

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

Ana Carolina Leonardi Dutra

**Estudo dos espinhos dendríticos do núcleo medial da amígdala
de seres humanos por reconstrução tridimensional de imagens
de microscopia de luz e confocal**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2014

Ana Carolina Leonardi Dutra

Estudo dos espinhos dendríticos do núcleo medial da amígdala de seres humanos por reconstrução tridimensional de imagens de microscopia de luz e confocal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Dr. Alberto Antônio Rasia Filho

Co-orientadora: Dra. Aline Dall'Oglio

Porto Alegre

2014

RESUMO

O núcleo amigdaliano medial (Me) é um dos núcleos superficiais do complexo amigdaliano, estrutura do telencéfalo basal localizada no lobo temporal, sub-cortical que desempenha papel integrativo no reconhecimento de estímulos emocionais e na elaboração de comportamentos sociais. Uma vez que se trata de uma área encefálica pouco estudada em seres humanos, e que o complexo amigdaliano está envolvido em diversas condições patológicas, buscou-se descrever a morfologia dos espinhos dendríticos, a fim de colaborar na melhor compreensão da organização sináptica local e, conseqüentemente, contribuir para o avanço nos estudos futuros das disfunções que envolvem esta área. Espinhos dendríticos podem apresentar diferentes morfologias e, quando presentes, representam locais pós-sinápticos basicamente para contatos excitatórios. O objetivo deste estudo foi descrever e caracterizar espinhos dendríticos do Me de seres humanos por meio de microscopia de luz e confocal, principalmente com a reconstrução tridimensional de imagens. Foram estudados tecidos obtidos *post mortem* de doadores (homens, idade entre 50 e 75 anos, sem patologias neurológicas ou psiquiátricas descritas, n = 5), de acordo com todos procedimentos éticos vigentes, os 5 diferentes tipos de neurônios da Me impregnados pela prata segundo variante da técnica de Golgi e visualizados por meio de microscopia de luz e usando-se o corante lipofílico fluorescente Dil, aplicado em forma extracelular, para visualização dos ramos dendríticos e seus espinhos pela microscopia confocal. Com a primeira técnica, espinhos dendríticos foram observados nos 5 tipos neuronais encontrados neste núcleo, em quantidades variáveis, com um *continuum* morfológico que permitiu sua classificação em finos, achatados/espessos, com formato de cogumelo e ramificados com variação de tamanho e forma, mais isolados ou em grupos ao longo dos dendritos. Tipos mais complexos foram observados, com no caso dos ramificados com espínulas e nos com formato racemoso. Com a segunda técnica confirmaram-se os dados da microscopia de luz e exemplificaram-se ainda mais os tipos morfológicos diferentes de espinhos dendríticos no Me humano.

Palavras-chave: complexo amigdaliano; núcleo medial da amígdala; espinhos dendríticos; técnica de Golgi; Dil; microscopia confocal.

ABSTRACT

The medial amygdaloid nucleus (Me) is a superficial nucleus of the amygdaloid complex, a basal telencephalic structure located in temporal lobe that plays an integrative role in recognizing emotional stimuli and in social behavior planning. Given that it is a little studied brain region in humans, and that the amygdaloid complex is involved in many pathological conditions, we aimed to describe dendritic spine morphology in order to collaborate to a better comprehension of local synaptic organization and, consequently, contribute to future dysfunction studies in such area. Dendritic spines can show different shapes and, when observed, represent excitatory contacts post synaptic places. The aim of this study was to describe and characterize human Me dendritic spines through light and confocal microscopy, mainly with images of three-dimensional reconstruction. We used human post mortem tissue from donors (males, aged from 50 to 75 years old, with no neurological or psychiatric pathologies, $n = 5$), in agreement to current ethical procedures. We studied the 5 different Me neuron types silver stained according to Golgi's technique variation and visualized by light microscopy and using lipophilic dye Dil applied extracellularly to dendritic branches and spines visualization by confocal microscopy. With the first technique, dendritic spines were observed in all 5 neuronal types found in this nucleus, in different quantities, with a morphological continuum allowing its classification in thin, stubby/wide, mushrooms and ramified with size and shape variation, isolated or grouped along dendrites. More complex types were observed, as in ramified with spinule and in racemose shape cases. With the second technique light microscopy data were confirmed and were also exemplified different morphological types of dendritic spines in human Me.

