrieval (Cavanna and Trimble, 2006), and metacognition processing (Ye et al., 2018).

In accordance with its involvement in cognitive functions, the human PC has been found to play a role in *g* (both structurally and functionally, see Menary et al., 2013; Basten et al., 2015; Hilger et al., 2017; Takeuchi et al., 2018). The construct of *g*, which is best conceptualized as "a distillate obtained from many diverse abilities" (Jensen, 1998), is regarded as the single best predictor of scholastic and vocational achievements as well as other socially relevant outcomes (Gottfredson, 1997; Jensen, 1998). Due to its association with neurological variables (Pecher et al., 2012; Gignac and Bates, 2017), *g* has become a major focus of investigation (Haier, 2016), and the influential "Parieto-Frontal Integration Theory" (Jung and Haier, 2007) posits that *g* is closely related to a task-invariant network comprising a circumscribed set of brain regions. Several lines of evidence support the existence of such a domain-general network (Basten et al., 2013; Hugdahl et al., 2015). Regions often implicated in the latter include prefrontal areas such as the dorsolateral prefrontal

cortex, the ACC and anterior insula, as well as parietal areas such as the intraparietal sulcus and PC (Jung and Haier, 2007; Nicodem et al., 2012; Basten et al., 2015; Assen et al., 2020; Martinez and Colson, 2021). As its prefrontal regions exhibit an intriguing overlap with those ones to which human VENs are restricted, the existence of VENs in the parietal portion of the "process-invariant network" associated with *g* has been predicted (Breton, 2021). The plausibility of this prediction, suggested by the present findings, is underscored by the fact that the PMC has been shown to play a role in two intrinsic connectivity networks (ICNs) known to substantially relate to *g*: namely, the central executive network (CEN) and the DMN (Cauda et al., 2010; Utevsky et al., 2014; Dubois et al., 2018; Uddin et al., 2019). The ability to activate the CEN while efficiently deactivating the DMN has been found to predict higher levels of *g* and abilities known to be highly saturated with *g*, such as working memory (Anticevic et al., 2012; Basten et al., 2013; Gignac, 2014; Kohino et al., 2014; Sherman et al., 2014; Breton, 2021; DeFerry et al., 2021). Thus, the DMN's relevance for *g* may stem from the fact that the insufficient and inefficient attenuation of this network may interfere with the successful employment of externally oriented, task-related attentional resources – a task accomplished by the ECN (Anticevic et al., 2012; Basten et al., 2013; Hugdahl et al., 2015; Breton, 2021).

In this context, Breton (2021) elaborated another possibility regarding the functional role of human VENs integrated in brain circuits. It was hypothesized that VENs might contribute to the emergence of *g* by functioning as cerebral pacemakers that promptly establish the coherence of neuronal oscillations (Breton, 2021). This conjecture is grounded in the "communication-through-coherence" hypothesis which contends that the interaction between connected neuronal populations is limited to temporal slots of synchronized oscillations (Fries, 2005, 2015). VENs would thus transmit rhythmic signal bursts across large distances that, after arriving at their targeted neuronal populations, entrain the latter to the signaled rhythm, thereby implementing oscillatory coherence. In this manner, VENs might function as so-called "herald neurons" which allow for the undelayed processing of subsequently arriving, more complex signals (Breton, 2021). This conceptualization might also help to elucidate the VENs presumed role in switching between the anticorrelated ECN and DMN (Menon and Uddin, 2010; Breton, 2021). These VENs would facilitate the unobstructed communication between critical frontal and parietal regions and subdivisions implicated in the ECN and DMN, respectively (Breton, 2021). Instead of directly activating the ECN while disabling the DMN (Sridharan et al., 2008), VENs (as "herald neurons") would rapidly establish coherence of oscillations between core regions of both networks prior to the phase of actual switching, leading to more efficient functional dissociation and thus decreased DMN interference with task-relevant mental activity originating from the ECN (Anticevic et al., 2012; Breton, 2021). The fact that different subdivisions of the PMC, including the PC, have been implicated in different ICNs (Margulies et al., 2009; Yang et al., 2014; Kolb and Whidaw, 2021) underlines the importance of efficient internetwork communication especially in this particular parietal

area to which VENS could significantly participate in (for additional data on PMC and PC connectome, tractography and white matter dissection, see Baker et al., 2018; Assen et al., 2020; Jitsishi and Yamaguchi, 2021). An intriguing objective for future research would be to establish whether the observed variation in dendritic architecture and spine features of spindle-shaped neurons, if they are VENS, exhibit individual differences and whether they are correlated with human cognition as reflected by constructs such as *g*.

### Vulnerability of Von Economo Neurons and the Pathological Findings Involving the Human Precuneus

The PC is also directly or indirectly affected by neuropsychiatric disorders in which VENS would show vulnerability or pathological involvement (Nirchinskiy et al., 1995; Allman et al., 2001, 2003; Watson, 2006; Cauda et al., 2014; Rajhari et al., 2015; Jacot-Descombes et al., 2020). Putative VENS are affected in the behavioral variant of the frontotemporal dementia with hindered social-emotional functions (Seeley et al., 2006; Seeley, 2008; Samille and England, 2014; Gami-David et al., 2019; Liu et al., 2019); in cases of agenesis of the corpus callosum with impairment in humor and judgment of scenes of social interactions; in the bipolar disorder (reviewed in Cauda et al., 2014; Rajhari et al., 2015) and autism spectrum disorder (Albani et al., 2005), and in familial dysautonomia with mood impairments (Jacot-Descombes et al., 2020).

Von Economo neurons were also related to schizophrenia (Kronie et al., 2017). The protein encoded by the gene DISC1 (disrupted in schizophrenia) had an evolutionary change in the line leading to humans, is related to neuronal migration and dendritic branching, and is preferentially expressed by VENS (Allman et al., 2003; Cauda et al., 2014; see the GWAS atlas at <https://atlas.cgh.com/> for current data on current DISC1 associations). In addition, reduced resting-state connectivity in the PC was correlated with apathy in patients with schizophrenia (Folini et al., 2020). Apathy is a motivational disorder incurring reduced or loss of goal-directed behavior, goal-directed cognitive processes, and emotion (Folini et al., 2020). In this regard, the PC connectivity was correlated with the severity of these symptoms and with alterations in the subjective experience of a continuous sense of the self, regarded as dysfunctional interactions between relevant brain regions (Folini et al., 2020). On the other hand, in few cases when epilepsy originated in the PC these were heterogeneous ictal symptoms, including body movement sensation or body image disturbance, somatosensory and visual auras, vestibular manifestations, eye movements, complex motor behaviors, and bilateral asymmetric tonic and hypermotor seizures (Blancoud et al., 2017; Yong et al., 2018).

A meta-analysis of functional MRI task-related activity of psychopathy drew attention to the increased activity predominantly in midline cortical regions overlapping with the DMN (i.e., dorsomedial prefrontal cortex, posterior cingulate, and PC) as well as with the medial temporal lobe (Dennig and Koenigs, 2020). Psychopathy was negatively

related to neural activity in dorsal ACC and was positively related to neural activity in a bilateral portion of medial parietal and occipital cortex (including posterior cingulate and PC), bilateral dorsomedial prefrontal cortex, right inferior frontal gyrus, right posterior orbitofrontal cortex, right medial temporal cortex (including amygdala), right hippocampus, and right parahippocampal gyrus (Dennig and Koenigs, 2020). Whereas DMN increases activity during self-referential processing and decreases activity during externally focused, non-self-referential tasks, FPN increases activity during cognitively demanding, externally focused tasks (Dennig and Koenigs, 2020). The SN, which is particularly important for detecting salient external stimuli, would be responsible for switching between the two anticorrelated networks, DMN and FPN (Dennig and Koenigs, 2020). In psychopathy, both the DMN components posterior cingulate cortex and PC not only are overactive across a variety of tasks but also less functionally and structurally connected to other DMN regions, including dorsomedial and ventromedial prefrontal cortex and other regions of the FPN (Dennig and Koenigs, 2020). One possibility is that psychopathic individuals fail to deactivate midline DMN regions during externally focused tasks and such failure could result in increased competition between DMN and externally oriented attention networks (such as FPN), disrupting the shift of attention to the external task, and leading to corresponding performance deficits (Dennig and Koenigs, 2020).

The PC neurons and circuitries can also be damaged in Alzheimer's disease (AD; Gelen et al., 2018; Beron et al., 2020) but see also Nelson et al., 2009). Metabolic reduction or hypoperfusion of the PC can be found in the early stages of AD, even before clinical diagnosis of dementia (Thomas et al., 2019). It is possible that hypoperfusion begins largely in PC and spreads to the parietal cortex and cingulate gyrus along with progression of the AD to other cortical areas (Aghajanyan et al., 2018). The PC is involved in working memory and its deactivation is associated with early MCI assessed by a validated clinical screening instrument for cognitive decline (Yokosawa et al., 2020). Moreover, the PC seems to be a region with high vulnerability to  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) deposition, showing major A $\beta$  load in A $\beta$ -PET and in association with cognitive decline in MCI and AD patients compared with healthy controls (Aghajanyan et al., 2018). White matter microstructure alteration occurs in the early stage of amyloid pathology and the strongest association was found in PC and the corpus callosum (Colls et al., 2021). The study of the cellular components of the PC and the timely diagnosis of an altered function in this brain area would direct new treatments to alleviate or prevent the progress of MCI and AD in the future.

In conclusion, we describe the presence of Nissl-stained spindle-shaped neurons in the anterior and central regions of the human PC with a cell body aspect in layer V compatible with putative VENS, as described in other brain areas. The Golgi morphological identity of these cells has now to be complemented with relevant neurochemical, electrophysiological, and transcriptomic-based identification

for unified cell type classification. Using the Golgi method, the PC spindle-shaped neurons in layer V and in the transition to layer VI have a dendritic architecture and spine diversity that suggest additional functional implications for the local cytoarchitecture and for the synaptic and information processing in integrated networks for higher-order activities (such as the DMN and g) in this multimodal complex area. Additional studies can elucidate the transcriptomic features of the PC spindle-shaped (or putative VFNs) and compare them with other cells in the human ACC and PI, considering network circuits demands with particular local features and/or diversity in the morphological and functional cellular specializations in the human brain. This will be an important achievement also for the comprehension of neuropsychiatric disorders involving the PC in the context of the PMC functioning.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: Raw data included in this manuscript were generated at the UFCSPA (Brazil) and are available from the authors. Data were originally presented and registered as a M.Sc. Thesis (2018) as follows: Fuentesda Villarroel, E.J. "Estado sobre os neurónios de von Economo do pré-córtex humano" (in Portuguese), Graduation in Neurosciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil, publicly registered at <https://www.luma.ufrgs.br/handle/10183/193616>.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Brazilian Ethics Committee from the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA; #62336116.6.0000.5345; 18718719.7.0000.5345, and 06273619.7.0000.5345) and the Federal University of Rio Grande do Sul (#18718719.7.5001.5347). The next of kin of the patients/participants provided their written informed consent for brain donation during autopsy.

## REFERENCES

- Aghajanian, G., Vergara, A., Gazzano, M., Manzoni, S., Gallocci, P., Bullock, C., et al. (2008). The prefrontal - a window for executive AP gathering in Alzheimer's disease pathology. *Neurodegener. Dis.* 10, 362–369. doi: 10.1007/s00401-008-0190-5
- Alkhus, I. M., Hakimi, A., Ervin, J. M., Nirenberg, L., and Hal, P. (2001). The anterior cingulate cortex: The evolution of an interface between emotion and cognition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 935, 107–117. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb04762.x
- Alkhus, I. M., Tenenah, N. A., Hebers, A. Y., Murray, K. E., Sommadossi, E., Ervin, J. M., et al. (2010). The von Economo neurons in forebrain and anterior cingulate cortex in great apes and humans. *Brain Struct. Funct.* 214, 495–517. doi: 10.1007/s00429-010-0234-0

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

FJF-V, JB, AH, and AAB-F: study concept and design; FJF-V, JB, and AAB-F: acquisition of data and two-dimensional reconstructions; JB and AAB-F: three-dimensional reconstructions; FJF-V, JB, AH, OJB, and AAB-F: critical interpretation of data and discussion and elaboration of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

Grants from the Brazilian Agencies CAPES and CNPq (Brazilian Ministry of Science Technology and Innovation "RRID"). Grant/Award Number: 314352/2020-1, SCR\_002876. Support for article fee payment from the Universität Odenburg, Odenburg, Germany.

## ACKNOWLEDGMENTS

Authors are thankful to Lucila L. Guíñerres and Nivaldo D. Correa-Junior (UFCSPA, Brazil) for their participation in our first Golgi experiments, and to Diego Rovaris (USF, Brazil) for his advices on the use of the GWSAS database.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnyn.2021.769228/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure 1** | Three-dimensional reconstruction of layer V Golgi-integrated from the human prefrontal cortex (corresponding to **Figure 5**).

**Supplementary Figure 2** | Three-dimensional reconstruction of layer V Golgi-integrated from the human prefrontal cortex (corresponding to **Figure 6**).

**Supplementary Figure 3** | Three-dimensional reconstruction of layer V and in the transition to layer VI Golgi-integrated from the human prefrontal cortex (corresponding to **Figure 7**).

**Supplementary Figure 4** | Golgi-integrated layer V pyramidal neuron from the human prefrontal cortex (central region, 01.1 mm posterior to the midpoint of the anterior commissure).

Alkhus, I. M., Watson, K. K., Tenenah, N. A., and Hakimi, A. T. (2005). Structure and function: a possible role for von Economo neurons. *Trends Cogn. Sci.* 9, 267–273. doi: 10.1016/j.tics.2005.06.008

Anticicic, A., Gok, M. W., Murray, J. D., Gierke, T. R., Wang, X. L., and Krynd, L. H. (2012). The role of default network dysfunction in cognition and disease. *Trends Cogn. Sci.* 16, 584–592. doi: 10.1016/j.tics.2012.10.008

Araya, R., Vogel, T. P., and Yuste, R. (2014). Spine neck length and synaptic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E2893–E2904. doi: 10.1073/pnas.1321889111

Aréllano, J. I., Benavides-Piccione, R., DeFelipe, J., and Yuste, R. (2007a). Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphology. *Front. Neurosci.* 1(35–143). doi: 10.3389/fnyn.01.01.013.2007

- Amblani, I. I., Daptoria, A., Fattin, A., Yuste, R., and DeFelipe, J. (2018). Non-synaptic dendritic spines in neocortex. *Neuroscience* 385, 464–489. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.12.015
- Assou, M., Gharret, M. F., Van Essen, D. C., and Darian, J. (2018). A domain-general cognitive core defined in a normally prefrontal human cortex. *Cereb. Cortex* 28, 4361–4380. doi: 10.1093/cercor/bhx223
- Baker, C. M., Busch, J. D., Briggs, B. G., Correy, A. R., Green, C. A., Moulton, K., et al. (2010). A connectomic atlas of the human cerebellum – chapter 6: the posterior cingulate cortex, medial prefrontal lobe, and posterior occipital lobes. *Open Neuroang. (Oligonews)* 11, 5054–5071. doi: 10.1093/ona/opp282
- Baron-Cohen, I., Sedrak, D., Blais, D., Akhavan, D., Ivanov Milevskic, N., Bailis, M. K., et al. (2019). Seno-to-dendritic morphology and axon origin site specify von Economo neurons as a subclass of modified pyramidal neurons in the human anterior cingulate cortex. *J. Anat.* 235, 691–699. doi: 10.1111/joa.12888
- Barow, L., Sedrak, D., Jadhav, M., and Petanjek, Z. (2021). Von Economo neurons – primate-specific or conspecific in the mammalian brain? *Front. Neural Circuits* 15, 714611. doi: 10.3389/fnirc.2021.714611
- Basson, U., Hilgen, K., and Dehaene, S. J. (2013). Where small brains are different: a quantitative meta-analysis of functional and structural brain imaging studies on intelligence. *Intelligence* 41, 14–27. doi: 10.1016/j.intell.2012.04.009
- Basson, U., Sadal, C., and Dehaene, S. J. (2014). Intelligence is differentially related to neural activity in the task-positive and the task-negative brain networks. *Intelligence* 41, 517–528. doi: 10.1016/j.intell.2013.07.006
- Benavides-Piccione, R., Bohbot-Vidal, L., DeFelipe, J., and Yuste, R. (2002). Cortical area and species differences in dendritic spine morphology. *J. Neurocytol.* 31, 337–346.
- Benavides-Piccione, R., Rapado-Keays, M., Fernandez-Segura, I., Estanislau, A., Sapia-Gonzalez, S., León-Espinoza, G., et al. (2020). Differential structure of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the human and mouse. *Cereb. Cortex* 30, 756–772.
- Berens, D., van Wassen, D., Oorschot, R., Strandberg, D., and Hassman, O. (2020). Medial temporal lobe connectivity and its association with cognition in early Alzheimer's disease. *Brain* 143, 1233–1248. doi: 10.1093/brain/awz469
- Berry, E. P., and Nedel, J. (2017). Spike dynamics are they all the same? *Neuron* 96, 45–55. doi: 10.1016/j.neuron.2017.08.048
- Breun, J. N., and Harris, K. M. (2009). "Ultrastructural analysis of spine plasticity," in *Encyclopedia Of Neuroscience*, ed. L. E. Squire (New York, NY: Elsevier), 11–17. doi: 10.1016/B978-0-08-040048-9.01171-1
- Brink, H. (1980). *Architonicity of the Mammal Telencephalon*. Corva: Benka Springer-Verlag.
- BRAIN Initiative Cell Census Network (BICCN) (2021). A multimodal cell census and atlas of the neocortical primary motor cortex. *Nature* 596, 84–102. doi: 10.1038/s41586-021-03690-0
- Friend, N., Hübner, Y., and Richardson, M. I. E. (2014). Single neuron dynamics and computation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 25, 148–155. doi: 10.1016/j.conb.2014.01.002
- Fruman, E., Ferrus-Pérez, A. S., Chen, X., and Billing, J. K. (2017a). Precursor proportions and cortical folding: a morphometric evaluation on diverse human samples. *Ann. Anat.* 211, 120–128. doi: 10.1007/s00405-017-0200-0
- Fruman, E., Pears, T. M., Chen, X., and Billing, J. K. (2017b). Evidence for expansion of the precursors in human evolution. *Brain Struct. Funct.* 222, 1073–1083. doi: 10.1093/brain/aww215
- Fruman, E., Rangel de Alarico, G., de la Calzosa, J. M., Martín-Luevano, M., Collin, B., and Jacobs, H. J. (2016). Midagittal brain variation and MRI shape analysis of the precursors in adult individuals. *J. Anat.* 224, 367–376. doi: 10.1111/joa.12155
- Ferrus, I., Merlo, S., Bada, E. T., Petanjek, Z. S., Erdos, R., Basso-Filho, A. A., et al. (2014). Inhibitory and mitogenic spines, and hemispherical synaptic specialization in the prefrontal medial neocortex of male and female rats. *J. Comp. Neurol.* 522, 2075–2088. doi: 10.1002/cne.23018
- Ferrus, O. J. (2021). Is there a "g neuron"? Establishing a systematic link between general intelligence (g) and the von Economo neurons. *Intelligence* 86, 100340. doi: 10.1016/j.intell.2021.100340
- Gay, R. (1989–1911). *Historie Du Systeme Nerveux De l'Homme et Des Vertébrés*. Paris: Médecin.
- Carvalho, L. H. G., Mirza, C., Fasilka, E. M., Loureiro, F., and Gomes, J. (2020). Caracterização ultraestrutural das vesículas completas e reduzidas do IQCCO-EE em idoso de baixo renda e psicofármaco. *Rev. Assoc. Geriatr. Gerontol.* 38, 715–723. doi: 10.1590/1806-9625.2019.14854
- Caude, F., Gharret, M. F., and Vercelli, A. (2014). Evolutionary appearance of von Economo's neurons in the mammalian cerebral cortex. *Front. Hum. Neurosci.* 8, 194. doi: 10.3389/fnhum.2014.00194
- Caude, F., Gharret, M. F., D'Agata, F., Socca, K., Ducca, S., Bagshaw, A. E., et al. (2020). Functional connectivity of the prefrontal cortex. *PLoS One* 15, e0231077. doi: 10.1371/journal.pone.0231077
- Cavanna, A. E. (2007). The precuneus and consciousness. *CNS Spectr.* 12, 545–552. doi: 10.1007/s10088-007-0295-9
- Cavanna, A. E., and Trimble, M. E. (2006). The precuneus: a review of its functional anatomy and behavioral correlates. *Brain* 129, 564–583. doi: 10.1093/brain/awh004
- Czerwikowski, M. S., and Spruston, N. (2009). Heterogeneity within classical cell types in the rat: lessons from hippocampal pyramidal neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 193–204. doi: 10.1038/nrn2583-019-0225-5
- Chen, X., Leshchiner, U., Richerson, P. J., Nelson, L., and Koenig, A. (2011). Functional mapping of single spines in cortical neurons in vivo. *Nature* 475, 366–365. doi: 10.1038/nature10193
- Chen, J. L., Long, H. B., and Zeng, H. (2021). Spatially resolved transcription in neuroscience. *Nat. Methods* 18, 23–25. doi: 10.1038/s41592-020-0948-9
- Collin, B., and Selby, W. W. (2015). Human von Economo neurons express transcription factors associated with Layer V subcortical projection neurons. *Cereb. Cortex* 25, 219–230. doi: 10.1093/cercor/bhu219
- Collin, B., Ingala, S., Top, H., Wernisch, V., Stehney, K. E., Tamassia, L., et al. (2021). White matter microstructure disruption in early stage amyloid pathology. *Alzheimer's Disor.* 38, 1123. doi: 10.1083/dad.11124
- Correa-Bautier, N. D., Reuter, J., Paus-Talbot, A., Hilbig, A., and Basso-Filho, A. A. (2020). Dendritic and spine heterogeneity of von Economo neurons in the human cingulate cortex. *Front. Synapt. Neurosci.* 11, 25. doi: 10.3389/fnyn.2020.00025
- Craig, A. D. (2009). How do you feel now? The sensory strands and human awareness. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 56–70. doi: 10.1038/nrn2355
- Dall'Oglio, A., Datta, A. C., Moreira, J. E., and Basso-Filho, A. A. (2015). The human medial neocortical structure, diversity, and complexity of dendritic spines. *J. Anat.* 227, 440–456. doi: 10.1111/joa.12594
- Dall'Oglio, A., Ferrus, D., Ferrus, J., Moreira, J. E., and Basso-Filho, A. A. (2016). The "single-section" Golgi method adapted for formalin-fixed human brain and light microscopy. *J. Neurosci. Methods* 180, 51–55. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.03.018
- Dall'Oglio, A., Xavier, L. L., Hilbig, A., Ferrus, D., Moreira, J. E., Achard, M., et al. (2020). Cellular components of the human medial neocortical nucleus. *J. Comp. Neurol.* 521, 889–911. doi: 10.1002/cne.2392
- Darvas, F., and Kesner, M. (2020). Functional neural correlates of psychopathy: a meta-analysis of fMRI data. *Trends Psychiatry* 10, 135. doi: 10.1002/psp.1394-420-0000-0
- Denay, B. T., Koenig, H., Wagen, T. D., and Grimmer, K. N. (2022). A meta-analysis of functional neuroimaging studies of self- and other judgments reveals a spatial gradient for mentalizing in medial prefrontal cortex. *J. Cogn. Neurosci.* 34, 1742–1752. doi: 10.1162/jocn\_a\_04203
- DeBruin, M., Ramphal, B., Pugliese, D., Raffanello, E., Tsai, G., Harsh, B., et al. (2021). Frontoparietal and default mode network connectivity varies with age and intelligence. *Develop. Cogn. Neurosci.* 48, 100928. doi: 10.1016/j.dev.2021.100928
- Dijkster, A. A., Liu, L. C., Niem, A. L., Geis, S. E., and Selby, W. W. (2018). von Economo neurons and look cells: a neurochemical signature linked to monoamine function. *Cereb. Cortex* 28, 151–164. doi: 10.1093/cercor/bhw358
- Dobson, J., Gohil, P., Paul, L. E., and Adolphs, R. (2018). A distributed brain network predicts general intelligence from resting-state human neuroimaging data. *PLoS Trans. R. Soc. Open Sci.* 5, 1702070. doi: 10.1098/rsos.170207
- Ferrus, O. J., Ferrus, T., and Ingelström, N. E. (2012). von Economo neurons in the anterior insula of the macaque monkey. *Neuron* 74, 481–489. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.003
- Fyfe, G., Verhoy, M. H., Tera-Silva, G., Deischer, V., Loider, J. C., Benavides-Piccione, R., et al. (2016). Unique membrane properties and enhanced signal

- processing in human neocortical neurons. *elife* 2020353. doi: 10.7554/eLife.20203
- Iqbal, C., Escobar, M. L., Barická, B., Ariyasu, G., Uebachs, J., Casanova, M. F., et al. (2008). Von Economo neurons are present in the dorsolateral (supplemental) prefrontal cortex of humans. *Neurosci. Lett.* 435, 215–218. doi: 10.1016/j.neulet.2008.02.048
- Feld, J. C., and Harris, K. M. (1999). "Dendritic structure." in *Dendrites*, eds G. Stuart, N. Spruston, and M. Häusser (New York, NY: Oxford University Press), 1–54.
- Forbes, C. G., Klock, L., Balke, L., Stoll, E., Gerson, P., Forth, M., et al. (2021). Reduced resting-state connectivity in the prefrontal is correlated with apathy in patients with schizophrenia. *Sci. Rep.* 10, 2616. doi: 10.1038/s41598-020-20539-2
- Forsyth, W. A. (2020). Social interaction networks in the primate brain. *Gen. Exp. Neurobiol.* 65, 48–58. doi: 10.1016/j.genb.2020.08.012
- Fox, J. (2002). A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through mutual coherence. *Trends Cogn. Sci.* 4, 474–480. doi: 10.1016/j.tics.2002.05.001
- Fox, J. (2013). Rhythms for cognition: communication through coherence. *Neurosci.* 88, 220–235. doi: 10.1016/j.neurosci.2013.09.004
- Funk, J., Zebraf, A., Mohr, Z., Colvigton, D., Yuzuguel, Y., Sasaki, G., et al. (2018). Identification of electrophysiological recordings with single-cell RNA-seq data identifies neuronal subtypes. *Nat. Biotechnol.* 36, 175–182. doi: 10.1038/s41587-018-0084-0
- Gabriel, P. L., and Scoville, J. (1986). The "single" neuron Golgi-staining procedure (methodological description). *J. Neurosci. Methods* 11, 221–230. doi: 10.1016/0165-0278(86)90084-0
- Garas-Paul, P., van Dillen, J., van Swieten, J. C., Pijnburg, T. A. L., Netherlands Brain Bank, Koozandeh, A. J. M., et al. (2019). von Economo neurons are part of a larger neuronal population that are selectively vulnerable in C9orf72 frontotemporal dementia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 45, 671–681. doi: 10.1111/naa.12538
- Gelin, T., Papavasiliou, S. T., Bercowski, A., Bigio, E. H., Weintraub, S., Rogstad, E., et al. (2016). Von Economo neurons of the anterior cingulate cortex in the lifespan and in Alzheimer's disease. *Cortex* 86, 69–77. doi: 10.1016/j.cortex.2017.10.015
- Gipps, G. E. (2014). Fluid intelligence shares closer to 60% of its variance with working memory capacity and is a better indicator of general intelligence. *Intelligence* 47, 122–133. doi: 10.1016/j.intell.2014.09.004
- Gjigjic, G. E., and Bates, T. C. (2017). Brain volume and intelligence: the mediating role of intelligence measurement quality. *Intelligence* 64, 18–28. doi: 10.1016/j.intell.2017.06.004
- González-Acosta, C. A., Escobar, M. L., Casanova, M. F., Picóneta, H. I., and Barická, E. (2015). Von Economo neurons in the human medial prefrontal cortex. *Front. Neurosci.* 12, 94. doi: 10.3389/fnins.2015.00094
- González-Barrón, M. M., Velázquez-Zamora, D. A., Olvera-Cortés, M. E., and González-Burgos, I. (2016). Changes in the plastic properties of hippocampal dendritic spines and in the structure of place learning in healthy aged rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 109, 98–105. doi: 10.1016/j.nlm.2015.11.047
- Goodstein, L. S. (1997). Why g matters: the complexity of everyday life. *Intelligence* 24, 79–112. doi: 10.1016/S0146-2998(97)00114-5
- Hare, R. J. (2016). *The Neuroscience of Intelligence*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hakem, A. Y., Sherwood, C. C., Boser, C. J., Dahl, C., Hsu, P. R., and Allman, J. M. (2009). von Economo neurons in the elephant brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 292, 242–248. doi: 10.1002/ajpa.20829
- Haroost, A., Bechar, O., Tran, T. P. Y., Harris, L., Hall, J., Dubois, P., et al. (2017). Prevalent epilepsy, clinical features and surgical outcomes. *Epilepsy Behav.* 73, 77–82. doi: 10.1016/j.ybeh.2017.03.028
- Hasebe-Tokuyama, A., Yaginuma, S., Nakamura, M., Shirai, F., Wu, Y. I., Leeburg, A. L., et al. (2015). Labeling and optical evoked synaptic memory trace in the motor cortex. *Neurosci.* 525, 330–338. doi: 10.1016/j.neurosci.2015.02.057
- Hirrlinger, M. S., Bockewitz, T. M., Marschall, S., Wimmer, R., Jucker, S., Sahani, V., et al. (2011). A large-scale nanoscopy and biochemistry analysis of postsynaptic dendritic spines. *Nat. Neurosci.* 24, 1333–1342.
- Hirrlinger, J., and Deroost, M. M. (2006). Dendritic spine pathology in neurodegenerative diseases. *Ann. Rev. Pathol.* 11, 221–256. doi: 10.1146/annurev-pathol.012603.014218
- Hidalgo-Lopez, L., Zekin, F., Harris, T., Rait, A., and Pflieger, B. (2021). Spectral density analysis of resting-state fMRI in healthy women reveals brain connectivity changes along the menstrual cycle. *Cerebrum*. doi: 10.1038/s41301-021-02447-w
- Hilget, K., Roman, M., Hilbach, C. J., and Batzer, U. (2017). Efficient hubs in the intelligent brain: Nodal efficiency of hub regions in the salience network is associated with general intelligence. *Intelligence* 68, 18–25. doi: 10.1016/j.intell.2016.11.001
- Hodge, R. D., Miller, J. A., Novotny, M., Kalmbach, B. E., Tang, J. T., Bakken, T. J., et al. (2020). Transcriptional evidence that von Economo neurons are regionally specialized intradendritically-projecting excitatory neurons. *Nat. Commun.* 11, 1172. doi: 10.1038/s41467-020-1892-5
- Hogdahl, K., Riedel, M. E., Mitra, A., and Specht, K. (2013). On the existence of a generalized non-specific task-dependent network. *Front. Hum. Neurosci.* 9, 430. doi: 10.3389/fnhum.2015.00430
- Joshi, L., Keri, M., Benson-Armas, S., Hecquembourg, S., Bagheri, M. A., Koppert, E., et al. (2021). Cytoskeletal characteristics associated with cognitive flexibility in rhesus. *J. Comp. Neurol.* 525, 3375–3388. doi: 10.1002/cne.25197
- Jost-Desmorées, S., Koshes, M., Brody, C. M. S., Witzels, B., Wirths, T., Nitsch, R., et al. (2020). von Economo neuron pathology in familial frontotemporal quantitative assessment and possible implications. *J. Neuropathol. Exper. Neurol.* 79, 1072–1083. doi: 10.1093/jnen/nlaa086
- Josani, A. R. (1998). *The g Factor: The Science of Mental Ability*. Westport, CT: Praeger.
- Joshi, T., and Yanagisaki, A. (2021). Posterior precuneus is highly connected to medial temporal lobe revealed by tractography and white matter dissection. *Neuroscience* 466, 172–185. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.05.009
- Jiang, R. F., and Hahn, R. J. (2007). The parieto-occipital integration theory (POIT) of intelligence: converging neuroimaging evidence. *Behav. Brain Sci.* 30, 147–147. doi: 10.1017/S0146255607001187
- Kaw, H., Ziv, N. E., Okabe, H., Taghizadeh, S., and Toyotomi, T. (2021). Spike dynamics in the brain, neural circuits and artificial neural networks. *Nat. Rev. Neurosci.* 22, 407–422. doi: 10.1038/s41583-021-00667-3
- Kelly, B., and Willoughy, J. D. (2021). *Fundamentals of Human Neuropsychology*. New York, NY: Worth Publishers.
- Kishinoue, H., Mizunuma, T., Yoda, K., Ochiai, M., and Ochiai, N. (2014). Coactivation of the default mode network regions and working memory network regions during task preparation. *Sci. Rep.* 4, 1–8. doi: 10.1058/srep02094
- Krause, M., Thoen, C., and Bähr, M. (2017). Ultrastructural alterations of von Economo neurons in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2017, 2624. doi: 10.1002/ajpa.23435
- Kubota, Y., Kaneko, F., Nomura, M., and Kawaguchi, Y. (2016). The diversity of cortical inhibitory synapses. *Front. Neural Circuits* 10, 27. doi: 10.3389/fnirc.2016.00027
- Li, L. C., Nawa, A. I., Hopler, M., Dvorny, J. L., Guic, S. E., Spina, S., et al. (2010). Preferential tau aggregation in von Economo neurons and fork cells in frontotemporal lobar degeneration with specific MAPT variants. *Acta Neuropathol.* 120, 529. doi: 10.1007/s00407-010-0800-0
- Li, L., and Zan, Y. (2017). Clustered structural and functional plasticity of dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 18–22. doi: 10.1073/pnas.2016.09.008
- Mai, J. K., Majumdar, M., and Paxinos, G. (2016). *Atlas of The Human Brain*. New York, NY: Academic Press.
- Mai, J. K., Paxinos, G., and Voss, T. (2006). *Atlas of The Human Brain*. New York, NY: Academic Press.
- Magnifico, D. S., Varrault, J. L., Kaly, C., Lachy, G., Ukhla, L. Q., Broad, B. E., et al. (2009). Precuneus shows intrinsic functional architecture in humans and monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 20088–20094. doi: 10.1073/pnas.0905104106
- Martinez, K., and Cohen, B. (2021). "Imaging the intelligence of humans." in *The Cambridge Handbook of Intelligence and Cognitive Neuroscience*, eds A. K. Barber, S. Karim, and R. J. Haier (Cambridge: Cambridge University Press).
- Menzey, K., Collins, P. E., Perin, J. N., Harrell, B., Olson, E. A., Barnes, V., et al. (2013). Associations between cortical thickness and general intelligence in children, adolescents and young adults. *Intelligence* 41, 597–606. doi: 10.1016/j.intell.2012.07.018
- Meron, V., and Ukhla, L. Q. (2018). Salience, switching, attention and control: a network model of medial function. *Brain Struct. Funct.* 214, 605–667. doi: 10.1007/s00429-018-0242-0

- Motokina, M., and Kawaguchi, Y. (2006). Recurrent excitatory patterns of corticostriatal pyramidal cells in frontal cortex. *J. Neurosci.* 26, 4394–4405. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0552-06.2006
- Myer, D. R., Hallgrímsson, T., Jacob, G. A., and Niitsu, S. I. (2012). Neocortical: from semi-automated to semi-automatic reconstruction of neuron morphology. *Front. Neuroinform.* 6:4. doi: 10.3389/fninf.2012.00004
- Nishikata, Y., and Suzuki, K. (2018). Hierarchy of spine structure, local signaling, translation and cytoskeletal organization. *Front. Synaptic Neurosci.* 10:28. doi: 10.3389/fnsyn.2018.00028
- Nelson, P. T., Abner, E. L., Scheff, S. W., Schmitt, E. A., Krysos, R. J., Jicha, G. A., et al. (2009). Alzheimer's-type neuropathology in the prefrontal cortex is not increased relative to other areas of neocortex across a range of cognitive impairment. *Neurosci. Lett.* 456, 336–339. doi: 10.1016/j.neulet.2008.11.004
- Nets, E. R., Fennema, M. E., Giedd, A. C. B., Oberoi, F. H., Häng, A., and Uebachs, L. L. (2017). Neuropathological findings in entorhinal cortex of subjects aged 50 years or older and their correlation with dementia in a sample from Southern Brazil. *Dement. Neurogeriatr.* 11, 14–11. doi: 10.1586/1944-7094.2016.01.01001
- Ng, K. K., Lo, J. C., Lim, J. K. W., Chee, M. W. L., and Zhou, J. (2016). Reduced functional segregation between the default mode network and the executive control network in healthy older adults: a longitudinal study. *NeuroImage* 133, 121–130. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.03.029
- Wanders, T. A., Laird, A. R., Raj, E. E., Duan, Y. M., Glahn, D. C., and Corbitt, C. S. (2012). Meta-analytic evidence for a supramodal cognitive control network subserving diverse executive functions. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* 12, 241–268. doi: 10.3758/s13415-011-0083-5
- Wanders, T. A., Glahn, D. C., Alkhan, J. M., Perl, D. P., Fennema, L. M., and Doh, P. K. (2009). A neocortical morphologic type unique to humans and great apes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1268–1273. doi: 10.1073/pnas.060526096
- Watanabe, E. A., Vogt, D. A., Morrison, J. H., and Holt, F. K. (1995). Spiral dendrites of the human anterior cingulate cortex. *J. Comp. Neurol.* 355, 27–37. doi: 10.1002/ajm.10050104
- Walkey, J. C., Schwabdt, F. C., and Coll, W. L. (2008). Dendritic calcium spines in layer 5 pyramidal neurons amplify and limit transmission of ligand-gated dendritic current to soma. *J. Neurophysiol.* 99, 164–177. doi: 10.1152/jn.2008.99.1.164
- Watanabe-Gallagher, N., and Zilles, E. (2016). Cortical layers: Cyto, cypto, cypto, and synaptic architecture in human cerebral areas. *NeuroImage* 130:55–61. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.08.025
- Perelli, R., and Avoni, G. A. (2013). Neuronal morphology goes digital: a research tool for cellular and systems neuroscience. *Neurosci.* 77, 1017–1038. doi: 10.1016/j.neurosci.2013.03.008
- Perks, L., Marjaga, S. M., Bavin, M. L., Hernandez, M. V., Murray, C., Rayle, N. A., et al. (2012). Brain white matter tract integrity as a neural foundation for general intelligence. *Behav. Psychol.* 71:1036. doi: 10.1037/a0028126
- Perelli, R. S., Wang, Y. X., Mattson, M. P., and Yao, P. I. (2011). Arranging structure in mammalian synapses. *Front. Synaptic Neurosci.* 10:4. doi: 10.3389/fninf.2011.00004
- Perelli, R. S., Yao, P. I., Kapogian, D., and Wang, Y.-X. (2011). Arranging structure in synapses – Perspective. *Front. Synaptic Neurosci.* 10:59032. doi: 10.3389/fninf.2011.00592
- Pick, R. (2002). The hierarchical structure network of the human brain: active, adaptive, and a priority map of the environment. *Neuroscientist* 18, 302–313. doi: 10.1177/1073858402144901
- Raghuwani, M. A., Szepeski, L. B., Trachten, E. R., Weigl, S. E., Strumelwitz, E., Butt, C., et al. (2015). An analysis of non-Euclidean neurons in the cerebral cortex of rhesus, marmoset, and prefrontal cortex. *Brain Struct.* 220, 290–2104. doi: 10.1016/j.brainstruct.2014.07.022
- Ramirez-Amaya, S., and Martínez, H. (2015). Anatomy and physiology of the double-bellied layer 5 pyramidal neuron. *Front. Cell. Neurosci.* 9:210. doi: 10.3389/fncl.2015.00210
- Rosa-Fillio, A. A., Garza, K. T.-K., Niquero, C. E., DeOglio, A., Oberoi, E., Jung, C. K., et al. (2021). The subcortical-dorsolateral-occipital continuum for the emergence and morphological heterogeneity of pyramidal neurons in the human brain. *Front. Synaptic Neurosci.* 13:686877. doi: 10.3389/fninf.2021.616877
- Roberge, B., DeOglio, A., Jung, C. K., and Rosa-Fillio, A. A. (2020). Structure and diversity of human dendritic spines evidenced by a new three-dimensional reconstruction procedure for Golgi staining and light microscopy. *J. Neurosci. Methods* 291:27–38. doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.09.001
- Rochford, N. L., and Kornhuber, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Rep.* 13, 699–708. doi: 10.1038/embo.2011.302
- Rohlfing, A., and Libbo, J. H. R. (2014). "Dendritic elaboration: morphology and chemistry," in *Neuroscience in the 21st Century*, eds D. W. Pfaff and N. D. Volkow (New York, NY: Springer), 223–264. doi: 10.1007/978-1-4939-347-4-11
- Roberge, M. A. S., and Lourenço, B. A. (2009). Inferior parietal lobectomy on cognitive decline in the elderly (IQCMHE): adaptive transcranial parietal use as a tool. *Cad. Saude. Pub.* 25, 1435–1445. doi: 10.1590/s1610-0412.2009000700003
- Saizillo, A. F., and England, E. (2014). Gene expression of non-Euclidean neurons from layer II/III entorhinal cortex in behavioral variant frontotemporal dementia. *Am. J. Neurodegener. Dis.* 3, 64–71.
- Schepers, F., Hoffhof, S. B., Winkler, L., Wolfberg, H., Hermann, K., Amunts, K., et al. (2008). Probabilistic maps, morphometry, and variability of cytoarchitectonic areas in the human superior parietal cortex. *Cereb. Cortex* 18, 2141–2157. doi: 10.1093/cercor/bhn241
- Schepers, F., Hermann, K., Hoffhof, S. B., Amunts, K., Schleicher, A., and Zilles, E. (2009). Observer-independent cytoarchitectonic mapping of the human superior parietal cortex. *Cereb. Cortex* 19, 846–867. doi: 10.1093/cercor/bhn116
- Schuldte, J., Argente-Garnier, I., Fink, B., Koenig, V., Loquin, M., Petzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological image analysis. *Nat. Methods* 9:678–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Scorioni, E., Polunin, S., and Ascoli, G. A. (2000). L-Mouse: a web-accessible tool for the analysis, comparison and search of digital reconstructions of neuronal morphologies. *Nat. Prot.* 3, 866–876. doi: 10.1038/prot200051
- Sesley, W. W. (2000). Selective functional, regional, and neuronal vulnerability in frontotemporal dementia. *Curr. Opin. Neurol.* 20, 701–707. doi: 10.1097/WCO.0b013e3181866d4d
- Sesley, W. W., Corbin, D. A., Allman, J. M., Macdonald, M. N., Bush, C., Miller, B. L., et al. (2006). Early frontotemporal dementia target neurons in rhesus monkeys and humans. *Ann. Neurol.* 60, 664–687. doi: 10.1002/ana.21059
- Sesley, W. W., Alvario, F. T., Gao, S. E., Craig, A. D., Allman, J. M., and Bush, L. E. (2012). Distinctive neurons of the anterior cingulate and frontal cortex: a historical perspective. *Cereb. Cortex* 22, 240–250. doi: 10.1093/cercor/bhr005
- Sherrin, L. E., Rade, J. D., Pickett, J. H., Moxon, C. E., McNeilly, K., and DiProsio, M. (2014). Development of the default mode and central executive networks across early adolescence: a longitudinal study. *Dev. Cogn. Neurosci.* 10, 149–158. doi: 10.1016/j.dcn.2014.08.002
- Spreitzer, N., Hlász, M., and Stuart, G. (2013). "Information processing in dendrites and spines," in *Fundamental Neuroscience*, eds L. E. Squire, D. Berg, T. E. Brown, S. Du, A. Ghosh, and S. C. Spear (Waltham, MA: Academic Press), 231–281. doi: 10.1016/B978-0-12-382570-2.00011-1
- Stefanova, D., Levkov, D. I., and Merzen, V. (2008). A critical role for the right fronto-insular cortex in switching between central-executive and default-mode networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 12285–12294. doi: 10.1073/pnas.0808051105
- Stewart, M. G., Popov, V. L., Kravt, I. V., Medvedev, M., and Darian, H. A. (2014). "Structure and complexity of the groups and dendritic spine." In *Synapse*, eds V. Pichal and N. Segal (New York, NY: Academic Press), 1–28. doi: 10.1016/B978-0-12-419675-0.00011-9
- Strassman, C. D., Tetzlaff, N. A., Allman, J. M., Jacobs, B., Bartl, C., Ho, C. P., et al. (2011). Biochemical specificity of non-Euclidean neurons in hominoids. *Am. J. Hum. Biol.* 23, 22–28. doi: 10.1002/ajhb.21132
- Takachi, H., Iki, Y., Nouchi, K., Yokoyama, K., Kotozaki, Y., Sakagami, S., et al. (2018). General intelligence is associated with working memory-related brain activity: new evidence from a large sample study. *Brain Struct. Funct.* 223, 4245–4258. doi: 10.1007/s00429-018-1747-9
- Thomas, B., Shethabani, B., Karamali, S., Serna, S., and Simon, B. S. (2019). Regional cerebral blood flow in the posterior cingulate and precuneus and the entorhinal cortical atrophy score differentiate mild cognitive impairment and dementia due to Alzheimer disease. *Am. J. Neurorehabil.* 46, 1658–1664. doi: 10.1177/154596219
- Torresani, I., and Niggel, V. (2010). Dendritic spines as tunable regulators of synaptic signals. *Front. Psych.* 1:001. doi: 10.3389/fpsy.2010.00001