Key words: amygdaloid complex; amygdaloid medial nucleus; dendritic spines; Golgi's technique; Dil; confocal microscopy.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACo	Núcleo amigdaliano cortical anterior
AHi	Área de transição amigdalohipocampal
APir	Área de transição amigdalopiriforme
AStr	Zona de transição amigdaloestriatal
AMPA	Receptor glutamatérgico do tipo alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
BL	Núcleo amigdaliano basolateral
BM	Núcleo amigdaliano basomedial
BSTL	Divisão lateral do núcleo da estria terminal
BSTM	Divisão medial do núcleo da estria terminal
BSTSL	Extensão supracapsular lateral da estria terminal
BSTSM	Extensão supracapsular medial da estria terminal
Ce	Núcleo amigdaliano central
CExA	Grupo central da amígdala expandida
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
GABA	Ácido-gama-amino-butírico
ICMs	Núcleos intercalados da amígdala
IMG	Substância cinzenta intramedular amigdaliana
IPAC	Núcleo intersticial da divisão posterior da comissura anterior
La	Núcleo amigdaliano lateral
LTD	Depressão de longa duração
LTP	"Potenciação" de longa duração
Me	Núcleo amigdaliano medial
MExA	Grupo medial da amígdala expandida
NMDA	Receptor glutamatérgico do tipo N-metil-D-aspartato
PL	Núcleo amigdaliano paralaminar
SLEACn	Amígdala expandida sublenticular central
SLEAM	Amígdala expandida sublenticular medial
VCo	Núcleo amigdaliano cortical ventral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagens da localização anatômica do complexo amigdaliano humano

Figura 2 – Desenho representativo das diferentes morfologias de espinhos dendríticos observados na amígdala medial de ratos

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
LISTA DE FIGURAS	4
INTRODUÇÃO	6
REVISÃO DE LITERATURA	8
1. Complexo Amigdaliano.....	8
1.2. Núcleo Amigdaliano Medial	15
2. Espinhos Dendríticos	17
3. Técnica de Golgi.....	23
4. Técnica do Dil e microscopia confocal	24
OBJETIVOS	
1. Objetivo geral	
1.1 Objetivos específicos	27
REFERÊNCIAS.....	28
ARTIGO	37
CONCLUSÃO GERAL	87
ANEXOS	
ANEXO A – Parecer do CEP da UFCSPA.....	88
ANEXO B – Parecer do CEP da UFCSPA.....	89
ANEXO C – Termo de Consentimento.....	90
ANEXO D – Parecer do Conselho Técnico-Consultivo do DML.....	93
ANEXO E – Normas da revista Journal of Comparative Neurology	94

INTRODUÇÃO

Este trabalho descreverá e caracterizará a morfologia de espinhos dendríticos e somáticos do núcleo amigdaliano medial (Me) humano, um dos núcleos do complexo amigdaliano, responsável, dentre outros, pela experiência e expressão emocional. Quanto ao Me, trata-se de uma estrutura importante no reconhecimento dos estímulos olfatórios e visuais e na modulação das emoções e comportamentos sociais, considerando principalmente os estudos experimentais em animais não-humanos. Apesar de seu evidente papel comportamental, poucos estudos em seres humanos foram realizados.

Embora existam limitações técnicas e éticas no estudo do Me em seres humanos e que referências sejam escassas, é possível estudá-lo, dentre outros modos, pela descrição da sua citoarquitetura, da morfologia celular e da circuitaria que está envolvido. Considerando que espinhos somáticos e dendríticos são componentes da morfologia neuronal e que representam locais relevantes para a conectividade sináptica, sua descrição e caracterização possibilitam inferir sobre o funcionamento neuronal local e, a partir disto, deste núcleo e suas possíveis funções.

Espinhas somáticas e dendríticas apresentam diversas formas e tamanhos e geralmente são elementos pós-sinápticos conectados com aferências axonais com aspecto e função excitatórios. Apesar de terem sido primeiramente descritos por Ramón y Cajal no final do século XIX, apenas nas últimas décadas o seu estudo foi intensificado, considerando seu importante papel na plasticidade sináptica. Uma vez que sua forma está relacionada a diferentes funções na gênese e no processamento da informação sináptica, buscou-se, de forma inédita neste estudo, com o emprego das técnicas de Golgi e microscopia de luz e do corante fluorescente Dil e microscopia confocal, descrever com maiores detalhes os espinhos somáticos e dendríticos presentes nos tipos neuronais encontrados no Me humano visando contribuir para o entendimento do funcionamento neuronal local e das atividades integradas por este núcleo na nossa espécie.