- Trachten, L. C. (2009). *Van Economo and Koslow's Atlas of Cytoarchitectonics of the Adult Human Cerebral Cortex*. Basel: Karger.
- Udden, L. Q., Yao, B. T., and Spring, R. N. (2010). Towards a universal taxonomy of macro-scale functional human brain networks. *Brain Topogr.* 22, 926–942. doi: 10.1007/s10548-010-9070-z
- Uersky, A. V., Smith, D. V., and Haxel, S. A. (2010). Precuneus is a functional core of the default-mode network. *J. Neurosci.* 30, 932–940. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4227-10.2010
- van den Heuvel, M. P., Scholtens, L. H., Fekken Barrett, L., Hilgetag, C. C., and de Reus, M. A. (2013). Bridging cytoarchitectonics and connectomics in human cerebral cortex. *J. Neurosci.* 33, 15943–15948. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2038-13.2013
- Vogues, C. E., Reberger, R., Dell'Oglio, A., Cellegretti, M. E., and Basso-Filho, A. A. (2018). Neuronal types of the human central supralabial nucleus. *J. Comp. Neurol.* 565, 2776–2801. doi: 10.1002/cne.24527
- Wason, K. K. (2006). *The von Economo Neocortex: From Cells to Behavior*. Ph.D. Thesis, Pasadena, CA: California Institute of Technology.
- Wason, K. K., Jones, T. K., and Abrams, J. H. (2006). Dendritic architecture of the von Economo neocortex. *Neuroscience* 141, 1107–1112. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.04.081
- Wen, Q., Separmanto, A., Elson, G. N., Goodberg, A. E., and Chiklovskii, D. B. (2009). Morphology of the connectivity repertoire as a statistical principle governing the shapes of dendritic arbors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 12516–12521. doi: 10.1073/pnas.0901530106
- Wendrich, N., Dehaene, F., Sauer, S., and Swinnen, S. P. (2005). The role of anterior cingulate cortex and precuneus in the coordination of motor behavior. *Eur. J. Neurosci.* 22, 265–266. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1460-05.2005.16176a
- Wink, A., Gao, T. Z., Rodriguez, A., Hikosaka, D. L., Womni, S. L., Loebke, J. J., et al. (2012). Morphologic evidence for spatial channel spines in apical dendrites of monkey neocortical pyramidal cells. *J. Comp. Neurol.* 522, 2898–2922. doi: 10.1002/cne.22670
- Yang, L., Wang, Y., Yao, F., Sun, Y., Dai, J., and Su, B. (2019). Transcriptomic landscape of von Economo neurons in human anterior cingulate cortex revealed by microarrayed-oligo RNA sequencing. *Cereb. Cortex* 29, 838–853. doi: 10.1093/cercor/bhy286
- Yang, Y., Wang, H., Zhou, W., Qian, T., Sun, W., and Zhao, G. (2018). Electrostatic characteristics of neurons arising from the precuneus based on microelectrotopography (METG). *Hum. Brain Mapp.* 39, 1110–1120. doi: 10.1002/hbm.24119
- Yang, Z., Caddock, R. C., Margolis, D. S., Liu, C. G., and Milman, M. P. (2010). Common intrinsic connectivity motifs among posteromedial cortex subdivisions: insights from analysis of temporal dynamics. *NeuroImage* 49, 134–137. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.02.014
- Ye, Q., Zou, F., Lou, H., Hu, Y., and Kwok, S. C. (2018). Causal evidence for intrinsic recognition in human precuneus. *J. Neurosci.* 38, 6375–6387. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0840-18.2018
- Yokoyama, K., Kikami, K., Takao, R., Murakami, Y., and Basso, L. (2019). Functional decline of the precuneus associated with mild cognitive impairment: magnetotopographic observations. *PLoS One* 14(9):e0219377. doi: 10.1371/journal.pone.0219377
- Yusef, B. (2010). *Analysis Space*. Cambridge: The MIT Press.
- Yusef, B. (2012). Electrical compartmentalization in dendritic spines. *Ann. Rev. Neurosci.* 35, 429–449. doi: 10.1146/annurev-neuro-082111-150435
- Yusef, B., Hasegawa, M., Ading, M., Aguiló-Villars, A., Arnold, D., Armatas, R., et al. (2020). A connectivity-based taxonomic classification and nomenclature of neocortical cell types. *Nat. Neurosci.* 23, 1455–1464. doi: 10.1038/s41593-020-0483-4
- Zacarias, C. R., Shapiro, L., Martins-de-Souza, M. D., Preat, C., Muzritz, K., Seig, A., et al. (2003). Rapid 3D enhanced resolution microscopy reveals diversity in dendritic spine dynamics, regulation, and function. *Neuron* 37, 522–537. doi: 10.1016/j.neuron.2002.04.025
- Zeki, S., Isomura, M., Ungerleider, L., and Desimone, R. (1981). Quantitative analysis of basal dendritic tree of layer III pyramidal neurons in different areas of adult human frontal cortex. *Cell Tissue Res* 225, 161–169.
- Zelerski, N., Adler, E., Shup, A., Hinkeldey, I. P., Iann, M., and Levy, J. (2021). Myelinated axonal processes during synaptic maturation: beyond the effective synaptic coupling efficiency. *Front. Behav. Neurosci.* 15:700047. doi: 10.3389/fnbeh.2021.700047
- Zhang, Y., Fan, L., Zhang, Y., Wang, J., Zhu, M., Zhang, Y., et al. (2016). Connectivity-based parcellation of the human posteromedial cortex. *Cereb. Cortex* 26, 769–777. doi: 10.1093/cercor/bhw303

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organization, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claims that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Hammel, Wilmer, Esser, Hilg, Basso and Basso-Filho. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Artigo 3 – *Human cortical amygdala dendrites and spines morphology under open-source 3D reconstruction procedures***

**Periódico ao qual o artigo foi submetido:**

*Journal of Comparative Neurology* (ISSN: 1096-9861)

**Fator de impacto de acordo com o Journal Citation Report (2022):**

3.0

**Normas para a submissão:**

O manuscrito foi redigido de acordo com as normas disponibilizadas pelo periódico *The Journal of Comparative Neurology* para a categoria de artigos *Toolbox Articles*. As orientações e normas do periódico podem ser visualizadas pelo seguinte endereço eletrônico:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/10969861/homepage/forauthors.html>

## Human cortical amygdala dendrites and spines morphology under open-source 3D reconstruction procedures

Ketlyn T. Knak Guerra<sup>1</sup>, Josué Renner<sup>2</sup>, Carlos E. Vásquez<sup>1</sup>, Alberto A. Rasia-Filho<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Graduate Program in Neuroscience, Porto Alegre/RS, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Department of Basic Sciences/Physiology and Graduate Program in Biosciences, Porto Alegre/RS, Brazil

\*Equally contributed

**Correspondence to:** <sup>2</sup>Alberto A. Rasia-Filho, UFCSPA/DCBS/ Physiology, R. Sarmento Leite 245, Porto Alegre-RS 90170-050, Brazil

**Email:** KTKG, ketlyn.guerra@gmail.com; CEV, caesva1964@hotmail.com; JR, josuerenner@outlook.com; AARF: aarf@ufcspa.edu.br; rasiafilho@yahoo.com  
**AARF ORCID ID: 0000-0003-4623-5916**

**Acknowledgments/Funding:** Grants from the Brazilian Agencies CAPES and CNPq (Brazilian Ministry of Science Technology and Innovation "RRID"), Grant/ Award Number: 314352/2020-1, SCR\_002876

**Conflict of Interest Statement:** Authors declare no real or potential conflict of interest.

**Data Availability:** All new data are available from this article.

**Ethics Statement:** All ethical and legal procedures are according to the international regulatory standards based on the Helsinki Declaration of 1964. The original study was approved by Brazilian Ethics Committee from the Department of Forensic Medicine ("Instituto Geral de Perícias", City of Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, process # 03/06), the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA; process # 541/07), and Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS; process # 20080/09). Written informed consent was obtained with a next of kin who authorized the removal of part of the bilateral temporal lobe during autopsy at the morgue.

**Permission to reproduce images:** Figures and Tables are reused from Vásquez et al. (2018) "Neuronal types of the human cortical amygdaloid nucleus", *J. Comp. Neurol.* 526, 2776-2801. doi:10.1002/cne.24527; under licenses #5298970646885 and #5357301157281 from Copyright Clearance Center's RightsLink® originally published by John Wiley & Sons, Inc.

**Authors Contribution:** All authors contributed to the analysis of morphological data, elaboration of the manuscript, agreeing to this submitted version.

**Running title:** Human dendrites and spines

## Abstract

Visualizing nerve cells has been fundamental for the systematic description of brain structure and function in humans and other species. Different approaches aimed to unravel the morphological features of neuron types and diversity. The inherent complexity of the human nervous tissue and the need for proper histological processing have made studying human dendrites and spines challenging in *postmortem* samples. In this study, we used Golgi data and open-source software for 3D image reconstruction of human neurons from the cortical amygdaloid nucleus to show different dendrites and pleomorphic spines at different angles. Procedures required minimal equipment and generated high-quality images for differently shaped cells. We used the "single-section" Golgi method adapted for the human brain to engender 3D reconstructed images of the neuronal cell body and the dendritic ramification by adopting a neuronal tracing procedure. In addition, we elaborated 3D reconstructions to visualize heterogeneous dendritic spines using a supervised machine learning-based algorithm for image segmentation. These tools provided an additional upgrade and enhanced visual display of information related to the spatial orientation of dendritic branches and for dendritic spines of varied sizes and shapes in these human subcortical neurons. This same approach can be adapted for other techniques, areas of the central or peripheral nervous system, and for comparative analysis between species.

**Keywords:** Human Amygdala, Dendritic Spines, Synaptic Plasticity, Neuronal Morphology, Open-Source Software, Neuromantic, ilastik.

## Key points:

- We used an open-source neuronal tracing procedure for full 3D reconstruction of the cell body and the dendritic ramification of human Golgi-impregnated neurons.
- We describe the 3D reconstructions for the accurate visualization of heterogeneous dendritic spines using a supervised machine learning-based algorithm.
- Procedures require minimal equipment and generate high-quality images for human cortical amygdala neurons of different shapes.

#### 4. DISCUSSÃO

Nesta presente dissertação de mestrado foi estudada a forma neuronal por meio da união de técnicas histológicas e computacionais. Em Correa-Júnior et al. (2020), foi identificada uma heterogeneidade morfológica dos VENs presentes no ACC humano quando realizada a reconstrução 3D celular e dos espinhos dendríticos pleomórficos. Ou seja, tais células corticais de lâmina V podem ter dendritos e espinhos heterogêneos morfolologicamente, o que acrescenta maior possibilidade de integração e processamento de informação na área estudada com possíveis diferenças entre circuitos que modulam comportamentos sociais complexos em nossa espécie. Em Fuentealba-Villarroel et al. (2022), foi descrita a presença de neurônios com corpo celular fusiforme, sugestivos de VENs, no PC humano. Igualmente nessa área posteromedial cortical, tais células de lâmina V e parte superior de lâmina VI adicionam mais possibilidades de conexão e integração funcional local, além do realizado pelos neurônios piramidais adjacentes, fato que (em ambos locais estudados) também se relaciona com vulnerabilidades para doenças neurológicas e psiquiátricas e suas manifestações clínicas (como descrito nos artigos). Ademais, esses dados representam importante conhecimento para entendimento da citoarquitetura, filogenia, ontogenia e funcionamento de grandes circuitos do encéfalo humano, como para o processamento da atividade basal neural, das emoções, atenção e percepção de saliência dos estímulos percebidos e cognição, mormente para comportamentos sociais. Com base nisso, a seguir, discutir-se-ão dados recentes, publicados após os trabalhos de Correa-Júnior et al. (2020) e Fuentealba-Villarroel et al. (2022). Por fim, será discutido o novo método que utiliza algoritmos de aprendizado de máquina em “software” de livre acesso para a reconstrução 3D de espinhos dendríticos de neurônios humanos impregnados pela técnica de Golgi.

Embora o número de publicações sobre os aspectos morfológicos dos VENs tenha aumentado na última década, chama a atenção o fato de poucos trabalhos terem realizado reconstruções 3D para a descrição dessas células. No site Neuromorpho, que atualmente é a maior base de dados sobre morfologia neuronal e que contém mais de 180.000 reconstruções 3D de neurônios corticais e

subcorticais de um grande número de espécies, apenas 56 reconstruções de neurônios classificados como VENs estão anexadas (<https://neuromorpho.org/KeywordResult.jsp?count=56&keywords=%22von%20economomo%22>). Essas 56 reconstruções são provenientes de apenas três publicações científicas: 1) 29 reconstruções são do trabalho de Watson, Jones e Allman (2006) que investigou a “arquitetura dendrítica” dos VENs no ACC e FI humanos; 2) 24 reconstruções são de Banovac et al. (2019) que estudaram as características morfológicas do soma e da ramificação dendrítica dos VENs do ACC humano e 3) 3 reconstruções são de Correa-Júnior et al. (2020) que descreveram a heterogeneidade da ramificação dendrítica e dos espinhos dendríticos dos VENs do ACC humano. Além do baixo número de reconstruções, evidencia-se que não há registros da forma 3D de VENs de espécies que não a humana, embora esses neurônios tenham sido descritos em um considerável número de mamíferos (Butti et al., 2013; Evrard et al., 2012; Hakeem et al., 2009; Hof; Gucht, 2007; Raghanti et al., 2015, 2019; Jacob et al., 2021). Assim sendo, a ampliação do conhecimento acerca da forma 3D dos VENs de humanos e de espécies não humanas representa importante contribuição futura para o conhecimento sobre essas células.

Considerando isso, é relevante o fato de que, recentemente, os VENs tenham sido descritos em espécies em que até então não haviam sido encontrados. Por exemplo, Jacob et al. (2021) mostraram a presença de VENs no córtex fronto-insular de guaxinins empregando somente a técnica da tionina. O fenótipo observado – um corpo neuronal fusiforme com um dendrito primário apical e um dendrito primário basal surgindo de polos somáticos opostos – é idêntico aos fenótipos de VENs vistos em outras espécies (Jacob et al., 2021). Adicionalmente, em um recente *preprint*, Pellicer et al. (2022) descrevem a presença de “*spindle-shaped von Economo-like neurons*” nas lâminas corticais III e V do ACC e FI de ratos da espécie *Rattus norvegicus*. Nessa descrição, foram utilizadas as técnicas de Nissl (para identificação de fenótipo celular típico de VENs), histoquímica para a presença da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase (NADPH-d) e imunohistoquímica para identificação da óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS), óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS), proteína nuclear específica neuronal (NeuN), subunidade teta do receptor do ácido gama-

aminobutírico (GABRQ) e receptor D3 para dopamina (DRD3). Foram vistos neurônios fusiformes nas lâminas corticais III e V do FI e ACC que exibiram a presença de todos os marcadores citados, inclusive para D3R e GABRQ, descritos como marcadores específicos de VENs presentes no FI e ACC de humanos (Allman et al., 2005; Evrard; Forro; Logothetis, 2012; Dijkstra et al., 2018). Essa pode ser a primeira descrição de VENs em roedores.

Embora o trabalho de Pellicer et al. (2022) ainda não tenha sido revisado por pares e publicado em periódico científico, esses achados, caso confirmados, são de grande relevância e precisam ser levados em consideração na atual discussão sobre os aspectos filogenéticos dos VENs. A presença de tais neurônios nesses roedores se somaria aos estudos anteriores que descreveram os VENs em outros mamíferos como vacas, ovelhas, guaxinins, cavalos e porcos e confronta a ideia inicial (Nimchinsky et al., 1999; Allman et al., 2011) de que os VENs estariam presentes apenas em mamíferos com grandes encéfalos e que exibem um comportamento social e cognitivo complexo, como em primatas. A presença de VENs em espécies filogeneticamente distantes indica que essas células podem 1) ser o resultado de um processo evolutivo convergente de especialização de neurônios frente a uma pressão evolutiva imposta a muitas espécies (Raghanti et al., 2015; Jacob et al., 2021) ou 2) que podem ser uma população neuronal específica filogeneticamente muito mais antiga do que se considerava até hoje.

Considerando a segunda hipótese sobre a filogenia desses neurônios, o primeiro estudo comparativo (Nimchinsky et al., 1999) considerou a presença de VENs exclusiva para humanos e grandes macacos (bonobo, chimpanzé, gorila e orangotango) ao passo que esses neurônios foram relatados como ausentes nos macacos do Velho Mundo e do Novo Mundo, nos prossímios e nos “símios inferiores” (*Lesser Apes*). Tais dados levaram a concluir que os VENs “surgiram” nos hominídeos há 15 milhões de anos, quando os hominídeos divergiram evolutivamente dos macacos do Velho Mundo (Nimchinsky et al., 1999, Allman et al., 2005; Watson; Jones; Allman, 2006; Seeley et al., 2007; Pauc; Young, 2009; Allman et al., 2010; Evrard; Forro; Logothetis, 2012; Cauda, Geminiani; Vercelli, 2014; Kaufman et al., 2016; Kaya et al., 2016). A hipótese que se tinha até há pouco tempo, de acordo com o trabalho de Seeley et al. (2007), era a seguinte:

Parece que um ancestral comum a macacos e humanos, vivendo de 10 a 15 milhões de anos atrás, enfrentou pressões ambientais que selecionaram alguma nova capacidade de processamento de informações que os VENs pudessem fornecer. Tais pressões podem ter incluído, entre outras, o surgimento de grupos sociais maiores e mais complexos (exigindo que os indivíduos se modelassem e respondessem às intenções de outros) e maturação sexual retardada (exigindo vínculo materno-infantil de longo prazo). A própria encefalização pode ter criado uma pressão que favoreceu os cérebros contendo VENs, especialmente se os VENs forneceram uma capacidade adicional, como uma rápida condução de impulsos de longo alcance; rápida soma dos 'inputs' sinápticos convergentes ou uma alternância entre redes neurais recíprocas distribuídas, das quais cérebros grandes podem se beneficiar.

Se considerarmos que os VENs são uma população neuronal específica e que os neurônios observados por Pellicer et al. (2022) possam ser de fato VENs, tais células teriam “surgido” há muito mais tempo que os 15 milhões de anos sugeridos anteriormente. Isso porque devemos considerar que os seres humanos e os roedores divergiram do seu ancestral comum em algum momento entre 80 e 96 milhões de anos atrás (Nei; Xu; Glazko, 2001; Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004; Zhang et al., 2010). Essa possibilidade faria com que fosse necessária a reavaliação sobre a função dos VENs nos circuitos neuronais de mamíferos ao longo da evolução natural e levanta questionamentos sobre o porquê das espécies que apresentam essas células terem sido selecionadas ao longo do processo de evolução das espécies. Por outro lado, caso os VENs sejam o resultado de um processo evolutivo convergente (o que implicaria considerar que “surgiram” independentemente em várias espécies, não sendo procedentes de um ancestral comum entre elas), será preciso determinar qual (ou quais) pressão seletiva fez com que tantos mamíferos exibissem concomitantemente neurônios classificados morfologicamente como VENs em áreas corticais muito específicas (especificamente o ACC e o FI).

Pellicer et al. (2022) ainda propõe que neurônios *VEN-like* de ratos podem se apresentar heterogêneos quanto às suas ramificações dendríticas. Isto é, alguns neurônios podem ter arborização dendrítica esparsa, com poucas ramificações e

ramos colaterais, enquanto outros neurônios apresentaram uma arborização dendrítica com mais ramificações e ramos colaterais. A descrição dessa heterogeneidade vai ao encontro da diversidade morfológica dos VENs de lâmina cortical V do ACC humano relatada em Correa-Júnior et al. (2020). Tendo-se em consideração que as arborizações dendríticas podem apresentar uma grande variedade de formas e diferentes números de ramificações dependendo da área e camada cortical em que o neurônio está presente e que, adicionalmente, essas características morfológicas podem ser influenciadas por expressão genética, ambiente e demanda sináptica local (Stuart; Spruston; Häusser, 2006; Chavlis; Poirazi, 2021), variabilidade fenotípica em relação aos dendritos dos VENs poderia acontecer em várias espécies (como nos ratos). Uma vez que a transmissão sináptica requer um contato entre axônio e dendrito, a forma, o comprimento e a distribuição espacial dos dendritos determina quantos e quais axônios podem chegar até eles (Stepanyants; Chklovskii, 2005; Wen et al., 2009). Ou seja, o padrão de ramificação dendrítica determina quais e quantos *inputs* sinápticos um neurônio pode receber (Yuste; Tank, 1996; Wong; Ghosh, 2002; Emoto, 2011). Isso é especialmente importante na discussão sobre os achados sobre os VENs de forma geral uma vez que esses dados indicam a possibilidade de plasticidade sináptica para processamento de informações em diferentes espécies. Infelizmente, não há dados disponíveis na literatura científica sobre a ramificação dendrítica e/ou características dos espinhos dendríticos de neurônios classificados como VENs em espécies que não a humana. Esse fato configura possibilidades futuras para o estudo do VENs com a presente abordagem metodológica.

Além da heterogeneidade dendrítica e de espinhos vista nos VENs do ACC humano (Correa-Júnior et al., 2020), os corpos celulares desses neurônios, além de exibirem certa variabilidade quanto à sua forma (Nimchinsky et al., 1995), também podem apresentar variabilidade de tamanho. González-Acosta et al. (2022) fizeram considerações sobre os corpos celulares dos VENs distribuídos em diferentes regiões corticais humanas, a saber:

O grande tamanho do corpo celular dos VENs sempre foi uma característica predominante da sua forma. No entanto, esta não é uma característica invariável nas diferentes regiões corticais onde eles estão

presentes. Um estudo da camada V do córtex cingulado anterior humano (área de Brodmann 24, BA24) mostrou que os VENs têm um volume médio de corpo celular de  $20.822 \mu\text{m}^3$ , atingindo um tamanho 4,6 vezes maior que o corpo celular dos neurônios piramidais da mesma camada cortical (Nimchinsky 1999). Em contraste, um estudo mais recente propôs rotular essas células como VEN 1, VEN 2 e VEN 3, de acordo com sua forma em BA24, com comprimentos axiais de  $37,5 \mu\text{m}$ ,  $44,1 \mu\text{m}$  e  $43,8 \mu\text{m}$ , respectivamente (Correa-Júnior et al., 2020). Uma comparação da área de superfície do corpo neuronal dos VENs na porção dorsomedial de BA9 e BA24 indicou que VENs são menores em BA9 ( $536 \mu\text{m}^2 \pm 161,5 \mu\text{m}^2$ ) do que em BA24 ( $627,5 \mu\text{m}^2 \pm 96,92 \mu\text{m}^2$ ) (González-Acosta et al. 2018). Descobrimos recentemente que os VENs também estão localizados na superfície medial do córtex frontopolar humano. Em nosso estudo, a área do soma dos VENs foi medida em  $369,29 \mu\text{m}^2$  nesta região, em oposição a  $257,11 \mu\text{m}^2$  para células piramidais na mesma camada; ou seja, a proporção de tamanho de célula VEN:piramidal foi de aproximadamente 1,5 (González-Acosta et al., 2018). Esses dados sugerem que o tamanho do corpo celular do VEN varia de acordo com a região cortical onde essas células estão localizadas e que são menores no lobo frontal. Apesar de apresentarem variações regionais, os VENs são sempre maiores que os neurônios piramidais com os quais compartilham a mesma localização laminar.

A variabilidade do tamanho do corpo neuronal dos VENs em diferentes regiões corticais humanas levanta a possibilidade de que o tamanho do soma desses neurônios possa estar relacionado com outra implicação morfológica e/ou funcional como, por exemplo, o soma de menor tamanho dos VENs presentes nas regiões BA9 e BA10 poderia indicar que seus axônios não se estendam a longas distâncias (González-Acosta et al., 2022). A compreensão sobre os VENs dessas regiões corticais adicionais ainda passa por conhecer importante lacuna no conhecimento que é a arquitetura dendrítica desses neurônios. A presença de VENs em BA9 e BA10 foi relatada, respectivamente, por Fajardo et al. (2008) e González-Acosta et al. (2018). Fajardo et al. (2008) utilizaram a técnica de Nissl e buscaram a presença dos marcadores neuronais não específicos para VENs, NeuN e MAP2 (proteína associada a microtúbulo tipo 2). González-Acosta et al. (2018) usaram a marcação para NeuN. O fenótipo típico dos VENs em relação ao

corpo celular e dendritos primários foi observado com todas tais técnicas. Porém, em nenhuma das publicações a arborização dendrítica completa é descrita, visto que essa foi uma limitação metodológica (embora Fajardo et al. [2008] tenha utilizado MAP2, os autores não descrevem a arborização dendrítica completa dessas células). Sendo assim, os dendritos e os espinhos dendríticos dos VENs de BA9 e BA10 ainda necessitam ser descritos. O hiato no conhecimento sobre a arquitetura dendrítica dos VENs também ocorre para outras espécies que não a humana. Raghanti et al. (2015) apresentam fotomicrografias dos somas e dos dendritos primários de VENs presentes em “baleias-da-Groenlândia”, vacas, ovelhas, veados, cavalos, porcos e damões-do-cabo (*rock hyrax*) corados com a técnica de Nissl. Ou seja, por sua característica, a técnica de Nissl permite apenas a visualização do soma e da porção inicial dos dendritos primários. Outros estudos comparativos sobre os VENs em mamíferos não humanos também não descrevem a arquitetura dendrítica dessas células (Butti et al., 2014; Jacob et al., 2021). Portanto, a técnica de Golgi aliada à reconstrução 3D de imagem como aqui descritas podem ser aplicadas futuramente para estudo dessas estruturas neuronais a fim de se obter informações adicionais sobre os aspectos morfológicos dos VENs de humanos e de vários outros animais a fim de elucidar as características morfológicas e possíveis relações entre forma e função dessas células em diferentes regiões corticais.

Adicionalmente, deve-se atentar à classificação dos neurônios com base em múltiplos critérios atuais (Gouwens et al., 2020; Close; Long; Zeng, 2021). As primeiras tentativas de classificação neuronal foram feitas com base em critérios morfológicos (como os aspectos das ramificações dendríticas e forma do corpo celular) e com base na localização cortical das células neuronais (Ramón y Cajal, 1904; Yuste et al., 2020). Mais recentemente, técnicas genéticas, imunohistoquímicas, eletrofisiológicas e bioquímicas auxiliaram na classificação e possibilitaram distinguir subpopulações específicas de neurônios (Cembrowski; Spruston, 2019; Gouwens et al., 2020), embora não haja um consenso sobre quais métodos formariam uma base ideal para a classificação celular (Yuste et al., 2020). Nesse contexto, os dados apresentados no presente trabalho abrem importante discussão sobre o que pode ser considerado como um VEN (Banovac et al., 2019,

2021; Fuentealba-Villarroel et al., 2022; González-Acosta et al., 2022), quer seja um tipo de célula neuronal conservada ao longo da evolução, uma modificação morfológica de neurônios piramidais ou um tipo de célula especializada, regionalmente distinta e seletivamente evoluída no córtex cerebral (Banovac et al., 2019, 2021; Fuentealba-Villarroel et al., 2022). A morfologia deve se somar às técnicas complementares no estudo sobre os VENs objetivando uma classificação uniforme dessas células. Critérios adicionais baseados na parametrização de propriedades eletrofisiológicas, busca por marcadores genéticos e moleculares mais específicos e abordagens que visam identificar homologia entre espécies são alguns exemplos de técnicas que podem contribuir para alcançar tal objetivo (Yuste et al., 2020). Por exemplo, complementar à morfologia dos VENs, Dijkstra et al. (2018) identificaram os genes *ADRA1A*, *GABRQ* e *VMAT2* como sendo marcadores genéticos dos VENs de camada cortical V do ACC e FI humanos. Usando neurônios piramidais como referência, Yang et al. (2019), por meio de microdissecção a laser seguida de sequenciamento de RNA, identificaram a expressão de 344 genes relacionados com morfogênese, ramificação dendrítica e mielinização de axônios associados aos VENs do ACC e FI de humanos, sendo que 215 genes mostraram maior expressão e outros 129 genes menor expressão especificamente em VENs quando comparados com neurônios piramidais de mesma camada. Hodge et al. (2020), por meio do sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq), sugeriram que os VENs da camada cortical V do FI humano são neurônios extratelencefálicos regionalmente distintos dos neurônios piramidais de mesma camada. Adicionalmente, Hodge et al. (2020) fizeram o primeiro registro eletrofisiológicos dos VENs do FI humano usando *patch-clamp* e mostraram que esses neurônios possuem propriedades intrínsecas de membrana distintas dos neurônios piramidais de mesma camada cortical (embora esse dado tenha que ser considerado com cuidado tendo em vista que o registro foi feito em apenas três células disponíveis e obtidas de paciente submetido a cirurgia para epilepsia).

O consenso sobre a classificação dos VENs (Banovac et al., 2019, 2021) deve ser alcançado no futuro próximo pela integração dos resultados morfológicos e o uso de técnicas que busquem avaliar o transcriptoma de VENs. Um dos mais

promissores relaciona-se com a análise de dados de scRNA-seq que fornecem uma nova maneira promissora de definir os tipos de neurônios (Shekhar et al., 2016; Gouwens et al., 2020; Close; Long; Zeng, 2021; Larsson; Frisé; Lundeberg, 2021; Marx, 2021; Lee; Yoo; Choi, 2022). Essa técnica permite obter dados sobre milhares de genes de neurônios individuais e de milhares a milhões de células (Gouwens et al., 2020). A “transcriptômica espacial” (*Spatially Resolved Transcriptomics*) tornou possível a caracterização da expressão de centenas ou milhares de genes em neurônios ao mesmo tempo que preserva a estrutura microscópica do tecido analisado (Eng et al., 2019; Rodrigues et al., 2019; Soldatov et al., 2019; Lipovsek et al., 2021). Além disso, também foram desenvolvidas técnicas de “Patch-seq” (*Patch-sequencing*) em que é possível obter registros eletrofisiológicos, obter o perfil transcriptômico e relacionar esses dados com o estudo adequado da forma de uma mesma célula individualmente (Cadwell et al., 2016; Scala et al., 2019; Lipovsek et al., 2021). Somadas, essas técnicas permitem relacionar o perfil transcriptômico, a localização anatômica, a forma e as propriedades eletrofisiológicas de um mesmo neurônio possibilitando uma classificação plena e integrada. Para a classificação neuronal, Yuste et al. (2020) propõem que

A transcriptômica de células individuais está permitindo, pela primeira vez, medições sistemáticas de alto rendimento de células corticais e geração de conjuntos de dados que prometem ser completos, precisos e permanentes. As análises estatísticas desses dados revelam agrupamentos que geralmente correspondem a tipos de células previamente definidos por critérios morfológicos ou fisiológicos e que parecem conservados em áreas corticais e espécies. Contando com isso, propomos a adoção de uma taxonomia baseada em transcriptoma de tipos de células para o neocórtex de mamíferos. Essa classificação deve ser hierárquica e utilizar uma nomenclatura padronizada. Deve ser baseada em uma definição probabilística de um tipo de célula e incorporar dados de diferentes abordagens, estágios de desenvolvimento e espécies.

Idealmente, a morfologia e todas as abordagens complementares devem convergir e terem concordância entre si a fim de classificarem os VENs como uma determinada população neuronal. Considerando que “análises estatísticas de

dados de transcriptoma mostram *clusters* (grupos) que geralmente correspondem a tipos de células previamente definidos por critérios morfológicos” (Yuste et al., 2020), seria fundamental avaliar se o mesmo ocorre para os VENs de seres humanos e de outras espécies. Todos esses dados contribuiriam para sabermos onde os VENs se “encaixam” nos contextos genéticos, filogenéticos, citoarquitetônicos e funcionais neurais.

Complementando, para estudo da forma neuronal, foi apresentado um método para reconstrução 3D de espinhos dendríticos de neurônios humanos impregnados pela técnica de Golgi. Para tal, foi utilizada a ferramenta de classificação de “pixels” do “software” ilastik para a segmentação de imagens obtidas a partir de imagens de microscopia de luz. Em cada etapa do procedimento, comparamos continuamente as reconstruções às imagens originais obtidas com a microscopia a fim de não incluir artefatos nem distorcer o número original e a forma dos espinhos dendríticos amostrados. Isso gerou confiabilidade de que as reconstruções 3D estavam adequadas e fidedignas e que o presente e novo método pode ser empregado em estudos futuros para o estudo da forma neuronal e dos detalhes morfológicos relevantes dos espinhos dendríticos e sua relação com a hodologia neuronal e plasticidade sináptica.

Por ser, indiscutivelmente, uma das etapas mais desafiadoras de análise de bioimagens (Meijering et al., 2016), a etapa de segmentação ainda restringe a elaboração de reconstruções 3D (Liu et al., 2021). Elementos como diversidade de formas de um objeto de estudo, bordos não definidos entre objetos e fundo de microscopia, como “ruído” de imagens, dificultam ainda mais o processo de segmentação (Tripathi et al., 2012; Meijering et al., 2016). Desafio adicional envolve as imagens de neurônios impregnados pela técnica de Golgi uma vez que questões inerentes à técnica fazem com que existam variações sutis de contraste das estruturas impregnadas pelo nitrato de prata de uma secção histológica para outra ainda que proveniente da mesma amostra. Essas variações de contraste precisam ser levadas em consideração em qualquer método que tente elaborar reconstruções 3D a partir das imagens de microscopia, o que faz com que haja

limitações em outros procedimentos e o aprendizado de máquina tenha sido relevante para os presentes resultados satisfatórios.

A ação entre um observador experiente e “software” que utilizam algoritmos de aprendizado de máquina para a segmentação de imagem é muito adequada para a elaboração de reconstruções 3D de espinhos dendríticos a partir da técnica de Golgi. Enquanto o observador “ensina” a máquina o que é dendrito/espinho e o que é fundo de microscopia, a máquina, de acordo com o que foi mostrado pelo observador, “aprende” e generaliza para o restante das imagens o que “ela” aprendeu. Especificamente em relação ao ilastik, isso funciona especialmente bem. Isso porque o ilastik cria em tempo real a segmentação de imagem e esta pode ser conferida imediatamente pelo observador ao passo que os erros cometidos pela máquina podem ser prontamente corrigidos. Essa interatividade permite que o usuário seja capaz de elaborar segmentações de segmentos dendríticos simples (com poucos espinhos e com pouca variação de contraste) em um curto espaço de tempo enquanto, nos segmentos “mais desafiadores” (com muitos espinhos pleomórficos e/ou com grande variação de contraste), pode-se conseguir excelentes resultados ao fornecer à máquina mais exemplos corretos sobre o que cada uma das regiões da imagem representam e ao corrigir erros existentes. Neste contexto, uma das questões que surge é quando parar de “ensinar” a máquina. No nosso caso, paramos quando a segmentação representou da maneira mais adequada possível todos os segmentos dendríticos (sem “furos”, “buracos” ou qualquer tipo de distorção) e todos os espinhos e seus respectivos pescoços e cabeças, sem criar artefatos ou reconstruções 3D finais inadequadas.

O presente método pode ser útil para pesquisas futuras que utilizem a técnica de Golgi para estudar, por exemplo, como a forma, densidade, tamanho e volume dos espinhos se relacionam com o avanço da idade e/ou com doenças neurológicas e psiquiátricas. Em relação à idade, Benavides-Piccione et al. (2013) analisaram, por meio de injeções intracelulares do corante *Lucifer Yellow* e posteriores reconstruções 3D de imagens fluorescentes, mais de 8.900 espinhos ao longo dos dendritos apicais e basais de neurônios piramidais de lâmina cortical III do córtex cingulado de dois homens (falecidos aos 40 e 80 anos). Houve redução na densidade dos espinhos da amostra da pessoa com mais idade.

Especificamente, foi observado que os espinhos pequenos e curtos dos dendritos basais e espinhos de maior comprimento dos dendritos apicais se encontravam em menor número na amostra proveniente da pessoa que havia falecido com 80 anos (Ofer et al., 2022). Esses achados poderiam sugerir alterações seletivas nos espinhos dendríticos humanos ao longo do envelhecimento, mas se baseiam em somente um caso e os pesquisadores tiveram que “completar” as imagens dos espinhos dendríticos que não puderam ser reconstruídos 3D adequadamente com outro “software”.

Não obstante, certas doenças neurológicas geram mudanças nas características dos espinhos dendríticos. Por exemplo, na doença de Alzheimer, ocorre uma acentuada diminuição do número de sinapses e de espinhos dendríticos de neurônios do hipocampo e de regiões neocorticais (Walsh; Selkoe, 2004; Knobloch; Mansuy, 2008). Na doença de Parkinson, além da diminuição do comprimento das ramificações dos dendritos, também foi vista uma diminuição do número dos espinhos de neurônios da *substantia nigra pars compacta* (Patt et al., 1991). Alterações das características morfológicas dos espinhos também foram observadas em outras situações neurológicas e psiquiátricas como na doença de Huntington (Ferrante; Kowal; Richardson, 2001; Murmu et al., 2013), transtorno do espectro autista (Hutsler; Zhang, 2010; Gouder et al., 2019), síndrome de Down (Takashima et al., 1994; Real et al., 2018), esquizofrenia (Garey et al., 1998; Glantz; Lewis, 2001; Kolluri et al., 2005), depressão (Lorenzetti et al., 2009; Sawyer et al., 2012; Moda-Sava et al., 2019), dentre outras doenças (vejam-se Chidambaram et al., 2019; e Bączyńska et al., 2021 para revisões de literatura sobre o tema). Esses dados reforçam a concepção que a análise dos espinhos dendríticos a partir de imagens microscópicas associadas às reconstruções 3D em estados normal e patológico constitui-se, assim, elemento-chave para a compreensão dos mecanismos de plasticidade neuronal e dos mecanismos envolvidos com o surgimento e avanço de doenças que afetam o sistema nervoso humano (Bączyńska et al., 2021).

Uma vez que a técnica de Golgi pode ser empregada para estudo do tecido nervoso de outros animais (Hall, 1972; Somogyi; Cowey, 1981; Mantyh, 1982; Linberg; Suemune; Fisher, 1996; Rasia-Filho et al., 2004; Becker et al., 2018), o

presente método para reconstrução 3D de espinhos dendríticos também constitui ferramenta para estudos comparativos entre diferentes espécies. Por exemplo, neurônios do córtex cerebral humano apresentam maior densidade de espinhos e tais espinhos apresentam-se com cabeças maiores e com pescoços mais compridos quando comparados com os espinhos dendríticos de neurônios na mesma ou em diferentes localizações corticais em ratos (Benavides-Piccione et al., 2002; Ballesteros-Yáñez et al., 2010). Por exemplo, Ofer et al. (2022) estudaram os espinhos de neurônios de lâmina cortical III do córtex cingulado de humanos com neurônios piramidais de lâmina III do córtex somatossensorial de ratos. Os espinhos dendríticos humanos apresentaram-se com maior tamanho e comprimento comparativamente (Ofer et al., 2022). Essas diferenças morfológicas entre as espécies têm importante significado pois impactam nas propriedades sinápticas ao representarem maior chance de compartimentalizações elétricas e bioquímicas particulares para cada sinapse em cada tipo de espinho. O método aqui apresentado abre igualmente novas possibilidades para estudos comparativos sobre distribuição, número, forma e volume dos espinhos por meio de reconstruções 3D.

A segmentação de imagens de espinhos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi – e, conseqüentemente, a elaboração de reconstruções 3D – é uma tarefa computacional com potencial de estar plenamente resolvida nos próximos anos devido aos novos algoritmos computacionais promissores que utilizam aprendizado de máquina e, especialmente aprendizado profundo (*deep learning*), como estratégia de funcionamento (Lucas et al., 2021). O aprendizado profundo é uma subclasse do aprendizado de máquina (Laak; Litjens; Ciompi, 2021). Ele possibilita que modelos computacionais formados por várias “camadas” de processamento aprendam e representem dados com vários níveis de abstração, mimetizando como o cérebro humano percebe e entende informações (Voulodimos et al., 2018). Em algumas tarefas específicas (como a segmentação de imagens), o aprendizado profundo tem se mostrado capaz de superar métodos convencionais baseados em aprendizado de máquina ao permitir a elaboração de modelos de predição com desempenhos tão bons, ou até mesmo melhores, que o de humanos (Ardila et al., 2019; Hwang et al., 2019). Por exemplo, o aprendizado profundo

demonstrou resultados promissores em relação à análise de imagens médicas ao ser capaz de detectar retinopatia em fotografias de fundo de olho (Gulshan et al., 2016), classificar câncer de pele a partir de fotografias de pele (Esteva et al., 2017) e detectar metástases tendo como base imagens microscópicas de tecido linfático corado com hematoxilina e eosina (Bejnordi et al., 2017). Recentemente, o aprendizado profundo superou consistentemente radiologistas na discriminação de resultados de radiografias torácicas com as principais doenças que afetam essa região anatômica (Hwang et al., 2019). A popularização de algoritmos que utilizam o aprendizado profundo para a tarefa de segmentação de imagens e que tenham uma interface “amigável” para usuários que não possuem conhecimento computacional avançado está possibilitando análises de imagens, como as descritas, que há pouco tempo eram impossíveis. De fato, “software” livremente disponibilizados que utilizam ferramentas de aprendizado profundo como o DeepMIB (Belevich; Jokitalo, 2021), Cell Profiler (McQuin et al., 2018), DeepImageJ (Gómez-de-Mariscal et al., 2021), Uni-EM (Urakubo et al., 2019), CDeep3M (Haberl et al., 2018) e U-Net (Falk et al., 2019) já foram utilizados, com sucesso, em muitas tarefas envolvendo segmentação de imagens.

Esses algoritmos se tornam ainda mais poderosos quando combinados com projetos de “ciência cidadã” baseados na Web que contam com a ajuda de um grande número de voluntários para resolver problemas de pesquisa científica. A ciência cidadã tem se tornado uma solução respeitável e escalável para apoiar empreendimentos em várias áreas da ciência (Khatib et al., 2011). Um exemplo notório de como algoritmos de aprendizado de máquina em conjunto com a ciência cidadã podem resolver problemas científicos na Neurociência é o EyeWire. O EyeWire (<https://eyewire.org/>) é uma plataforma online em que os jogadores interagem com uma *interface* visual para mapear as estruturas neuronais de imagens obtidas por fMRI. As contribuições dos jogadores são combinadas com classificadores de aprendizado de máquina para criar um mapa detalhado tridimensional das conexões dos neurônios (Tinati et al., 2017). Com isso, avança-se consideravelmente no conhecimento sobre a caracterização dos circuitos neurais (Kim et al., 2014; Tinati et al., 2015, 2017). O mesmo poderia ser aplicado para a elaboração de reconstruções 3D de espinhos de neurônios impregnados

pela técnica de Golgi. Utilizando estratégias parecidas com as do EyeWire, ou seja, aliando a ciência cidadã a algoritmos de *machine* e *deep learning*, seria possível elaborar modelos computacionais que, após *input* suficiente de dados, iriam atingir um ponto em que conseguiriam segmentar essas imagens de interesse de forma automática. Um modelo computacional com essas características seria o novo “estado da arte” para a segmentação dos espinhos dendríticos e, conseqüentemente, seu estudo 3D com “software” sem custo e livre para utilização, sem gastos com compra de produto ou licenças anuais impeditivas em termos de orçamento para a Ciência em nosso país, por exemplo. Ademais, enquanto para a microscopia óptica estamos chegando no limite do que pode ser visto e extraído de informações por conta de resolução física óptica, as mesmas ferramentas de processamento de imagem ainda podem ser extremamente valiosas para o estudo de neurônios por meio de microscopia confocal ou de super-resolução, por exemplo.

Outra possibilidade, embora dispendiosa, para detalhamento da organização sináptica neuronal é aplicar uma variante da técnica de Golgi com “desimpregnação pela prata” e posterior coloração neuronal com ouro para visualizar neurônios usando microscopia eletrônica de transmissão (TEM) com o objetivo de observar e reconstruir tridimensionalmente a ultraestrutura dendrítica e sináptica (Frotscher et al., 1988; Fairén; Smith-Fernández, 1992). Ou seja, com essa variante da técnica de Golgi é possível coletar imagens do corpo celular e de toda a extensão dendrítica dos neurônios vistos sob microscopia óptica e, além disso, proceder ao estudo ultraestrutural dos elementos pré-sinápticos e pós-sinápticos com as imagens de TEM (Miller; Peters, 1981). As reconstruções 3D feitas a partir da segmentação imagens sequenciais obtidas com microscopia eletrônica envolvem o uso do “software” ilastik para estudo da estrutura e organelas em dendritos e axônios, terminações axonais, vesículas sinápticas e classificação dos tipos de sinapses (Maco et al., 2013, 2014; Kreshuk et al., 2014; Cali et al., 2015, 2019; Wernitznig et al., 2016; Lee, H. et al., 2019; Imbrosci; Schmitz; Orlando, 2022). Dessa forma, é possível empregar o ilastik para espinhos dendríticos e gerar maior aprofundamento de detalhes da estrutura sináptica por meio da segmentação

de imagens provenientes das microscopias óptica e eletrônica. Para os VENs humanos, tal tipo de estudo é inédito.