Os achados deste trabalho estão descritos no artigo que segue nesta dissertação. O artigo "Somatic and dendritic spines in the human medial amygdaloid nucleus" será submetido à revista Journal of Comparative Neurology esperando-se que a divulgação dos seus resultados sirva como referencial para o estudo da rede

neural local em situação normal e para estudos comparativos em situações patológicas.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Complexo Amigdaliano

O complexo amigdaliano, ou amígdala, é uma estrutura telencefálica, sub-cortical, localizada na porção anteromedial do lobo temporal (Sims & Williams, 1990; Gloor, 1997; Ulfing e col., 2003). Forma a parede superior e ventromedial da extremidade anterior dos ventrículos laterais e está próxima às margens inferiores do claustró, putâmen e globo pálido (Gloor, 1997; de Olmos, 2004; Mai e col., 2007; Figura 1). Em seres humanos apresenta como medidas aproximadas 10 mm de extensão ântero-posterior, 18 mm de largura médio-lateral e 15 mm de altura súpero-inferior, compondo um volume próximo a 1700 mm³ (Sorvari, 1997; Rasia-Filho e Hilbig, 2005).

Um dos primeiros grandes trabalhos sobre a descrição anatômica do complexo amigdaliano humano foi realizado por Johnston em 1923 e, a partir deste, advieram as descrições de Brockhaus (1938), Crosby e Humphrey (1941), de Olmos (1990, 2004), Gloor (1997) e, mais recentemente, Yilmazer-Hanke (2012). Broca, em 1878, já havia incluído tal estrutura como parte do “lobo límbico”, o que McLean (1952) reiterou com a expressão de “sistema límbico” e incluiu neste o complexo amigdaliano como um de seus componentes (Le Doux, 2005; Oliveira e col., 2008). Entre as principais evidências da participação do complexo amigdaliano na modulação das emoções, teve grande importância para a compreensão dos mecanismos fisiológicos o estudo de Kluver e Bucy. Em 1937, tais pesquisadores observaram que, ao remover bilateralmente os dois terços anteriores do lobo temporal de um macaco, este apresentou mudanças drásticas comportamentais que incluíam ausência de reações de raiva e medo, agnosia visual e exploração de toda sorte de objetos com a boca (c.f., Le Doux, 2005). Apesar de o complexo amigdaliano ser descrito por alguns como um dos integrantes dos núcleos da base (Ulfing e col., 2003; Leontovich e col., 2004), é considerado por alguns autores como componente do sistema límbico (Price e col., 1987; Amaral e col., 1992; Sorvari, 1997; Gloor, 1997; Pohl e col., 2013),

sendo responsável pela integração e modulação de diversas emoções e comportamentos (Davidson, 2003; Fudge e Emiliano, 2003).