Por fim, é importante considerar as limitações dos estudos que buscam descrever a forma neuronal. O tecido encefálico humano *postmortem* passa por mudanças autolíticas inevitáveis após a morte e pelas etapas para o processamento histológico para posterior visualização microscópica (Zeba et al., 2008; Dall'Oglio et al., 2010, 2013, 2015; Reberger et al., 2018). Por exemplo, a análise dos dados morfométricos deve levar em consideração que as medidas do corpo celular neuronal e dos dendritos podem não ser as mesmas do que as *in vivo* uma vez que o tecido pode sofrer retração devido à fixação e as etapas histológicas de retirada de água e lipídios do tecido (Correa-Júnior et al., 2020; Fuentealba-Villaruel et al., 2022). Em alguns casos, o número de espinhos do tipo achatado e a identificação de espínulas podem ficar comprometidos (Fiala et al., 2002; García-López et al., 2007; Dall'Oglio et al., 2015). Além disso, no caso do método aqui elaborado para a reconstrução 3D dos espinhos, é o usuário quem decide e “ensina” a máquina como os “pixels” da imagem devem ser classificados. Nessa etapa, erros de interpretação podem ocorrer e prejudicar a segmentação. Portanto, os critérios de inclusão do tecido e dos neurônios que serão estudados, assim como o cuidado na classificação dos “pixels” para a segmentação de imagem, são essenciais para a elaboração de um estudo adequado que busque descrever a forma neuronal de forma fidedigna e de acordo com as melhores práticas científicas.

## 5. CONCLUSÕES

1) As reconstruções elaboradas com “software” *open-source* viabilizaram um estudo detalhado sobre a forma 3D do corpo celular, padrão de ramificação e distribuição espacial dos dendritos além da presença, distribuição, densidade e tipos dos espinhos dendríticos de neurônios humanos impregnados pela técnica de Golgi e observados sob microscopia de luz em campo claro;

2) Os dados obtidos referentes à heterogeneidade na forma 3D dos VENs presentes no ACC e dos *spindle-shaped neurons* pertencentes às regiões anterior e intermediária do PC devem ser levados em consideração nas discussões sobre citoarquitetura de cada uma das áreas estudadas, com possibilidade de aplicação para comparações filogenéticas e ontogenéticas e para o funcionamento de grandes circuitos neurais do encéfalo humano em situações normais e patológicas.

3) O aprendizado supervisionado de máquina se constitui como ferramenta importante para segmentação de imagens microscópicas para posterior reconstrução 3D de espinhos dendríticos de neurônios humanos impregnados pela técnica de Golgi;

4) Pelo fato de o novo método elaborado utilizar “software” *open-source*, a necessidade do uso de similares comerciais não será mais uma restrição para estudos futuros com reconstruções 3D dos espinhos dendríticos para descrição e compreensão da forma plena neuronal relevante a cada área do sistema nervoso.

## 6. PERSPECTIVAS

1) Utilizar o método apresentado para reconstrução 3D e estudar a forma, número e distribuição dos espinhos dendríticos de neurônios piramidais e de VENs do ACC em casos normais e em doenças neurológicas e psiquiátricas, como a doença de Alzheimer e demência fronto-temporal.

2) Estudar a estrutura do corpo neuronal, dos ramos dendríticos e dos espinhos dendríticos dos VENs presentes em BA9 e BA10 de seres humanos por meio da técnica de Golgi seguida de reconstruções 3D;

3) Usar a variante da técnica de Golgi com “desimpregnação pela prata” e posterior coloração neuronal com ouro a fim de utilizar a TEM para obtenção de imagens sequenciais que mostrem a ultraestrutura sináptica de VENs do FI e ACC humanos e prosseguir para a elaboração de reconstruções 3D das estruturas observadas por meio de segmentação de imagens com “software” *open-source* que utilizem estratégias de aprendizado de máquina.

4) Tornar a presente metodologia disponível para que demais pesquisadores possam utilizá-la nas mais diversas áreas do sistema nervoso humano e projetos de pesquisa onde morfologia se associa com funcionamento de forma inseparável mormente na relação entre espinhos dendríticos, transmissão e plasticidade sináptica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERENTES À INTRODUÇÃO E À DISCUSSÃO

ABDELLAH, M. et al. NeuroMorphoVis: a collaborative framework for analysis and visualization of neuronal morphology skeletons reconstructed from microscopy stacks. **Bioinformatics**, v. 34, n. 13, p. i574-i582, 2018.

ACCIAI, L.; SODA, P.; IANNELLO, G. Automated neuron tracing methods: an updated account. **Neuroinformatics**, v. 14, n. 4, p. 353-367, 2016.

AGANJ, I. et al. Unsupervised medical image segmentation based on the local center of mass. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

AL-ABSI, A. R. et al. Evaluation of semi-automatic 3D reconstruction for studying geometry of dendritic spines. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 94, p. 119-124, 2018.

ALLMAN, J. M. et al. Intuition and autism: a possible role for von Economo neurons. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 9, n. 8, p. 367-373, 2005.

ALLMAN, J. M. et al. The von Economo neurons in fronto-insular and anterior cingulate cortex in great apes and humans. **Brain Structure and Function**, v. 214, n. 5, p. 495-517, 2010.

ALLMAN, J. M.; HAKEEM, A.; WATSON, K. Book review: Two phylogenetic specializations in the human brain. **The Neuroscientist**, v. 8, n. 4, p. 335-346, 2002.

ARDILA, D. et al. End-to-end lung cancer screening with three-dimensional deep learning on low-dose chest computed tomography. **Nature Medicine**, v. 25, n. 6, p. 954-961, 2019.

ARELLANO, J. I. et al. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. **Frontiers in Neuroscience**, v. 1, p. 10, 2007.

ARGANDA-CARRERAS, I. et al. Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. **Bioinformatics**, v. 33, n. 15, p. 2424-2426, 2017.

ARSHADI, C. et al. SNT: a unifying toolbox for quantification of neuronal anatomy. **Nature Methods**, v. 18, n. 4, p. 374-377, 2021.

ASCOLI, G. A.; DONOHUE, D. E.; HALAVI, M. NeuroMorpho. Org: a central resource for neuronal morphologies. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 35, p. 9247-9251, 2007.

ASCOLI, G. A. et al. Generation, description and storage of dendritic morphology data. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1412, p. 1131-1145, 2001.

BĄCZYŃSKA, E. et al. Quantification of Dendritic Spines Remodeling under Physiological Stimuli and in Pathological Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4053, 2021.

BALLESTEROS-YÁÑEZ, I. et al. Alterations of cortical pyramidal neurons in mice lacking high-affinity nicotinic receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 25, p. 11567-11572, 2010.

BANOVAC, I. et al. Somato- dendritic morphology and axon origin site specify von Economo neurons as a subclass of modified pyramidal neurons in the human anterior cingulate cortex. **Journal of Anatomy**, v. 235, n. 3, p. 651-669, 2019.

BANOVAC, I. et al. Von Economo neurons—primate-specific or commonplace in the mammalian brain?. **Frontiers in Neural Circuits**, p. 89, 2021.

BASU, S. et al. 2dSpAn: semiautomated 2-d segmentation, classification and analysis of hippocampal dendritic spine plasticity. **Bioinformatics**, v. 32, n. 16, p. 2490-2498, 2016.

BASU, S. et al. Quantitative 3-D morphometric analysis of individual dendritic spines. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

BECKER, R. O. et al. Differently shaped spines increase in the posterodorsal medial amygdala of oxytocin knockout female mice. **Neuroscience Research**, v. 101, p. 53-56, 2015.

BEJNORDI, B. E. et al. Diagnostic assessment of deep learning algorithms for detection of lymph node metastases in women with breast cancer. **Jama**, v. 318, n. 22, p. 2199-2210, 2017.

BELEVICH, I.; JOKITALO, E. DeepMIB: user-friendly and open-source software for training of deep learning network for biological image segmentation. **PLoS Computational Biology**, v. 17, n. 3, p. e1008374, 2021.

BENAVIDES-PICCIONE, R. et al. Age-based comparison of human dendritic spine structure using complete three-dimensional reconstructions. **Cerebral Cortex**, v. 23, n. 8, p. 1798-1810, 2013.

BENAVIDES-PICCIONE, R. et al. Cortical area and species differences in dendritic spine morphology. **Journal of Neurocytology**, v. 31, n. 3, p. 337-346, 2002.

BENTIVOGLIO, M. et al. The original histological slides of Camillo Golgi and his discoveries on neuronal structure. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 13, p. 3, 2019.

BERG, S. et al. Ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. **Nature Methods**, [S.L.], v. 16, n. 12, p. 1226-1232, 30 set. 2019.

BERRY, K. P.; NEDIVI, E. Spine dynamics: are they all the same?. **Neuron**, v. 96, n. 1, p. 43-55, 2017.

BI, Q. et al. What is machine learning? A primer for the epidemiologist. **American Journal of Epidemiology**, v. 188, n. 12, p. 2222-2239, 2019.

BICANIC, I.; HLADNIK, A.; PETANJEK, Z. A quantitative Golgi study of dendritic morphology in the mice striatal medium spiny neurons. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 11, p. 37, 2017.

BLACKMAN, A. V. et al. A comparison of manual neuronal reconstruction from biocytin histology or 2-photon imaging: morphometry and computer modeling. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, p. 65, 2014.

BOSCH, C. et al. FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, p. 60, 2015.

BRÜNE, M. et al. von Economo neuron density in the anterior cingulate cortex is reduced in early onset schizophrenia. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 6, p. 771-778, 2010.

BRUSCO, J. et al. Inhibitory and multisynaptic spines, and hemispherical synaptic specialization in the posterodorsal medial amygdala of male and female rats. **Journal of Comparative Neurology**, v. 522, n. 9, p. 2075-2088, 2014.

BRUTON, O. J. Is there a “g-neuron”? Establishing a systematic link between general intelligence (g) and the von Economo neuron. **Intelligence**, 2021.

BUTTI, C. et al. Von Economo neurons: clinical and evolutionary perspectives. **Cortex**, v. 49, n. 1, p. 312-326, 2013.

BUTTI, C. et al. The cerebral cortex of the pygmy hippopotamus, *Hexaprotodon liberiensis* (Cetartiodactyla, Hippopotamidae): MRI, cytoarchitecture, and neuronal morphology. **The Anatomical Record**, v. 297, n. 4, p. 670-700, 2014.

CADWELL, C. R. et al. Electrophysiological, transcriptomic and morphologic profiling of single neurons using Patch-seq. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 199-203, 2016.

CALÌ, C. et al. 3D cellular reconstruction of cortical glia and parenchymal morphometric analysis from Serial Block-Face Electron Microscopy of juvenile rat. **Progress in Neurobiology**, v. 183, p. 101696, 2019.

CALÌ, C. et al. Three-dimensional immersive virtual reality for studying cellular compartments in 3D models from EM preparations of neural tissues. **Journal of Comparative Neurology**, v. 524, n. 1, p. 23-38, 2016.

CALLARA, A. L. et al. A smart region-growing algorithm for single-neuron segmentation from confocal and 2-photon datasets. **Frontiers in Neuroinformatics**, v. 14, p. 9, 2020.

CANNON, R. C. et al. An on-line archive of reconstructed hippocampal neurons. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 84, n. 1-2, p. 49-54, 1998.

CARLEO, G. et al. Machine learning and the physical sciences. **Reviews of Modern Physics**, v. 91, n. 4, p. 045002, 2019.

CAUDA, F.; GEMINIANI, Giuliano Carlo; VERCELLI, Alessandro. Evolutionary appearance of von Economo's neurons in the mammalian cerebral cortex. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 8, p. 104, 2014.

CEMBROWSKI, M. S.; SPRUSTON, N.. Heterogeneity within classical cell types is the rule: lessons from hippocampal pyramidal neurons. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 193-204, 2019.

CHAVLIS, S.; POIRAZI, P.. Drawing inspiration from biological dendrites to empower artificial neural networks. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 70, p. 1-10, 2021.

CHEN, Q. et al. Neural Message Passing for Objective-Based Uncertainty Quantification and Optimal Experimental Design. **ArXiv Preprint arXiv:2203.07120**, 2022.

CHEN, X. et al. Weakly Supervised Neuron Reconstruction From Optical Microscopy Images With Morphological Priors. **IEEE Transactions on Medical Imaging**, v. 40, n. 11, p. 3205-3216, 2021.

CHIDAMBARAM, S. Babu et al. Dendritic spines: revisiting the physiological role. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 92, p. 161-193, 2019.

CHKLOVSKII, D. B.; VITALADEVUNI, S.; SCHEFFER, L. K. Semi-automated reconstruction of neural circuits using electron microscopy. **Current opinion in neurobiology**, v. 20, n. 5, p. 667-675, 2010.

CLOSE, J. L.; LONG, B. R.; ZENG, H. Spatially resolved transcriptomics in neuroscience. **Nature Methods**, v. 18, n. 1, p. 23-25, 2021.

COBOS, I.; SEELEY, W. W. Human von Economo neurons express transcription factors associated with layer V subcerebral projection neurons. **Cerebral Cortex**, v. 25, n. 1, p. 213-220, 2015.

COLOMBO, M. N. et al. Comparative 2D and 3D Ultrastructural Analyses of Dendritic Spines from CA1 Pyramidal Neurons in the Mouse Hippocampus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1188, 2021.

CONTE, D. et al. A simple method defines 3D morphology and axon projections of filled neurons in a small CNS volume: Steps toward understanding functional network circuitry. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 351, p. 109062, 2021.

CORNEJO, V. H.; OFER, N.; YUSTE, R.. Voltage compartmentalization in dendritic spines in vivo. **Science**, v. 375, n. 6576, p. 82-86, 2022.

CORREA-JÚNIOR, N. D. et al. Dendritic and spine heterogeneity of von Economo neurons in the human cingulate cortex. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 12, p. 25, 2020.

CUNTZ, H. et al. The TREES toolbox—probing the basis of axonal and dendritic branching. **Neuroinformatics**, v. 9, n. 1, p. 91-96, 2011.

DALL'OGGIO, A. et al. Cellular components of the human medial amygdaloid nucleus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 521, n. 3, p. 589-611, 2013.

DALL'OGGIO, A. et al. The human medial amygdala: structure, diversity, and complexity of dendritic spines. **Journal of Anatomy**, v. 227, n. 4, p. 440-459, 2015.

DALL'OGGIO, A. et al. The “single-section” Golgi method adapted for formalin-fixed human brain and light microscopy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 189, n. 1, p. 51-55, 2010.

DAS, G.; REUHL, K.; ZHOU, R. The golgi–cox method. In: **Neural Development**. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 313-321..

DEFELIPE, J.. Sesquicentenary of the birthday of Santiago Ramón y Cajal, the father of modern neuroscience. **TRENDS in Neurosciences**, v. 25, n. 9, p. 481-484, 2002.

DEFELIPE, J. The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, p. 14, 2015.

DIJKSTRA, A. A. et al. Von Economo neurons and fork cells: a neurochemical signature linked to monoaminergic function. **Cerebral Cortex**, v. 28, n. 1, p. 131-144, 2018.

DONOHUE, D. E.; ASCOLI, G. A. Automated reconstruction of neuronal morphology: an overview. **Brain Research Reviews**, v. 67, n. 1-2, p. 94-102, 2011.

EBERWINE, J. et al. Local translation of classes of mRNAs that are targeted to neuronal dendrites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 13, p. 7080-7085, 2001.

EL NAQA, I.; MURPHY, M. J. What is machine learning?. In: **Machine Learning in Radiation Oncology**. Springer, Cham, 2015. p. 3-11.

EMOTO, K. Dendrite remodeling in development and disease. **Development, growth & differentiation**, v. 53, n. 3, p. 277-286, 2011.

ENG, C. Linus et al. Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH+. **Nature**, v. 568, n. 7751, p. 235-239, 2019.

ESTEVA, A. et al. Dermatologist level classification of skin cancer with deep neural networks [J]. **Nature**, v. 542, n. 7639, p. 115-118, 2017.

EVARD, H. C.; FORRO, T.; LOGOTHETIS, N. K. Von Economo neurons in the anterior insula of the macaque monkey. **Neuron**, v. 74, n. 3, p. 482-489, 2012.

EVARD, H. C. The organization of the primate insular cortex. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 13, p. 43, 2019.

FAIRÉN, A. Pioneering a golden age of cerebral microcircuits: the births of the combined Golgi–electron microscope methods. **Neuroscience**, v. 136, n. 3, p. 607-614, 2005.

FAIRÉN, A.; SMITH- FERNÁNDEZ, A. Electron microscopy of Golgi- impregnated interneurons: Notes on the intrinsic connectivity of the cerebral cortex. **Microscopy Research and Technique**, v. 23, n. 4, p. 289-305, 1992.

FAJARDO, C. et al. von Economo neurons are present in the dorsolateral (dysgranular) prefrontal cortex of humans. **Neuroscience Letters**, v. 435, n. 3, p. 215-218, 2008.

FALK, T. et al. U-Net: deep learning for cell counting, detection, and morphometry. **Nature Methods**, v. 16, n. 1, p. 67-70, 2019.

FENG, L.; ZHAO, T.; KIM, J. neuTube 1.0: a new design for efficient neuron reconstruction software based on the SWC format. **eNeuro**, v. 2, n. 1, 2015.

FERRANTE, R. J.; KOWALL, N. W.; RICHARDSON, E. P. Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. **Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 12, p. 3877-3887, 1991.

FERREIRA, T. A. et al. Neuronal morphometry directly from bitmap images. **Nature Methods**, v. 11, n. 10, p. 982-984, 2014.

FIALA, J. C.; SPACEK, J.; HARRIS, K. M. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders?. **Brain Research Reviews**, v. 39, n. 1, p. 29-54, 2002.

FROTSCHER, M.; KRAFT, J.; ZORN, U. Fine structure of identified neurons in the primate hippocampus: a combined Golgi/EM study in the baboon. **Journal of Comparative Neurology**, v. 275, n. 2, p. 254-270, 1988.

FUENTEALBA-VILLARROEL, F. J. et al. Spindle-Shaped Neurons in the Human Posteromedial (Precuneus) Cortex. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 13, 2022.

GALA, R. et al. Active learning of neuron morphology for accurate automated tracing of neurites. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, p. 37, 2014.

GARCÍA-LÓPEZ, P.; GARCÍA-MARÍN, V.; FREIRE, M. The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. **Progress in Neurobiology**, v. 83, n. 2, p. 110-130, 2007.

GAREY, L. J. et al. Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 65, n. 4, p. 446-453, 1998.

GAUTIER, M. K.; GINSBERG, S. D. A method for quantification of vesicular compartments within cells using 3D reconstructed confocal z-stacks: comparison of ImageJ and Imaris to count early endosomes within basal forebrain cholinergic neurons. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 350, p. 109038, 2021.

GEFEN, T. et al. von Economo neurons of the anterior cingulate across the lifespan and in Alzheimer's disease. **Cortex**, v. 99, p. 69-77, 2018.

GEZELTER, J. D. Open Source and Open Data Should Be Standard Practices. **The Journal Of Physical Chemistry Letters**, v. 6, n. 7, p. 1168-1169, 2 abr. 2015.

GLANTZ, L. A.; LEWIS, D. A. Dendritic spine density in schizophrenia and depression. **Archives of general psychiatry**, v. 58, n. 2, p. 203-203, 2001.

GLASER, J. R.; GLASER, E. M. Neuron imaging with Neurolucida—a PC-based system for image combining microscopy. **Computerized Medical Imaging and Graphics**, v. 14, n. 5, p. 307-317, 1990.

GOLGI, C. Sulla fina struttura dei bulbi olfattoria. **Rivista Sperimentale di Freniatria e di Medicina Legale.**, v. 1, p. 66-78, 1875.

GOLGI, C. Sulla sostanza grigia del cervello. **Gazetta Medica Italiana**, v. 33, p. 244-246, 1873.

GOLGI, C. Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso. Lettera al Prof. Luigi Luciani [La lettera fu pubblicata in parte nel Trattato di fisiologia dell'uomo del Professore Luigi Luciani ordinario di Fisiologia nell. **Università di Roma. (Societa editrice libraria. Milano 1901)**,” in **Opera Omnia**, v. 2, p. 1883-1902, 1901.

GOLGI, C. (1882–1883). “Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso. **Rivista Sperimentale di Freniatria**, anni 1882–83,” in **Opera Omnia**, Vol. I. Istologia Normale (1870–1883) (Milan: Ulrico Hoepli), 1903, 295–393.

GÓMEZ-DE-MARISCAL, E. et al. DeepImageJ: A user-friendly environment to run deep learning models in ImageJ. **Nature Methods**, v. 18, n. 10, p. 1192-1195, 2021.

GONZÁLEZ- ACOSTA, C. A. et al. Von Economo neurons: Cellular specialization of human limbic cortices?. **Journal of Anatomy**, 2022.

GONZÁLEZ-ACOSTA, C. A. et al. Von Economo neurons in the human medial frontopolar cortex. **Frontiers in Neuroanatomy**, p. 64, 2018.

GOUDER, L. et al. Altered spinogenesis in iPSC-derived cortical neurons from patients with autism carrying de novo SHANK3 mutations. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

GOUWENS, N. W. et al. Integrated morphoelectric and transcriptomic classification of cortical GABAergic cells. **Cell**, v. 183, n. 4, p. 935-953. e19, 2020.

GOUWENS, N. W. et al. Systematic generation of biophysically detailed models for diverse cortical neuron types. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2018.

GULSHAN, V. et al. Development and validation of a deep learning algorithm for detection of diabetic retinopathy in retinal fundus photographs. **Jama**, v. 316, n. 22, p. 2402-2410, 2016.

GU, X. et al. Anterior insular cortex and emotional awareness. **Journal of Comparative Neurology**, v. 521, n. 15, p. 3371-3388, 2013.

HABERL, M. G. et al. CDeep3M—Plug-and-Play cloud-based deep learning for image segmentation. **Nature Methods**, v. 15, n. 9, p. 677-680, 2018.