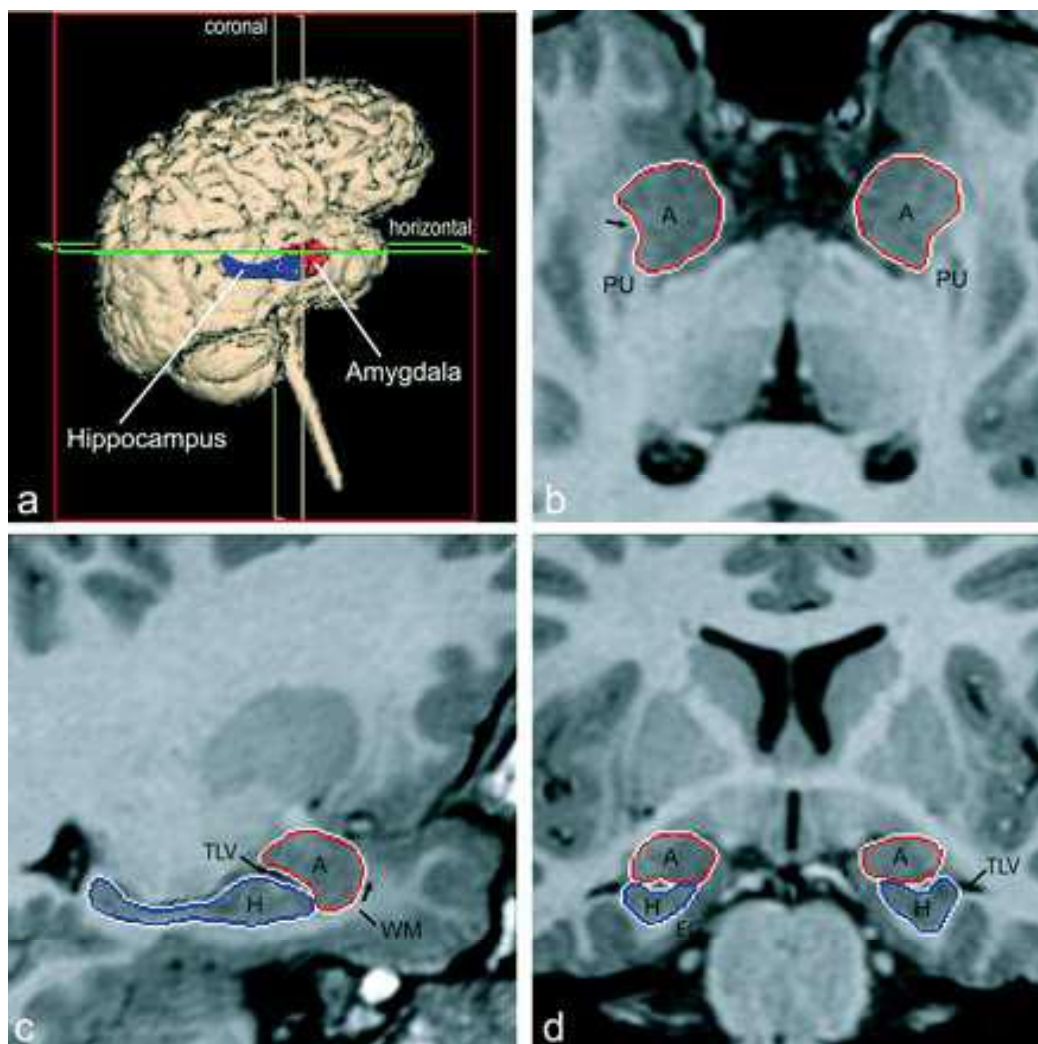


Figura 1 – Localização do complexo amigdaliano (em vermelho), adjacente ao hipocampo (em azul), em imagens de ressonância magnética. (a) Reconstrução tridimensional do encéfalo, representando os planos de estudo nas imagens de ressonância magnética. Imagens do complexo amigdaliano nos planos (b) longitudinal, (c) sagital e (d) coronal. A seta em “b” indica a linha ao longo da substância branca que separa a amígdala do putâmen e a seta em “c” representa a substância branca que forma o bordo ventral da amígdala rostral. A - amígdala; EC - córtex entorrinal; H - hipocampo; PU - putâmen; TLV - corno temporal do ventrículo lateral; WM - substância branca subamigdaliana. Reproduzido e adaptado de Whalen e Phelps (2009).

Os estudos filogenéticos sobre o complexo amigdaliano demonstram a heterogeneidade morfológica entre as diferentes espécies, uma vez que nem todos os seus componentes são igualmente encontrados em todas as classes de animais (Schumann e col., 2011). O fato de que há mudanças de volume proporcionais nos componentes do complexo amigdaliano e que, em humanos, encontra-se o núcleo lateral aumentado e o grupo centro-medial diminuído de volume (Stephan e Andy citado por Gloor, 1997; Schumann e col., 2011, Morgan e Amaral, 2014), demonstra que esta não se trata de uma estrutura vestigial na nossa espécie (Schumann e col., 2011).

Em diferentes mamíferos, os núcleos do complexo amigdaliano estão envolvidos na resposta ao medo (Davidson e Irwin, 1999; Le Doux, 2003), na modulação da ansiedade e à estímulos estressantes (Akmaev e col., 2004), na formação de memória (Phelps e Anderson, 1997; Phelps e Le Doux, 2005), nos comportamentos motivacionais em geral (McDonald, 1998), de agressividade (revisado em Rasia-Filho e col., 2008, 2012), sexual (Hamann, 2005; Baird e col., 2006; de Castilhos e col., 2006; Rasia-Filho e col., 2012), maternal (Sheehan e col., 2001) e alimentar (Le Doux & Muller, 1997; Whalen & Phelps, 2009). Relacionam-se também com o controle da secreção neuroendócrina de hormônios gonadotróficos e adrenocorticotróficos e de respostas simpáticas e parassimpáticas envolvidas nos comportamentos sociais (Rasia-Filho e col., 2000; Dayas e col., 2001; Quagliotto e col., 2008; Neckel e col., 2012).