HAKEEM, A. Y. et al. Von Economo neurons in the elephant brain. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 292, n. 2, p. 242-248, 2009.

HALAVI, M. et al. Digital reconstructions of neuronal morphology: three decades of research trends. **Frontiers in Neuroscience**, v. 6, p. 49, 2012.

HALL, E. The amygdala of the cat: a Golgi study. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 134, n. 4, p. 439-458, 1972.

HARRIS, K. M.; JENSEN, F. E.; TSAO, B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. **Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 2685-2705, 1992.

HAYASHI-TAKAGI, A. et al. Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. **Nature**, v. 525, n. 7569, p. 333-338, 2015.

HAYASHI, Y.; MAJEWSKA, A. K. Dendritic spine geometry: functional implication and regulation. **Neuron**, v. 46, n. 4, p. 529-532, 2005.

HELM, M. S. et al. A large-scale nanoscopy and biochemistry analysis of postsynaptic dendritic spines. **Nature Neuroscience**, v. 24, n. 8, p. 1151-1162, 2021.

HODGE, R. D. et al. Transcriptomic evidence that von Economo neurons are regionally specialized extratelencephalic-projecting excitatory neurons. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2020.

HOF, P. R.; VAN DER GUCHT, E. Structure of the cerebral cortex of the humpback whale, *Megaptera novaeangliae* (Cetacea, Mysticeti, Balaenopteridae). **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 290, n. 1, p. 1-31, 2007.

HUANG, Q. et al. Weakly supervised learning of 3d deep network for neuron reconstruction. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 14, p. 38, 2020.

HUBER, K. M.; PAOLETTI, P.; SJÖSTRÖM, P. Jesper. Latest Advances on Excitatory Synapse Biology. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, p. 50, 2021.

HUTSLER, J. J.; ZHANG, H.. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. **Brain Research**, v. 1309, p. 83-94, 2010.

HWANG, E. J. et al. Development and validation of a deep learning–based automated detection algorithm for major thoracic diseases on chest radiographs. **JAMA Network Open**, v. 2, n. 3, p. e191095-e191095, 2019.

IMBROSCI, B.; SCHMITZ, D.; ORLANDO, M. Automated detection and localization of synaptic vesicles in electron microscopy images. **Eneuro**, v. 9, n. 1, 2022.

JACOB, J. et al. Cytoarchitectural characteristics associated with cognitive flexibility in raccoons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 529, n. 14, p. 3375-3388, 2021.

JACOT-DESCOMBES, S. et al. Von Economo Neuron Pathology in Familial Dysautonomia: Quantitative Assessment and Possible Implications. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 79, n. 10, p. 1072-1083, 2020.

JUNGBLUT, D. et al. SpineLab: tool for three-dimensional reconstruction of neuronal cell morphology. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 7, p. 076007, 2012.

KASAI, H. et al. Spine dynamics in the brain, mental disorders and artificial neural networks. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 407-422, 2021.

KAUFMAN, J. A. et al. Selective reduction of Von Economo neuron number in agenesis of the corpus callosum. **Acta Neuropathologica**, v. 116, n. 5, p. 479-489, 2008.

KAYA, Y. et al. Constantin von Economo (1876–1931) and his legacy to neuroscience. **Child's Nervous System**, v. 32, n. 2, p. 217-220, 2016.

KIM, Jinseop S. et al. Space–time wiring specificity supports direction selectivity in the retina. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 331-336, 2014.

KHATIB, F. et al. Algorithm discovery by protein folding game players. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 47, p. 18949-18953, 2011.

KIM, J. S. et al. Space–time wiring specificity supports direction selectivity in the retina. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 331-336, 2014.

KNOBLOCH, M.; MANSUY, I. M. Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. **Molecular Neurobiology**, v. 37, n. 1, p. 73-82, 2008.

KOH, I. Y. Y. et al. An image analysis algorithm for dendritic spines. **Neural Computation**, v. 14, n. 6, p. 1283-1310, 2002.

KOLLURI, N. et al. Lamina-specific reductions in dendritic spine density in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 6, p. 1200-1202, 2005.

KRESHUK, A. et al. Automated detection of synapses in serial section transmission electron microscopy image stacks. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. e87351, 2014.

KRESHUK, A.; ZHANG, C. Machine learning: advanced image segmentation using ilastik. In: **Computer Optimized Microscopy**. Humana, New York, NY, 2019. p. 449-463.

LARSSON, L.; FRISÉN, J.; LUNDEBERG, J. Spatially resolved transcriptomics adds a new dimension to genomics. **Nature Methods**, v. 18, n. 1, p. 15-18, 2021.

LECUN, Y.; BENGIO, Y.; HINTON, G. Deep learning. **Nature**, v. 521, n. 7553, p. 436-444, 2015.

LEE, H. et al. Along-axon diameter variation and axonal orientation dispersion revealed with 3D electron microscopy: implications for quantifying brain white matter microstructure with histology and diffusion MRI. **Brain Structure and Function**, v. 224, n. 4, p. 1469-1488, 2019.

LEE, J.; YOO, M.; CHOI, J. Recent advances in spatially resolved transcriptomics: challenges and opportunities. **BMB Reports**, v. 55, n. 3, p. 113, 2022.

LEE, K. et al. Convolutional nets for reconstructing neural circuits from brain images acquired by serial section electron microscopy. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 55, p. 188-198, 2019.

LI, X. et al. Interactive exemplar-based segmentation toolkit for biomedical image analysis. In: **2015 IEEE 12th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)**. IEEE, 2015. p. 168-171.

LINBERG, K. A.; SUEMUNE, S.; FISHER, S. K. Retinal neurons of the California ground squirrel, *Spermophilus beecheyi*: a Golgi study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 365, n. 2, p. 173-216, 1996.

LIPOVSEK, M. et al. Patch-seq: Past, present, and future. **Journal of Neuroscience**, v. 41, n. 5, p. 937-946, 2021.

LIU, X. et al. A review of deep-learning-based medical image segmentation methods. **Sustainability**, v. 13, n. 3, p. 1224, 2021.

LONGAIR, M. H.; BAKER, D. A.; ARMSTRONG, J. D. Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. **Bioinformatics**, v. 27, n. 17, p. 2453-2454, 2011.

LORENZETTI, V. et al. Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies. **Journal of affective disorders**, v. 117, n. 1-2, p. 1-17, 2009.

LUCAS, A. M. et al. Open-source deep-learning software for bioimage segmentation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 32, n. 9, p. 823-829, 2021.

LUENGO-SANCHEZ, S. et al. 3D morphology-based clustering and simulation of human pyramidal cell dendritic spines. **PLoS Computational Biology**, v. 14, n. 6, p. e1006221, 2018.

MACDONALD, L.; BALDINI, G.; STORRIE, B. Does super-resolution fluorescence microscopy obsolete previous microscopic approaches to protein co-localization?. **Membrane Trafficking**, p. 255-275, 2015.

MACO, B. et al. Correlative in vivo 2 photon and focused ion beam scanning electron microscopy of cortical neurons. **PloS One**, v. 8, n. 2, p. e57405, 2013.

MACO, B. et al. Correlative in vivo 2-photon imaging and focused ion beam scanning electron microscopy: 3D analysis of neuronal ultrastructure. In: **Methods in Cell Biology**. Academic Press, 2014. p. 339-361.

MAGLIARO, C. et al. Gotta Trace 'em All: a mini-review on tools and procedures for segmenting single neurons toward deciphering the structural connectome. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, p. 202, 2019.

MANCUSO, J. J. et al. Methods of dendritic spine detection: from Golgi to high-resolution optical imaging. **Neuroscience**, v. 251, p. 129-140, 2013.

MANTYH, P. W. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat, and monkey: a Nissl, Weil, and Golgi analysis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 204, n. 4, p. 349-363, 1982.

MARÉE, R. et al. Collaborative analysis of multi-gigapixel imaging data using Cytomine. **Bioinformatics**, v. 32, n. 9, p. 1395-1401, 2016.

MARX, V. Method of the Year: spatially resolved transcriptomics. **Nature Methods**, v. 18, n. 1, p. 9-14, 2021.

MEIJERING, E. et al. Imagining the future of bioimage analysis. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 12, p. 1250-1255, 2016.

MEIJERING, E. Neuron tracing in perspective. **Cytometry Part A**, v. 77, n. 7, p. 693-704, 2010.

MCQUIN, C. et al. CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. **PLoS Biology**, v. 16, n. 7, p. e2005970, 2018.

MILATOVIC, D. et al. Morphometric analysis in neurodegenerative disorders. **Current Protocols in Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 12.16. 1-12.16. 14, 2010.

MILLER, M.; PETERS, A. Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 203, n. 4, p. 555-573, 1981.

MINAEE, S. et al. Image segmentation using deep learning: A survey. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, 2021.

MIN, S.; LEE, B.; YOON, S. Deep learning in bioinformatics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 18, n. 5, p. 851-869, 2017.

MISHCHENKO, Y. et al. Ultrastructural analysis of hippocampal neuropil from the connectomics perspective. **Neuron**, v. 67, n. 6, p. 1009-1020, 2010.

MODA-SAVA, R. N. et al. Sustained rescue of prefrontal circuit dysfunction by antidepressant-induced spine formation. **Science**, v. 364, n. 6436, p. eaat8078, 2019.

MUKAI, H. et al. Automated analysis of spines from confocal laser microscopy images: application to the discrimination of androgen and estrogen effects on spinogenesis. **Cerebral cortex**, v. 21, n. 12, p. 2704-2711, 2011.

MURMU, R. P. et al. Dendritic spine instability leads to progressive neocortical spine loss in a mouse model of Huntington's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 32, p. 12997-13009, 2013.

MYATT, D. et al. Neuromantic—from semi-manual to semi-automatic reconstruction of neuron morphology. **Frontiers in Neuroinformatics**, v. 6, p. 4, 2012.

NAKAHATA, Y.; YASUDA, R.. Plasticity of spine structure: local signaling, translation and cytoskeletal reorganization. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 10, p. 29, 2018.

NAMKUNG, H.; KIM, S-H.; SAWA, A. The insula: an underestimated brain area in clinical neuroscience, psychiatry, and neurology. **Trends in Neurosciences**, v. 40, n. 4, p. 200-207, 2017.

NANDA, S. et al. Doubling up on the fly: neuromorpho. org meets big data. **Neuroinformatics**. 2015.

NEDERBRAGT, A. J. On the middle ground between open source and commercial software-the case of the Newbler program. **Genome Biology**, v. 15, n. 4, p. 1-2, 2014.

NEI, M.; XU, P.; GLAZKO, G. Estimation of divergence times from multiprotein sequences for a few mammalian species and several distantly related organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 5, p. 2497-2502, 2001.

NIKBAKHS, N.; BALEGHI, Y.; AGAHI, H.. Maximum mutual information and Tsallis entropy for unsupervised segmentation of tree leaves in natural scenes. **Computers and electronics in Agriculture**, v. 162, p. 440-449, 2019.

NIMCHINSKY, E. A. et al. A neuronal morphologic type unique to humans and great apes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 9, p. 5268-5273, 1999.

NIMCHINSKY, E. A. et al. Spindle neurons of the human anterior cingulate cortex. **Journal of Comparative Neurology**, v. 355, n. 1, p. 27-37, 1995.

NUSSER, Z. et al. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. **Neuron**, v. 21, n. 3, p. 545-559, 1998.

OBASHI, K.; TARASKA, J. W.; OKABE, S. The role of molecular diffusion within dendritic spines in synaptic function. **Journal of General Physiology**, v. 153, n. 4, 2021.

OFER, N. et al. Morphological analysis of human and mouse dendritic spines reveals a morphological continuum and differences across ages and species. **eNeuro**, p. ENEURO. 0039-22.2022.

OFER, N. et al. Ultrastructural analysis of dendritic spine necks reveals a continuum of spine morphologies. **Developmental Neurobiology**, 2021.

O'HALLORAN, D. M. Module for SWC neuron morphology file validation and correction enabled for high throughput batch processing. **PloS One**, v. 15, n. 1, p. e0228091, 2020.

PAIXÃO, G. M. M. et al. Machine Learning na Medicina: Revisão e Aplicabilidade. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 118, p. 95-102, 2022.

PASQUINI, L. et al. Salience network atrophy links neuron type-specific pathobiology to loss of empathy in frontotemporal dementia. **Cerebral Cortex**, v. 30, n. 10, p. 5387-5399, 2020.

PARAJULI, L. K.; KOIKE, M. Three-Dimensional Structure of Dendritic Spines Revealed by Volume Electron Microscopy Techniques. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 15, p. 39, 2021.

PAREKH, R.; ASCOLI, G. A. Neuronal morphology goes digital: a research hub for cellular and system neuroscience. **Neuron**, v. 77, n. 6, p. 1017-1038, 2013.

PAUC, R.; YOUNG, A.. The history of von Economo neurons (VENs) and their possible role in neurodevelopmental/neuropsychiatric disorders: a literature review. **Clinical Chiropractic**, v. 12, n. 3, p. 101-108, 2009.

PELLICER, F. et al. Identification of spindle-shaped von Economo-like neurons in the rodent *Rattus norvegicus*. 2022.

PETANJEK, Z. et al. Lifespan alterations of basal dendritic trees of pyramidal neurons in the human prefrontal cortex: a layer-specific pattern. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. 4, p. 915-929, 2008.

PATT, S. et al. Pathological changes in dendrites of substantia nigra neurons in Parkinson's disease: a Golgi study. **Histology and Histopathology**, 1991.

PCHITSKAYA, E.; BEZPROZVANNY, I. Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 12, p. 31, 2020.

PENG, H. et al. BigNeuron: large-scale 3D neuron reconstruction from optical microscopy images. **Neuron**, v. 87, n. 2, p. 252-256, 2015.

PENG, H. et al. V3D enables real-time 3D visualization and quantitative analysis of large-scale biological image data sets. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 348-353, 2010.

PETERS, A.; KAISERMAN- ABRAMOF, I. R. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. **American Journal of Anatomy**, v. 127, n. 4, p. 321-355, 1970.

PFEIFFER, T. et al. Chronic 2P-STED imaging reveals high turnover of dendritic spines in the hippocampus in vivo. **Elife**, v. 7, p. e34700, 2018.

POIRAZI, P.; PAPOUTSI, A. Illuminating dendritic function with computational models. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 6, p. 303-321, 2020.

QIAO, H. et al. Dendritic spines in depression: what we learned from animal models. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.

RAGHANTI, M. A. et al. A comparison of the cortical structure of the bowhead whale (*Balaena mysticetus*), a basal mysticete, with other cetaceans. **The Anatomical Record**, v. 302, n. 5, p. 745-760, 2019.

RAGHANTI, M. A. et al. An analysis of von Economo neurons in the cerebral cortex of cetaceans, artiodactyls, and perissodactyls. **Brain Structure and Function**, v. 220, n. 4, p. 2303-2314, 2015.

RAMÓN Y CAJAL, S. Estructura de los centros nerviosos de las aves. **Revista Trimestral de Histología Normal y Patológica**. 1888;1:1–10.

RAMÓN Y CAJAL, S. Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados, tomo II, primera parte. **Imprenta y Librería de Nicolas Moya, Madrid, reprinted by Graficas Vidal Leuka, Alicante 1992**, p. 399-402, 1904.

RASIA-FILHO, A. A. et al. Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. **Neuroscience**, v. 126, n. 4, p. 839-847, 2004.

RASIA-FILHO, A. A. et al. The subcortical-allocortical-neocortical continuum for the emergence and morphological heterogeneity of pyramidal neurons in the human brain. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 13, p. 7, 2021.

RASIA-FILHO, A. A. Unraveling Brain Microcircuits, Dendritic Spines, and Synaptic Processing Using Multiple Complementary Approaches. **Frontiers in Physiology**, p. 212, 2022.

RAT GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORTIUM. **Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution**. **Nature**, [S.L.], v. 428, n. 6982, p. 493-521, 1 abr. 2004. Springer Science and Business Media LLC.

REAL, Raquel et al. In vivo modeling of human neuron dynamics and Down syndrome. **Science**, v. 362, n. 6416, p. eaau1810, 2018.

REBERGER, R. et al. Structure and diversity of human dendritic spines evidenced by a new three-dimensional reconstruction procedure for Golgi staining and light microscopy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 293, p. 27-36, 2018.

ROCHEFORT, N. L.; KONNERTH, A. Dendritic spines: from structure to in vivo function. **EMBO Reports**, v. 13, n. 8, p. 699-708, 2012.

RODRIGUEZ, A. et al. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. **PloS One**, v. 3, n. 4, p. e1997, 2008.

RODRIGUES, S. G. et al. Slide-seq: A scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution. **Science**, v. 363, n. 6434, p. 1463-1467, 2019.

ROLLENHAGEN, A.; LÜBKE, J. H. R. Dendritic elaboration: morphology and chemistry. **Neuroscience in the 21st Century**, p. 225-264, 2016.

RUNGE, K.; CARDOSO, C.; DE CHEVIGNY, A. Dendritic spine plasticity: function and mechanisms. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, p. 36, 2020.

RUSZCZYCKI, B. et al. Three-dimensional segmentation and reconstruction of neuronal nuclei in confocal microscopic images. **Frontiers in Neuroanatomy**, p. 81, 2019.

SALEH, T. O. et al. Insular projections to the midbrain periaqueductal gray in the macaque monkey. In: **44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience** (abstract). 2014.

SANTOS, M. et al. von Economo neurons in autism: a stereologic study of the frontoinsular cortex in children. **Brain Research**, v. 1380, p. 206-217, 2011.

SAWYER, K. et al. Depression, hippocampal volume changes, and cognitive decline in a clinical sample of older depressed outpatients and non-depressed controls. **Aging & Mental Health**, v. 16, n. 6, p. 753-762, 2012.

SEELEY, W. W. et al. Distinctive neurons of the anterior cingulate and frontoinsular cortex: a historical perspective. **Cerebral Cortex**, v. 22, n. 2, p. 245-250, 2012.

SEELEY, W. W. et al. Divergent social functioning in behavioral variant frontotemporal dementia and Alzheimer disease: reciprocal networks and neuronal evolution. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 21, n. 4, p. S50-S57, 2007.

SEZGIN, E. Super-resolution optical microscopy for studying membrane structure and dynamics. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 29, n. 27, p. 273001, 2017.

SCALA, F. et al. Layer 4 of mouse neocortex differs in cell types and circuit organization between sensory areas. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2019.

SCHERMELLEH, L. et al. Super-resolution microscopy demystified. **Nature Cell Biology**, v. 21, n. 1, p. 72-84, 2019.

SCHIKORSKI, T.; STEVENS, C. F. Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 7, p. 4107-4112, 1999.

SCORCIONI, R.; POLAVARAM, S.; ASCOLI, G. A. L-Measure: a web-accessible tool for the analysis, comparison and search of digital reconstructions of neuronal morphologies. **Nature Protocols**, v. 3, n. 5, p. 866-876, 2008.

SEO, H. et al. Machine learning techniques for biomedical image segmentation: An overview of technical aspects and introduction to state-of-the-art applications. **Medical Physics**, v. 47, n. 5, p. e148-e167, 2020.

SHEKHAR, K. et al. Comprehensive classification of retinal bipolar neurons by single-cell transcriptomics. **Cell**, v. 166, n. 5, p. 1308-1323. e30, 2016.

SHOLL, D. A. The measurable parameters of the cerebral cortex and their significance in its organization. **Progress in Neurobiology**, v. 2, p. 324-333, 1956.

SOLDATOV, R. et al. Spatiotemporal structure of cell fate decisions in murine neural crest. **Science**, v. 364, n. 6444, p. eaas9536, 2019.

SOMOGYI, P.; COWEY, A. Combined Golgi and electron microscopic study on the synapses formed by double bouquet cells in the visual cortex of the cat and monkey. **Journal of Comparative Neurology**, v. 195, n. 4, p. 547-566, 1981.

SPACEK, J.; HARRIS, K. M. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 190-203, 1997.

SPRUSTON, N. et al. Information processing in dendrites and spines. In: **Fundamental Neuroscience**. Academic Press, 2013.

SPRUSTON, N. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 206-221, 2008.

STEPANYANTS, A.; CHKLOVSKII, D. B. Neurogeometry and potential synaptic connectivity. **Trends in neurosciences**, v. 28, n. 7, p. 387-394, 2005.

STOCKLEY, E. W. et al. A system for quantitative morphological measurement and electrotonic modelling of neurons: three-dimensional reconstruction. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 47, n. 1-2, p. 39-51, 1993.

STUART, G.; SPRUSTON, N.; HÄUSSER, M. (Ed.). **Dendrites**. Oxford University Press, 2016.

SURATKAL, S. S.; YEN, Y.; NISHIYAMA, J. Imaging dendritic spines: molecular organization and signaling for plasticity. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 67, p. 66-74, 2021.

SVOBODA, K. The past, present, and future of single neuron reconstruction. **Neuroinformatics**, v. 9, n. 2, p. 97-98, 2011.

TAKASHIMA, S. et al. Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome. **Journal of Intellectual Disability Research**, v. 38, n. 3, p. 265-273, 1994.

TAYLOR, C. R.; LEVENSON, Richard M. Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. **Histopathology**, v. 49, n. 4, p. 411-424, 2006.

TINATI, R. et al. An investigation of player motivations in Eyewire, a gamified citizen science project. **Computers in Human Behavior**, v. 73, p. 527-540, 2017.

TINATI, R. et al. 'Command'and Conquer: Analysing Discussion in a Citizen Science Game. In: **Proceedings of the ACM Web Science Conference**. 2015. p. 1-10.

TØNNESEN, J. et al. Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 5, p. 678-685, 2014.

TØNNESEN, J.; NÄGERL, U. Valentin. Dendritic spines as tunable regulators of synaptic signals. **Frontiers in psychiatry**, v. 7, p. 101, 2016.

TRIPATHI, S. et al. Image segmentation: a review. **International Journal of Computer Science and Management Research**, v. 1, n. 4, p. 838-843, 2012.

URAKUBO, H. et al. UNI-EM: an environment for deep neural network-based automated segmentation of neuronal electron microscopic images. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

URBAN, B. E. et al. Imaging neuronal structure dynamics using 2- photon super-resolution patterned excitation reconstruction microscopy. **Journal of Biophotonics**, v. 11, n. 3, p. e201700171, 2018.

VAN DER LAAK, J.; LITJENS, G.; CIOMPI, F. Deep learning in histopathology: the path to the clinic. **Nature Medicine**, v. 27, n. 5, p. 775-784, 2021.

VÁSQUEZ, C. E. et al. Neuronal types of the human cortical amygdaloid nucleus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 526, n. 17, p. 2776-2801, 2018.

VIDAURRE-GALLART, I. et al. A Deep Learning-Based Workflow for Dendritic Spine Segmentation. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 16, p. 817903-817903, 2022.