Em humanos, o complexo amigdaliano está envolvido em diversas condições patológicas, como doença de Alzheimer (Sims e Williams, 1990), epilepsia do lobo temporal (Pitkanen e col., 1998; Hüttmann e col., 2006), autismo (Amaral e col., 2008; Breece e col., 2013), esquizofrenia (Sims e Williams, 1990; Fudge e Emiliano, 2003), coreia de Huntington (de Olmos, 2004), transtorno do estresse pós-traumático (Rasia-Filho e Hilbig, 2005, Morey e col., 2012), depressão (Davidson, 2003), reforçando a importância de conhecer aprofundadamente a sua morfologia e suas diferentes funções, a fim de proporcionar a base para pesquisas neuropatológicas.

Estudos sobre a citoarquitetura e quimioarquitetura e dados hodológicos e funcionais do complexo amigdaliano indicam que não se trata de uma

unidade anatômica ou funcional, mas de um conjunto de diversos núcleos com estruturas e funções diferentes (Brodal, 1981). Apesar dessas evidências, o complexo amigdaliano ainda é muito citado como uma estrutura única, em parte devido ao intenso debate sobre a subdivisão de seus núcleos em diferentes espécies (Sims e Williams, 1990; Gloor, 1997; Sorvari, 1997; de Olmos, 2004; Yilmazer-Hanke, 2012; Dall'Oglio e col., 2013) ou ainda, e nesse caso principalmente em estudos com humanos, por limitações técnicas como, por exemplo, a impossibilidade de subdividir os núcleos amigdalianos nas avaliações funcionais, sobretudo nos estudos de imagem (Davidson e Irwin, 1999; mas vejam-se progressos recentes em Saygin e col., 2011). Não obstante, o complexo amigdaliano tem sido subdividido em uma núcleos e subnúcleos, muitas vezes com divergência entre os autores acerca das terminologias ou dos bordos/limites que os separam. Para Gloor (1997), essas discrepâncias podem ser justificadas pelas diferenças sutis observada na delimitação morfológica de cada núcleo amigdaliano, principalmente no ser humano.

Nesta dissertação optou-se por descrever a classificação sugerida por de Olmos (2004). Segundo este autor, o complexo amigdaliano humano pode ser dividido em 4 agrupamentos nucleares: complexo nuclear amigdaliano basolateral, amígdala expandida, amígdala “olfatória” tipo cortical superficial e núcleos amigdalianos ainda não classificados. Estes grupamentos possuem componentes principais, citados a seguir:

- 1) Amígdala olfatória tipo cortical superficial: constituída pelos núcleos corticais anterior (ACo) e ventral (VCo) e áreas de transição amigdalopiriformes (APir).
- 2) Amígdala expandida: apresenta dois grandes grupos, o medial (MExA) e o central (CExA). O MExA compreende o núcleo amigdaliano medial (Me), a amígdala expandida sublenticular medial (SLEAM) e a divisão medial do núcleo da estria terminal (BSTM). O CExA, por sua vez, é constituído pelos núcleos amigdaliano central (Ce), amígdala expandida sublenticular central (SLEACn), a divisão

lateral do núcleo da estria terminal (BSTL) e o núcleo intersticial da divisão posterior da comissura anterior (IPAC). As extensões supracapsular medial (BSTSM) e lateral (BSTSL) da estria terminal podem ser incluídas em ambos os grupos.

- 3) Complexo nuclear amigdaliano basolateral: é composto pelos núcleos amigdalianos lateral (La), basolateral (BL), basomedial (BM) e paralaminar (PL).
- 4) Núcleos amigdalianos ainda não classificados: incluem a zona de transição amigdaloestriatal (AStr), os núcleos intercalados (ICMs) e a substância cinzenta intramedular amigdaliana (IMG).