VON ECONOMO, C. Eine neue Art Spezialzellen des Lobus cinguli und Lobus insulae. **Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie**, v. 100, n. 1, p. 706-712, 1926.

VOULODIMOS, A. et al. Deep learning for computer vision: A brief review. **Computational Intelligence and Neuroscience**, v. 2018.

WALKER, C. K.; HERSKOWITZ, J. H. Dendritic spines: mediators of cognitive resilience in aging and Alzheimer's disease. **The Neuroscientist**, v. 27, n. 5, p. 487-505, 2021.

WALSH, D. M.; SELKOE, D. J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 181-193, 2004.

WANG, C. et al. Ensemble neuron tracer for 3D neuron reconstruction. **Neuroinformatics**, v. 15, n. 2, p. 185-198, 2017.

WANG, Y. et al. A broadly applicable 3-D neuron tracing method based on open-curve snake. **Neuroinformatics**, v. 9, n. 2, p. 193-217, 2011.

WANG, Y. et al. TeraVR empowers precise reconstruction of complete 3-D neuronal morphology in the whole brain. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2019.

WATSON, K. K.; JONES, T. K.; ALLMAN, J. M. Dendritic architecture of the von Economo neurons. **Neuroscience**, v. 141, n. 3, p. 1107-1112, 2006.

WEN, Q. et al. Maximization of the connectivity repertoire as a statistical principle governing the shapes of dendritic arbors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 30, p. 12536-12541, 2009.

WERNITZNIG, S. et al. Optimizing the 3D-reconstruction technique for serial block-face scanning electron microscopy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 264, p. 16-24, 2016.

WILLIG, K. I.; NÄGERL, U. Valentin. Stimulated emission depletion (STED) imaging of dendritic spines in living hippocampal slices. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2012, n. 5, p. pdb. prot069260, 2012.

WILT, B. A. et al. Advances in light microscopy for neuroscience. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, p. 435-506, 2009.

WONG, R. O. L.; GHOSH, A. Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 10, p. 803-812, 2002.

YANG, B. et al. Structure-Guided Segmentation for 3D Neuron Reconstruction. **IEEE Transactions on Medical Imaging**, 2021.

YANG, L. et al. Transcriptomic landscape of von Economo neurons in human anterior cingulate cortex revealed by microdissected-cell RNA sequencing. **Cerebral Cortex**, v. 29, n. 2, p. 838-851, 2019.

YUAN, H. et al. Learning hierarchical and shared features for improving 3D neuron reconstruction. In: **2019 IEEE International Conference on Data Mining (ICDM)**. IEEE, 2019. p. 806-815.

YUSTE, R.; BONHOEFFER, T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 1071-1089, 2001.

YUSTE, R. **Dendritic spines**. MIT press, 2010.

YUSTE, R. et al. A community-based transcriptomics classification and nomenclature of neocortical cell types. **Nature Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 1456-1468, 2020.

YUSTE, R.; TANK, D. W. Dendritic integration in mammalian neurons, a century after Cajal. **Neuron**, v. 16, n. 4, p. 701-716, 1996.

YUSTE, R. The discovery of dendritic spines by Cajal. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, p. 18, 2015.

ZEBA, M.; JOVANOVIĆ-MILOŠEVIĆ, N.; PETANJEK, Z. Quantitative analysis of basal dendritic tree of layer IIIc pyramidal neurons in different areas of adult human frontal cortex. **Collegium Antropologicum**, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2008.

ZHANG, Y. E. et al. Chromosomal redistribution of male-biased genes in mammalian evolution with two bursts of gene gain on the X chromosome. **PLoS Biology**, v. 8, n. 10, p. e1000494, 2010.

ZHOU, Z. et al. TReMAP: automatic 3D neuron reconstruction based on tracing, reverse mapping and assembling of 2D projections. **Neuroinformatics**, v. 14, n. 1, p. 41-50, 2016.

**8. ANEXOS**

**Anexo I: Parecer de aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) da UFCSPA. Projeto aprovado com o número de parecer 3.285.063.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Morfologia dos neurônios no continuum subcortical-aiocortical-neocortical humano

**Pesquisador:** ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 06273619.7.0000.5345

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.285.063

#### Apresentação do Projeto:

O presente projeto utilizará lâminas histológicas empregadas em projetos aprovados anteriormente e que contém neurônios impregnados pela prata de acordo com a técnica de Golgi modificada para tecido humano post mortem de 7 homens, entre 51 a 83 anos, que faleceram de causa não violenta e sem doenças neurológicas ou psiquiátricas. A técnica da tionina, igualmente já realizada, servirá para identificação complementar da citoarquitetura de cada área de interesse. Após serem selecionados por critérios qualitativos, os diferentes neurônios impregnados pela técnica de Golgi e presentes nos núcleos medial e cortical da amígdala, hipocampo próprio, neocórtex (lobo temporal, córtex cingulado anterior e pré-cúneo) serão feitas reconstruções 3D de imagens de microscopia de luz para estudo do corpo celular, ramificação dendrítica e orientação espacial de seus ramos. Em maior magnificação, serão feitas reconstruções 3D de imagens microscópicas dos espinhos dendríticos e estudados quanto à sua presença, distribuição, densidade e forma nos diferentes neurônios de cada área de interesse.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

-Descrever a forma neuronal, estrutura dendrítica detalhada e aspecto tridimensional da presença, distribuição, número e diferentes formas dos espinhos dendríticos nos neurônios de regiões

**Endereço:** Rua Sarmiento Leite, 245

**Bairro:** Sarmiento

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3303-8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



Contribuição do Parecer: 3.395.003

subcortical amigdalóide, alo cortical e neocortical humanas empregando-se técnica da tionina para estudo da citoarquitetura local e variante do método de Golgi para caracterização da morfologia neuronal seguida de reconstrução 3D de imagem obtida por microscopia de luz.

**Objetivo Secundário:**

- Identificar, caracterizar e descrever detalhadamente os neurônios do MeA, ACo, hipocampo próprio e neocórtex (lobo temporal como exemplo, mais ACC e PC) após reconstrução 3D de imagem para cada neurônio de cada área nervosa;
- Descrever detalhadamente a ramificação dendrítica e a presença, distribuição, densidade e os tipos de espinhos dendríticos de cada um dos neurônios de cada área nervosa identificada acima.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Não há para as amostras que já foram obtidas e se encontram em lâminas histológicas para estudo.

**Benefícios:**

Estes dados morfológicos básicos gerarão imagens de neurônios humanos e possibilidade de relacioná-las com dados da literatura sobre conexões e funcionamento de cada uma das áreas nervosas estudadas. Da mesma forma, servem como referencial para comparações futuras com dados a serem obtidos em pacientes com doenças degenerativas ou transtornos psiquiátricos que acometem cada uma dessas regiões cerebrais.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto possui relevância acadêmica pois se propõe a construir imagens 3D de neurônios, em todos os detalhes que a técnica por Tionina proposta permitir, a partir de amostras reais, com uso futuro para comparação com dados de literatura bem como de comparações futuras com dados a serem obtidos em pacientes com doenças degenerativas ou transtornos psiquiátricos que acometem cada uma dessas regiões cerebrais. Possibilita ainda formação de recursos humanos integrando pesquisa à criação de recursos didáticos inéditos com uso das técnicas por Tionina e Golgi.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos apresentados, inclusive documentação complementar solicitada, justificando a dispensa de TCLE.

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245  
 Bairro: Sarmiento CEP: 91.050-170  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3333-8804 E-mail: csp@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.295.003

**Recomendações:**

Nenhuma.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nenhuma.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

De acordo com o parecer do Relator.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1292829.pdf	19/03/2019 10:44:33		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	respostaCEPrbts.pdf	19/03/2019 10:42:16	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLÉprojeto2010.pdf	19/03/2019 10:33:21	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Parecer Anterior	ParecerCEP2010.pdf	19/03/2019 10:32:20	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPlataformaBrasilrbts.doc	08/01/2019 16:03:47	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostorbts.pdf	08/01/2019 16:00:45	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Outros	termocompromissoentregarelatorio.pdf	08/01/2019 15:59:19	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Outros	termoanuenciarbts.pdf	08/01/2019 15:58:57	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245  
Bairro: Sarmiento CEP: 90.050-170  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3303-0804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 3.395.003

PORTO ALEGRE, 25 de Abril de 2019

---

Assinado por:  
Luciane Dalcanale Moussalle  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245  
Bairro: Sarmiento CEP: 90.050-170  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3333-0804 E-mail: csp@ufcspa.edu.br

**Anexo II: Parecer de aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) da UFCSPA. Emenda aprovada com o número de parecer 4.787.433.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Morfologia dos neurônios no continuum subcortical-alocortical-neocortical humano

**Pesquisador:** ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO

**Área Temática:**

**Versão:** 6

**CAAE:** 06273619.7.0000.5345

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.787.433

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda, cuja justificativa foi retirada do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMACOES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1767344\_E2, DE 01/06/2021).

Informações básicas da PB, de 01/06/2021, conforme segue abaixo.

Prezados colegas do CEP/UFCSPA, Pela presente gostaríamos de acrescentar como adendo ao projeto aprovado alguns pontos relevantes: 1) dada a ocorrência da pandemia covid-19 e o fechamento do laboratório de pesquisa desde março de 2020 na UFCSPA, acrescentamos o último item no cronograma que trata da obtenção de dados e reconstrução 3D de imagens microscópicas dos neurônios das áreas de estudo até 31/12/2022, um ano mais do que o previsto no projeto original. 2) A partir da resposta à notificação anterior anexa a este projeto, seguindo sua recomendação, gostaria de comunicar que, no presente projeto maior, encontra-se atualmente o trabalho de mestrado da aluna Kélyn Talise Knak Guerra (CPF 013437050-37) junto ao PPG em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, intitulado "Reconstrução Tridimensional de Neurônios do Núcleo Medial da Amígdala e do Hipocampo Próprio Humanos". Também se inclui aqui o projeto de mestrado de Josué Renner (CPF. 040293610-80) junto ao PPG em Biociências da UFCSPA, intitulado "Estudo sobre os neurônios de von Economo do córtex fronto-insular humano", que se enquadra no continuum anatômico e funcional subcortical-alocorticalneocortical de surgimento, desenvolvimento e função desses neurônios específicos, no

**Endereço:** Rua Sarmiento Leite, 245

**Bairro:** Sarmento

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3303-8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



Contratação do Pares: 4.717.499

tema do presente estudo maior. Todas as atividades experimentais aguardam liberação pelo COE e/ou recomendações institucionais de biossegurança atualizadas constantemente. Por fim, comento que não está sendo possível incluir os nomes dos colaboradores de forma eletrônica (apesar de inscritos com CPF válido e terem CV cadastrado na Plataforma Lattes CNPq, por exemplo), na primeira página deste formulário, por razão técnica desconhecida, fato pelo qual inscrevoseus nomes aqui. Sendo o que havia para este momento e adendo, subscrevo-me respeitosamente, Prof. Responsável Alberto A. Rasia Filho (51 991161643) atenciosamente, Alberto A. Rasia Filho Texto anterior (quando aprovado o projeto): O orçamento deste projeto é zero porque todas as lâminas histológicas já foram processadas e os recursos de informática para as reconstruções 3D dos neurônios e seus espinhos dendríticos estão todos já disponíveis. Por causa desconhecida, o sistema não permitiu a inclusão com nome e CPF de dois alunos da pós-graduação que participarão deste projeto. Mas, são eles: Josué Renner, CPF 040293610-80, e Kéthy Talise Knak Guerra, CPF 013437050-37, ambas sob minha orientação científica.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Descrever a forma neuronal, estrutura dendrítica detalhada e aspecto tridimensional da presença, distribuição, número e diferentes formas dos espinhos dendríticos nos neurônios de regiões subcortical amigdalóide, allocortical e neocortical humanas empregando-se técnica da tionina para estudo da citoarquitetura local e variante do método de Golgi para caracterização da morfologia neuronal seguida de reconstrução 3D de imagem obtida por microscopia de luz.

**Objetivo Secundário:**

Identificar, caracterizar e descrever detalhadamente os neurônios do MeA, ACo, hipocampo próprio e neocórtex (lobo temporal como exemplo, mais ACC, PC e FI) após reconstrução 3D de imagem para cada neurônio de cada área nervosa; Descrever detalhadamente a ramificação dendrítica e a presença, distribuição, densidade e os tipos de espinhos dendríticos de cada um dos neurônios de cada área nervosa identificada acima.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Não há para as amostras que já foram obtidas e se encontram em lâminas histológicas para estudo. Não será quebrado o código referente a cada lâmina e amostra no decorrer dos experimentos. Isso somente será feito no final do estudo para elaboração do artigo científico, sem

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245  
Bairro: Sarmento CEP: 90.050-170  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3303-8804 E-mail: oip@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 4.797.433

mencionar nome ou iniciais do nome, somente idade, tempo postmortem para coleta da amostra, causa da morte e técnica empregada,

**Benefícios:**

Estes dados morfológicos básicos gerarão imagens de neurônios humanos e possibilidade de relacioná-las com dados da literatura sobre conexões e funcionamento de cada uma das áreas nervosas estudadas. Da mesma forma, servem como referencial para comparações futuras com dados a serem obtidos em pacientes com doenças degenerativas ou transtornos psiquiátricos que acometem cada uma dessas regiões cerebrais.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Conforme informações Básicas do projeto na PB, trata-se de projeto que utilizará lâminas histológicas empregadas em projetos aprovados anteriormente e que contém neurônios impregnados pela prata de acordo com a técnica de Golgi modificada para tecido humano post mortem de 7 homens, entre 51 a 83 anos, que faleceram de causa não violenta e sem doenças neurológicas ou psiquiátricas. A técnica da tionina, igualmente já realizada, servirá para identificação complementar da citoarquitetura de cada área de interesse. Após serem selecionados por critérios qualitativos, os diferentes neurônios impregnados pela técnica de Golgi e presentes nos núcleos medial e cortical da amígdala, hipocampo próprio, neocórtex (lobo temporal, córtex cingulado anterior, pré-cúneo e córtex fronto-insular, parte insular anterior) serão feitas reconstruções 3D de imagens de microscopia de luz para estudo do corpo celular, ramificação dendrítica e orientação espacial de seus ramos. Em maior magnificação, serão feitas reconstruções 3D de imagens microscópicas dos espinhos dendríticos e estudados quanto à sua presença, distribuição, densidade e forma nos diferentes neurônios de cada área de interesse. Caráter acadêmico, realizado para obtenção de título de Mestre da aluna Kélyn Talise Knak Guerra (CPF 013437050-37) junto ao PPG em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, intitulado "Reconstrução Tridimensional de Neurônios do Núcleo Medial da Amígdala e do Hipocampo Próprio Humanos"; obtenção de título de Mestre de Josué Renner (CPF, 040293610-80) junto ao PPG em Biociências da UFCSPA, intitulado "Estudo sobre os neurônios de von Economo do córtex fronto-insular humano". Patrocinado pelo próprio pesquisador responsável principal, ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO. Centros de pesquisa participantes no Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Armazenamento de amostras em banco de material biológico no Brasil ou fora: Sim; Justificativa: "Tratam-se de lâminas

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245  
Bairro: Sarmiento CEP: 91.050-170  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3303-8804 E-mail: csp@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



Contribuição do Parecer: 4.797.433

histológicas que podem ser mantidas para estudos futuros uma vez que a obtenção de novas amostras e o sucesso na impregnação histológica com a técnica de Golgi são bastante difíceis empiricamente. As lâminas correspondentes aos processamentos histológicos prévios estão guardadas em local chaveado no Laboratório de Morfologia e Fisiologia da UFCSPA (sala 306, prédio 1). Tratando-se de emenda, o projeto foi iniciado em 07/01/2019, com previsão de término em 31/12/2022, conforme informado no arquivo PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1767344\_E2, de 01/06/2021.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações", se houver pendência em algum termo.

A Emenda solicita ampliação do cronograma de execução até 31/12/2022, devidamente justificado em função da pandemia covid-19 e o fechamento do laboratório de pesquisa desde março de 2020 na UFCSPA, para obtenção de dados e reconstrução 3D de imagens microscópicas dos neurônios das áreas de estudo. Com isso, deverá ser enviado novo Termo de entrega de relatórios, com frequência mínima anual. Lembramos que segue válido o termo de entrega de relatórios postado na PB em 11/02/2020, e que esses deverão ser encaminhados ao CEP UFCSPA para apreciação, mediante Notificação.

**Recomendações:**

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A Emenda solicita ampliação do cronograma de execução até 31/12/2022, devidamente justificado em função da pandemia covid-19 e o fechamento do laboratório de pesquisa desde março de 2020 na UFCSPA, para obtenção de dados e reconstrução 3D de imagens microscópicas dos neurônios das áreas de estudo. Com isso, deverá ser enviado novo Termo de entrega de relatórios, com frequência mínima anual. Lembramos que segue válido o termo de entrega de relatórios postado na PB em 11/02/2020, e que esses deverão ser encaminhados ao CEP UFCSPA para apreciação, mediante Notificação.

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245  
Bairro: Sarmiento CEP: 91.050-170  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3333-8804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 4.797.433

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Considerar novas datas para entrega de relatórios. Não foi enviado um novo termo de entrega de relatórios. Solicitamos fazer uma emenda para anexar este documento.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1767344_E2.pdf	01/06/2021 14:40:42		Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	RespostaPendenciaCEP20Marco2020.pdf	20/03/2020 13:13:47	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Outros	termocompromissorelatorios2020e2021.pdf	11/02/2020 18:18:39	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Cronograma	Novocronograma2020e2021.pdf	11/02/2020 18:18:05	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLProjeto2010.pdf	19/03/2019 10:33:21	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Parecer Anterior	ParecerCEP2010.pdf	19/03/2019 10:32:20	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPlataformaBrasilrtps.doc	08/01/2019 16:03:47	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostortps.pdf	08/01/2019 16:00:45	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Outros	termocompromissoentregarelatorio.pdf	08/01/2019 15:58:19	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Outros	termoanueciartps.pdf	08/01/2019 15:58:57	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245  
 Bairro: Sarmiento CEP: 91.050-170  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3333-8804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



Contribuição do Parecer: 4.797.433

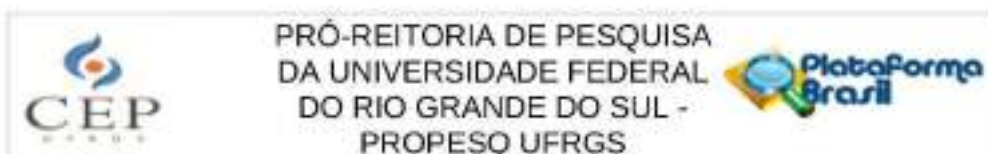
PORTO ALEGRE, 17 de Junho de 2021

---

Assinado por:  
Fernanda Bordignon Nunes  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245  
Bairro: Sarmiento CEP: 91.050-170  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3333-0804 E-mail: csp@ufcspa.edu.br

**Anexo III: Parecer de aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como instituição coparticipante. Aprovado com o número de parecer 5.036.809.**



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Morfologia dos neurônios no continuum subcortical-alcortical-neocortical humano

**Pesquisador:** ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 06273619.7.3001.5347

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 5.036.809

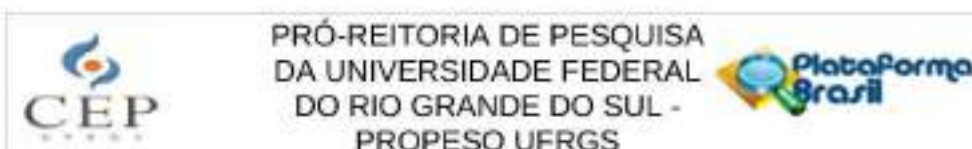
**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto de pesquisa sob a coordenação do Prof. Dr. Alberto Antônio Rasia Filho, do Departamento de Ciências Básicas da UFCSPA.

O objetivo da pesquisa é descrever a forma neuronal, a estrutura dendrítica detalhada e o aspecto tridimensional da presença, distribuição, número e diferentes formas dos espinhos dendríticos nos neurônios de regiões subcortical amigdalóide, alcortical e neocortical humanas empregando-se técnica da tionina para estudo da citoarquitetura local e variante do método de Golgi para caracterização da morfologia neuronal seguida de reconstrução 3D de imagem obtida por microscopia de luz.

Conforme Informações Básicas do projeto na PB, trata-se de projeto que utilizará lâminas histológicas empregadas em projetos aprovados anteriormente e que contém neurônios impregnados pela prata de acordo com a técnica de Golgi modificada para tecido humano post mortem de 7 homens, entre 51 a 83 anos, que faleceram de causa não violenta e sem doenças neurológicas ou psiquiátricas. A técnica da tionina, igualmente já realizada, servirá para identificação complementar da citoarquitetura de cada área de interesse. Após serem selecionados por critérios qualitativos, os diferentes neurônios impregnados pela técnica de Golgi e presentes

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Fátima **CEP:** 90.040-060  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3728 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 5.036/2019

nos núcleos medial e cortical da amígdala, hipocampo próprio, neocórtex (lobo temporal, córtex cingulado anterior, pré-cúneo e córtex fronto-insular, parte insular anterior) serão feitas reconstruções 3D de imagens de microscopia de luz para estudo do corpo celular, ramificação dendrítica e orientação espacial de seus ramos. Em maior magnificação, serão feitas reconstruções 3D de imagens microscópicas dos espinhos dendríticos e estudados quanto à sua presença, distribuição, densidade e forma nos diferentes neurônios de cada área de interesse. Caráter acadêmico, realizado para obtenção de título de Mestre da aluna Kétyln Talise Knak Guerra (CPF 013437050-37) junto ao PPG em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, intitulado "Reconstrução Tridimensional de Neurônios do Núcleo Medial da Amígdala e do Hipocampo Próprio Humanos"; obtenção de título de Mestre de Josué Renner (CPF: 040293610-80) junto ao PPG em Biociências da UFCSPA, intitulado "Estudo sobre os neurônios de von Economo do córtex fronto-insular humano". O projeto está orçado em R\$0,00 (segundo os autores, "Todo (material) necessário para a coleta de dados já está disponível e não há custos adicionais para estudo das lâminas histológicas") e cronograma original de execução de 24 meses.