O complexo amigdaliano integra e processa informações sensoriais multimodais a fim de modular os processos cognitivos e emocionais (McDonald, 1998; Yilmazer-Hanke, 2012). Os núcleos do complexo amigdaliano conectam áreas corticais sensoriais e límbicas a áreas subcorticais responsáveis pelas respostas emocionais e motivacionais (McDonald, 1998). Por outro lado, o complexo amigdaliano recebe projeções aferentes de uma região limitada da formação hipocampal, compreendendo a zona limite entre o subiculum e a área CA1 hipocampal (Gloor, 1997; McDonald, 1998). Poucos dados estão disponíveis possibilitando estudar o papel de cada núcleo amigdaliano nesta grande função. Não obstante, há dados que permitem associar a capacidade de reconhecimento de expressões emocionais com conteúdo social feito pela Me humana (Gamer e cols., 2010).

De modo geral, os componentes do complexo amigdaliano recebem aferências corticais e do sistema olfatório e apresentam interconexões com regiões alorticais, mesocorticais e isocorticais além de regiões do prosencéfalo basal, área pré-óptica e tronco encefálico (Gloor, 1997). As interconexões com o neocórtex são proporcionalmente mais freqüentes com áreas sensoriais associativas terciárias (Gloor, 1997; McDonald, 1998) e são encontradas em maior número em macacos, quando comparado a outros mamíferos não-

primatas (Everitt, 1995; McDonald, 1998; Zald, 2003). Além de projeções diretas do bulbo olfatório ao núcleo do tracto olfatório lateral, ACo e córtex periamigdaliano, há também ligações associativas entre todas as partes do córtex olfatório primário e estas estruturas superficiais amigdalianas (Gloor, 1997; de Olmos, 2004; Kiernan, 2012). De fato, o sistema olfatório é o único sistema sensorial no qual os neurônios sensoriais de primeira e segunda ordem projetam-se diretamente ao complexo amigdaliano (Gloor, 1997). Parece que apenas uma porção do Me, do núcleo cortical e da área de transição amigdalocortical recebem projeções olfatórias diretas em seres humanos (de Olmos, 2004). Áreas sensoriais associativas unimodais enviam projeções ao complexo amigdaliano. Tais projeções, entretanto, não surgem de áreas associativas sensoriais de primeira ordem; são esparsas das áreas de segunda ordem e densas das de terceira ordem (Gloor, 1997). As projeções provenientes das áreas associativas corticais terminam-se predominantemente no La – todas as áreas de associação unimodais projetam a este núcleo, algumas somente a ele (Amaral, 1987; Everitt, 1995; Kiernan, 2012). Ainda, várias áreas de associação multimodais projetam-se ao complexo amigdaliano e são provenientes dos lobos temporal e parietal e no córtex cingulado (Everitt, 1995).

Uma característica importante a ser destacada é o fato de que a maioria das conexões chegam ao complexo amigdaliano principalmente pelos núcleos La, BL e corticais e o fluxo dessas informações dirige-se aos núcleos Ce e Me (Amaral, 1987; Everitt, 1995; Gloor, 1997; LeDoux e Muller, 1997). Há poucas projeções em uma direção reversa, sugerindo, assim como na formação hipocampal, um fluxo unidirecional de processamento das informações. As partes magnocelular, parvicelular e intermediária do núcleo basal projetam aos núcleos basal acessório, central e medial, assim como ao córtex periamigdaliano e à área hipocampal (Gloor, 1997). O núcleo basal acessório, por sua vez, projeta aos Ce, Me e cortical (Gloor, 1997). As maiores aferências intra-amigdalianas surgem do La (Gloor, 1997). Em macacos, o Me projeta axônios para os núcleos basal acessório, ACo e Ce, além do córtex periamigdaliano e AHi (Price, 1987; Gloor, 1997).

A projeção das eferências do complexo amigdaliano a áreas talâmicas e do estriado (Amaral, 1987; Gloor, 1997), por sua vez, ocorre pela estria

terminal e pela via amigdalofugal, principais circuitos de saída da informação processada no complexo amigdaliano (Everitt, 1995; de Olmos, 2004). Embora a maioria das conexões extrínsecas são recíprocas, há exceções: núcleos do estriado e do tálamo recebem projeções do complexo amigdaliano, mas não retornam estas projeções, enquanto o complexo amigdaliano projeta a várias camadas corticais que também não são recíprocas (Amaral, 1992).