O projeto encontra-se aprovado no CEP da UFCSPA desde 2019 e segue ao CEP-UFRGS em virtude de adendo ao projeto original pedindo promoção de prazo até 31/12/2022 e a inclusão da aluna Kétyln Talise Knak Guerra, do PPG em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### Objetivo da Pesquisa:

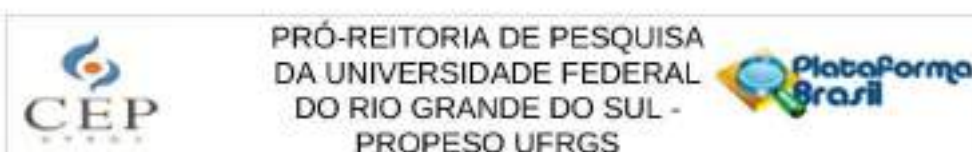
##### Objetivo Primário:

Descrever a forma neuronal, estrutura dendrítica detalhada e aspecto tridimensional da presença, distribuição, número e diferentes formas dos espinhos dendríticos nos neurônios de regiões subcortical amigdalóide, alo cortical e neocortical humanas empregando-se técnica da tionina para estudo da citoarquitetura local e variante do método de Golgi para caracterização da morfologia neuronal seguida de reconstrução 3D de imagem obtida por microscopia de luz.

##### Objetivos Secundários:

- Identificar, caracterizar e descrever detalhadamente os neurônios do MeA, ACo, hipocampo próprio e neocórtex (lobo temporal como exemplo, mais ACC, PC e FI) após reconstrução 3D de imagem para cada neurônio de cada área nervosa;
- Descrever detalhadamente a ramificação dendrítica e a presença, distribuição, densidade e os

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo I da Retoria - Campus Centro  
 Bairro: Fátima CEP: 91.041-090  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-0385 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 5.036.809

tipos de espinhos dendríticos de cada um dos neurônios de cada área nervosa identificada acima.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os autores descrevem os riscos como Riscos "não há para as amostras que já foram obtidas e se encontram em lâminas histológicas para estudo. Não será quebrado o código referente a cada lâmina e amostra no decorrer dos experimentos. Isso somente será feito no final do estudo para elaboração do artigo científico, sem mencionar nome ou iniciais do nome, somente idade, tempo post-mortem para coleta da amostra, causa da morte e técnica empregada".

Quanto aos benefícios, os pesquisadores esclarecem que "estes dados morfológicos básicos geram imagens de neurônios humanos e possibilidade de relacioná-las com dados da literatura sobre conexões e funcionamento de cada uma das áreas nervosas estudadas. Da mesma forma, servem como referencial para comparações futuras com dados a serem obtidos em pacientes com doenças degenerativas ou transtornos psiquiátricos que acometem cada uma dessas regiões cerebrais".

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Em relação ao pedido de esclarecimento a respeito da questão do armazenamento das amostras (biobanco vs. biorrepositório), os autores escrevem que as amostras da pesquisa correspondem a um biorrepositório, em que o material para esta pesquisa/projeto específica(o) está sob responsabilidade do pesquisador principal. A informação não foi atualizada no campo de justificativa para retenção de amostras para armazenamento em banco, e sim no campo "Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisador". Infere-se que o pesquisador continua com problemas para atualizar certos campos da pesquisa, conforme relatado pelo mesmo na versão anterior da submissão do projeto.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Nada a acrescentar.

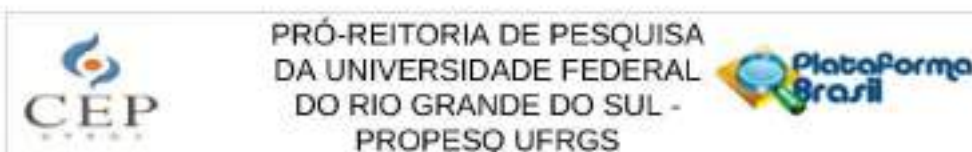
**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Tendo sido atendidas as pendências relativas ao pedido de esclarecimento sobre a questão do armazenamento das amostras (biobanco vs. biorrepositório), recomenda-se a aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado.

Endereço: Av. Itália/Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo I da Retoria - Campus Centro  
 Bairro: Fardouilha CEP: 91.041-090  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-3085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 5.036.809

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1776972.pdf	03/10/2021 10:53:06		Aceito
Outros	RespostaCEP.pdf	03/10/2021 10:44:32	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Outros	folhaDeRostortbs.pdf	29/06/2021 17:37:37	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Outros	termocompromissorrelatorios2020e2021.pdf	11/02/2020 18:18:39	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEprojeto2010.pdf	19/03/2019 10:33:21	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Parecer Anterior	ParecerCEP2010.pdf	19/03/2019 10:32:20	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPlataformaBrasilrtps.doc	08/01/2019 16:03:47	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Outros	termocompromissoentregarelatorio.pdf	08/01/2019 15:58:18	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito
Outros	termoanuenciartbs.pdf	08/01/2019 15:58:57	ALBERTO ANTONIO RASIA FILHO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 14 de Outubro de 2021.

Assinado por:  
**Patrícia Daniela Melchioris Angst**  
 (Coordenador(a))

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Retoria - Campus Centro  
 Bairro: Fandosilha CEP: 91.040-000  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-3085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

**Anexo IV: Capítulo publicado no livro *Advances in Medicine and Biology***

Trabalho adicional elaborado em conjunto com o Laboratório de Fisiologia da UFCSPA ao longo do mestrado. O capítulo de livro se trata de uma *overview* sobre dimorfismo sexual e o processamento de emoções. A seguir, por questões relacionadas a direitos autorais, apenas a primeira página do capítulo está anexada na presente dissertação. A publicação possui o seguinte código DOI: <https://doi.org/10.52305/QHIA1485>.

A citação completa do capítulo é a seguinte:

GUERRA, K. T. K. *et al.* Sex Differences in Neural Processing of Emotions: an Overview. In: BERHARDT, Leon V. (ed.). **Advances in Medicine and Biology. Volume 191**. Hauppauge: Nova Science Publishers, Inc., 2021. p. 155-174.

In: Advances in Medicine and Biology ISBN: 978-1-68507-377-0  
Editor: Leon V. Berhardt © 2021 Nova Science Publishers, Inc.

### *Chapter 5*

## **SEX DIFFERENCES IN NEURAL PROCESSING OF EMOTIONS: AN OVERVIEW**

*Kétlyn Talise Knak Guerra<sup>1</sup>, Leticia Bühler<sup>1</sup>,  
Josué Renner<sup>2</sup> and Alberto A. Rasia Filho<sup>1-3,\*</sup>*

<sup>1</sup>Graduate Program in Neurosciences,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Graduate Program in Biosciences,  
Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>Department of Basic Sciences/Physiology, Federal University of  
Health Sciences of Porto Alegre, RS, Brazil

### **ABSTRACT**

Sexual dimorphism and various hormonally modulated cellular responses indicate that gonadal steroids are important for the neural organization of reproductive and non-reproductive social behaviors in various species. Emotional processing involves subcortical and cortical areas in the brain of males and females, including the medial amygdaloid nucleus and the hippocampus (e.g., the CA1 subfield). Both

---

\* Corresponding Author's E-mail: [asrf@ufespa.edu.br](mailto:asrf@ufespa.edu.br), [rasiafilho@yahoo.com](mailto:rasiafilho@yahoo.com).

## 9. CURRÍCULO LATTES



## Josué Renner

Endereço para acesso via CV: <http://lattes.cnpq.br/8511204029641191>  
 ID Lattes: **8511204029641191**  
 Última atualização do currículo em 31/03/2022

Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). É habilitado em Patologia Clínica, tendo feito estágio no Laboratório Qualitá - Centro Clínico Regina. Também possui habilitação em Análises Ambientais, tendo trabalhado no Laboratório de Botânica da Universidade Feevale. Durante o Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), adquiriu experiência na área de neurociências no Laboratório de Fisiologia da UFCSPA trabalhando com reconstruções tridimensionais de neurônios. Atualmente, realiza seu mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências, na UFCSPA. O projeto de mestrado tem como objetivo descrever detalhadamente os aspectos morfológicos dos neurônios de von Economo (VENS) presentes no córtex fronto-insular (região anteroventral do lobo insular) de humanos. **(Texto informado pelo autor)**

## Identificação

<b>Nome</b>	Josué Renner
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	RENNER, J.;RENNER, JOSUÉ
<b>Lattes ID</b>	<a href="http://lattes.cnpq.br/8511204029641191">http://lattes.cnpq.br/8511204029641191</a>
<b>Orcid ID</b>	<a href="https://orcid.org/0000-0002-3605-7952">https://orcid.org/0000-0002-3605-7952</a>

## Endereço

## Formação acadêmica/titulação

<b>2020</b>	Mestrado em andamento em <b>BIOCIÊNCIAS</b> (Conceito CAPES 4). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Morfologia dos neurônios de von Economo no córtex insular humano. Orientador:  Alberto Antonio Rasia Filho. Bolsista da(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: von economo; neurônio; córtex; morfologia. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Fisiologia.
<b>2016 - 2019</b>	Graduação em Biomedicina. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: DESCRIÇÃO DO CONTÍNUUM MORFOLÓGICO DOS DIFERENTES TIPOS DE NEURÔNIOS DE VON ECONOMO DO PRÉ-CLÍNICO HUMANO. Orientador: Alberto Antonio Rasia Filho.

## Formação Complementar

<b>2020 - 2020</b>	R para não programadores: analisando dados do TCGA. (Carga horária: 2h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
<b>2020 - 2020</b>	A importância de análise Crítica de Evidências durante uma pandemia. (Carga horária: 40h). Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
<b>2020 - 2020</b>	How to write a Review paper. (Carga horária: 2h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
<b>2020 - 2020</b>	Produção de Hortaliças PANC para consumo doméstico. (Carga horária: 12h). Empresa Brasileiro de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, Brasil.
<b>2020 - 2020</b>	Biomédico e a Neurocirurgia, um campo inexplorado. (Carga horária: 2h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
<b>2020 - 2020</b>	Nachite Learning: O que é? O que faz? Do que se alimenta?. (Carga horária: 2h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
<b>2020 - 2020</b>	Primeiros Socorros da Liga de Emergência e Trauma. (Carga horária: 16h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

<b>2020 - 2020</b>	Aspectos epidemiológicos da COVID-19. (Carga horária: 2h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
<b>2018 - 2018</b>	Curso para Tutores do Museu de Anatomia. (Carga horária: 8h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
<b>2017 - 2017</b>	Talks in Clinical Lab. (Carga horária: 4h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
<b>2017 - 2017</b>	Curso para Tutores do Museu de Anatomia. (Carga horária: 8h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
<b>2017 - 2017</b>	Oficina de Dissecção 2017. (Carga horária: 40h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

## Atuação Profissional

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

<b>Vínculo institucional</b> <b>2018 - 2018</b> <b>Outras informações</b>	Vínculo: Monitoria Voluntária, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 10 Monitor selecionado através do processo seletivo do programa de monitoria voluntária para a disciplina de Fisiologia Geral
<b>Vínculo institucional</b> <b>2017 - 2017</b> <b>Outras informações</b>	Vínculo: Programa de monitoria, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 10 Monitor selecionado através do processo seletivo do programa de monitoria voluntária para a disciplina de Anatomia Básica I.
<b>Atividades</b> <b>05/2018 - 05/2018</b>	Extensão universitária , Pró-Reitora de Extensão e Assuntos Comunitários. Atividade de extensão realizada Tutor do Museu de Anatomia de 2018.
<b>09/2017 - 09/2017</b>	Extensão universitária , Pró-Reitora de Extensão e Assuntos Comunitários. Atividade de extensão realizada Monitor na Feira de Saúde - Centro Vida.
<b>05/2017 - 05/2017</b>	Extensão universitária , Pró-Reitora de Extensão e Assuntos Comunitários. Atividade de extensão realizada Tutor do Museu de Anatomia de 2017.

Laboratório Qualidade, LQ, Brasil.

<b>Vínculo institucional</b> <b>2019 - 2019</b> <b>Outras informações</b>	Vínculo: Estágio Obrigatório, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30 Estágio em Análises Clínicas
---	--

Universidade Federal, FEEVALE, Brasil.

<b>Vínculo institucional</b> <b>2019 - 2019</b> <b>Outras informações</b>	Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30 Estágio em Análises Ambientais
---	--

## Idiomas

<b>Inglês</b>	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
<b>Português</b>	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

## Prêmios e títulos

<b>2021</b>	DESTAQUE CIENTÍFICO do VI Encontro do PPG "(Bio)Ciência que transforma", pela apresentação do pôster "Neurônios de von Economo no pré-córtex humano", Programa de Pós-Graduação em BioCiências da UFCSPA.
<b>2021</b>	DESTAQUE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA do VI Encontro do PPG "(Bio)Ciência que transforma", Programa de Pós-Graduação em BioCiências da UFCSPA.
<b>2019</b>	DESTAQUE DE SESSÃO, apresentação de trabalho: A DESCOBERTA DE TRÊS TIPOS DE NEURÔNIOS DE VON ECONOMO NO CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR HUMANO, no Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
<b>2019</b>	DESTAQUE DA SESSÃO, apresentação de trabalho: Descrição morfológica dos neurônios de von Economo do córtex cingulado anterior humano a partir de reconstruções tridimensionais, na XI Jornada Acadêmica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

## Produções

Produção bibliográfica

### Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

- ★ FUENTEALBA-VILLARROEL, FRANCISCO JAVIER ; **RENNER, JOSUÉ** ; HILBIG, ARLETE ; BRUTON, OLIVER J. ; RASIA-FILHO, ALBERTO A. . Spindle-Shaped Neurons in the Human Posteromedial (Precuneus) Cortex. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* **13**, v. 13, p. 769228, 2022.  
Citações: **WEB OF SCIENCE**™ 1
- ★ CORREA-JÚNIOR, NIVALDO D. ; **RENNER, JOSUÉ** ; FUENTEALBA-VILLARROEL, FRANCISCO ; HILBIG, ARLETE ; RASIA-FILHO, ALBERTO A. . Dendritic and Spine Heterogeneity of von Economo Neurons in the Human Cingulate Cortex. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* **12**, v. 12, p. 01-17, 2020.  
Citações: **WEB OF SCIENCE**™ 6
- BONATTO-COSTA, J. A. ; CAMPOS, D. ; ARAGAO, J. A. ; COUTINHO, A. J. M. ; ARAUJO, C. E. ; BUSATTO, A. ; **RENNER, J.** ; JUNIOR, L. O. P. . Unknown foramen found in the middle cranial fossa. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ANATOMICAL VARIATIONS: AN ANNUAL JOURNAL OF ANATOMICAL VARIATIONS AND CLINICAL ANATOMY CASE REPORTS*, v. 13, p. 82-83, 2020.

### Capítulos de livros publicados

- GUERRA, K. T. K. ; BUHLER, L. ; **RENNER, J.** ; RASIA-FILHO, A. A. . Sex Differences in Neural Processing Of Emotions: An Overview. In: Leon V. Bernardi. (Org.). *Advances in Medicine and Biology*. Ted New York: Nova Science Publishers, Inc, 2021, v. 191, p. 155-174.

### Resumos publicados em anais de congressos

- RENNER, J.** ; CORREA JUNIOR, N. D. ; RASIA FILHO, A. A. . A DESCOBERTA DE TRÊS TIPOS DE NEURÔNIOS DE VON ECONOMO NO CÔRTEX CINGULADO ANTERIOR HUMANO. In: Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade, 2019, Porto Alegre. Anais do Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade.
- BONATTO-COSTA, J. A. ; COUTINHO, A. J. M. ; ARAUJO, C. E. ; BUSATTO, A. ; **RENNER, J.** ; ROCHA, A. O. ; CAMPOS, D. ; OLIVEIRA JUNIOR, L. P. . Unknown foramen in the middle cranial fossa. In: Annual Meeting at Experimental Biology 2017, 2017, Chicago. *EXPERIMENTAL BIOLOGY ABSTRACTS 2018*, 2017, v. 32.

### Apresentações de Trabalho

- RENNER, J.** ; FUENTEALBA-VILLARROEL, FRANCISCO ; RASIA FILHO, A. A. . Neurônios de von Economo no pré-cóneo humano. 2021. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- RENNER, J.** ; FUENTEALBA-VILLARROEL, FRANCISCO JAVIER ; RASIA-FILHO, ALBERTO A. . Neurônios de von Economo no pré-cóneo humano. 2021. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
- RENNER, J.** ; CORREA JUNIOR, N. D. ; RASIA FILHO, A. A. . Descrição morfológica dos neurônios de von Economo do córtex cingulado anterior humano a partir de reconstruções tridimensionais. 2019. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- RENNER, J.** ; CORREA JUNIOR, N. D. ; RASIA FILHO, A. A. . A DESCOBERTA DE TRÊS TIPOS DE NEURÔNIOS DE VON ECONOMO NO CÔRTEX CINGULADO ANTERIOR HUMANO. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- COUTINHO, A. J. M. ; ARAUJO, C. E. ; BUSATTO, A. ; **RENNER, J.** ; BONATTO-COSTA, J. A. . RARO FORAME EN LA FOSEA MEDIA DEL CRÁNEO: UN INFORME DE CASO. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

## Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

- Fisioterapia no Cuidado à Saúde. 2022. (Outra).
- Por que ouvir os clássicos?. 2022. (Outra).
- As artes se somam às fileiras da resistência ao nazifascismo: Aspectos culturais e históricos dos movimentos contra o autoritarismo. 2021. (Outra).
- Fake news em saúde: como responsabilizar quem as divulga?. 2021. (Outra).
- II Ciclo de Palestras em Hemoterapia da Liga do Sangue. 2021. (Outra).
- III Seminário de Internacionalização da UFCSPA - "Como podemos melhorar o mundo juntos?". 2021. (Seminário).
- I Simpósio da Liga Acadêmica de Matricidade Orofacial: o desenvolvimento da musculatura orofacial e a interface com as funções do Sistema Estomatognático. 2021. (Simpósio).
- O LEGADO DE IVAN IZQUIERDO PARA A NEUROCIÊNCIA DA MEMÓRIA. 2021. (Outra).

9. Plasticidade cerebral e Neuropsicologia. 2021. (Outra).
10. Por que ler os clássicos - Segunda Edição. 2021. (Outra).
11. Simpósio Integrado do Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFSC - SIPNeuro 2021. 2021. (Simpósio).
12. Transtorno do Espectro Autista: um olhar multidisciplinar. 2021. (Outra).
13. Uso Racional de Medicamentos e Medicalização da Saúde Mental na Pandemia. 2021. (Outra).
14. VI Encontro do PPG Biotécnicas. Neurônios de von Economo no pré-cérebro humano. 2021. (Outra).
15. Violência contra a mulher: é preciso falar mais. 2021. (Outra).
16. 23º Encontro Nacional de Biomedicina. 2020. (Outra).
17. Ciclo de Debates sobre Pandemia COVID-19 e Direitos Humanos: 1. O que a Epidemia HIV tem a nos ensinar sobre a Epidemia COVID-19?. 2020. (Outra).
18. Ciclo de Debates sobre Pandemia COVID-19 e Direitos Humanos: 2. Como a pandemia COVID-19 aprofundou ainda mais as vulnerabilidades no Brasil?. 2020. (Outra).
19. Ciclo de Debates sobre Pandemia COVID-19 e Direitos Humanos: 3. Quais os desafios éticos e científicos na busca de tratamento para COVID-19?. 2020. (Outra).
20. Congresso de Biotécnicas 2020 - UNESP. 2020. (Congresso).
21. Contribuições da telemedicina e telessaúde para o Covid-19: como as tecnologias atuam na pandemia. 2020. (Outra).
22. Covid-19: experiências e desafios emergentes no desenvolvimento e validação de testes moleculares e sorológicos. 2020. (Outra).
23. CSI LAMH: A Anatomia nos Crimes. 2020. (Outra).
24. Dificuldades alimentares: cuidado e promoção da saúde infantil. 2020. (Outra).
25. I Congresso Multidisciplinar: Paciente Bariátrico. 2020. (Congresso).
26. I HealthTech Conference Online. 2020. (Outra).
27. II Congresso Multidisciplinar: Atendimento à Comunidade T. 2020. (Congresso).
28. III Congresso Multidisciplinar: Outubro Rosa. 2020. (Congresso).
29. III QUIPTOX - V JORNADA ACADÊMICA DO CURSO DE QUÍMICA MEDICINAL, e VI JORNADA ACADÊMICA DO CURSO DE TOXICOLOGIA ANALÍTICA. 2020. (Outra).
30. III Simpósio Anual da Liga de Neuroreabilitação - Reabilitação na Esclerose Múltipla e Esclerose Lateral Amiotrófica. 2020. (Simpósio).
31. I Simpósio Interligas de Neurociências do Centro-Oeste (SIN-CO). 2020. (Simpósio).
32. Mesa redonda sobre a Guia Alimentar para a população brasileira: uma visão da Nutrição, Gastronomia e Tecnologia em Alimentos. 2020. (Outra).
33. V Biosciences Meeting - Crossing Borders. Estudo sobre os neurônios de von Economo do córtex fronto-insular humano. 2020. (Congresso).
34. CAMINHOS CRUZADOS - Trajetos de memória em Porto Alegre e sua gente. 2019. (Seminário).
35. Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade. A DESCOBERTA DE TRÊS TIPOS DE NEURÔNIOS DE VON ECONOMO NO CÔRTEX CINGULADO ANTERIOR HUMANO. 2019. (Congresso).
36. Dia do Biomédico e Dia de palestras em Análises Clínicas. 2019. (Outra).
37. I Congresso Latinoamericano de Biomedicina e Ciências do Laboratório, juntamente com o XIII Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina e IV Congresso Catarinense de Biomedicina. 2019. (Congresso).
38. Imunosenescência no envelhecimento. 2019. (Outra).
39. Jornada Acadêmica da Biomedicina UFCSPA 2019. Descrição morfológica dos neurônios de von Economo do córtex cingulado anterior humano a partir de reconstruções tridimensionais. 2019. (Outra).
40. Controvérsias em Anatomia: o interstício como novo órgão. 2018. (Outra).
41. Jornada Acadêmica da Biomedicina UFCSPA. 2018. (Outra).
42. 54º Congreso Argentino de Anatomía. RARO FORAME EN LA FOSA MEDIA DEL CRÁNEO: UN INFORME DE CASO. 2017. (Congresso).
43. IX Congresso Internacional de Bioanálises, XII Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina, XVI Semana Gaúcha de Biomedicina e II Encontro Brasileiro de Monitoramento Terapêutico de Fármacos e Toxicologia Clínica. 2017. (Congresso).
44. Jornada Acadêmica da Biomedicina UFCSPA. 2017. (Outra).

## Educação e Popularização de C & T

### Apresentações de Trabalho

1. **RENNER, J.**; FUENTEALBA-VILLARROEL, FRANCISCO JAVIER ; RASTIA-FILHO, ALBERTO A. . Neurônios de von Economo no pré-cérebro humano. 2021. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).