Para o tronco encefálico, o Ce provém a maior projeção do complexo amigdaliano e inerva a substância cinzenta periaquedutal, a área tegmental ventral, a parte compacta da substância nigra, o núcleo peripeduncular e a formação reticular tegmental (Everitt, 1995; Gloor, 1997; de Olmos, 2004; Yilmazer-Hanke, 2012). Na ponte, o núcleo parabraquial recebe uma projeção particularmente proeminente, enquanto no bulbo, o núcleo do trato solitário e o núcleo motor dorsal do vago recebem aferências do Ce (Everitt, 1995; Saha e cols, 2005). É interessante que a projeção mais significativa do tronco encefálico para o complexo amigdaliano surge do núcleo peripeduncular, terminando-se nos núcleos La e Me e no núcleo da estria terminal em macacos (Everitt, 1995). Estas conexões são consistente com o papel na integração dos processos cardiovasculares, respiratórios e gustativos com o que o complexo amigdaliano tem sido associado (Everitt, 1995; Saha e cols, 2005; Yilmazer-Hanke, 2012). O complexo amigdaliano também recebe aferências serotoninérgicas dos núcleos da rafe do mesencéfalo, dopaminérgicas da substância nigra e área tegmental ventral e noradrenérgicas do *locus ceruleus* e subcerúleo (Everitt, 1995).

Para os núcleos hipotalâmicos e para o núcleo da estria terminal, o núcleo Ce é novamente a maior saída das projeções amigdalianas (Gloor, 1997). Não obstante, os núcleos Me e ACo projetam largamente à área pré-óptica medial e ao hipotálamo medial anterior (Everitt, 1995; Gloor, 1997). Funcionalmente conectado com o estriado, o núcleo accumbens recebem igualmente aferências do complexo amigdaliano (Everitt, 1995; Fudge e cols, 2002; Yilmazer-Hanke, 2012).

Para o córtex cerebral, a formação hipocampal apresenta conexões diretas com o complexo amigdaliano, sendo os núcleos lateral, acessório basal

magnocelular e basal parvicelular as maiores eferências à formação hipocampal (Amaral, 1992; Gloor, 1997). Adicionalmente, tomando-se em consideração que as aferências amigdalianas surgem de regiões unimodais e polimodais do neocortex frontal, cingular, insular e temporal, as eferências são direcionadas a regiões neocorticais dispersas (Amaral, 1992;). As projeções amigdalocorticais originam-se principalmente no núcleo basal, e, em menor extensão, nos núcleos cortical e lateral (Everitt, 1995; Gloor, 1997). A extensão destas interconexões com o neocortex são maiores em macacos do que as encontradas em ratos e outras espécies não-primatas e eferências do complexo amigdaliano atingem os lobos temporal e occipital (Everitt, 1995). O córtex insular agranular é particularmente densamente innervado pelos núcleos amigdalianos medial e cortical anterior. O núcleo basal é uma importante fonte de projeções que terminam nas camadas I e II do córtex frontal, enquanto os núcleos basal acessório e lateral também contribuem às projeções frontais e pré-frontais (Everitt, 1995).

1.2 Núcleo Amigdaliano Medial

O Me é encontrado superficialmente na porção dorsomedial do complexo amigdaliano. Representa uma pequena região de substância cinzenta contida na profundidade do sulco endorrinal (Sims e Williams, 1990; Gloor, 1997; de Olmos, 2004; Yilmazer-Hanke, 2012), localizada superficialmente na dobra dorsomedial do lobo temporal, adjacente ao trato óptico (McDonnald, 1998). Forma a parede ventrolateral da fenda entre o complexo amigdaliano e o trato óptico (Gloor, 1997) e é uma estrutura comprida orientada rostrocaudalmente e de modo longitudinal em primatas, estendendo-se por quase toda extensão rostrocaudal do complexo amigdaliano humano (Gloor, 1997). O Me faz limites inferiormente com o núcleo basal acessório, medialmente com o núcleo cortical, súpero-lateralmente com a substância inominada, anteriormente com a área amigdaliana anterior e posteriormente com o estriado ventral (Sims e Williams, 1990). Estende-se ao longo e abaixo do assoalho ventricular da porção mesial do prosencéfalo basal

até entrar em contato com a região pré-óptica. Sua porção dorsal encontra-se bastante reduzida nos encéfalos de mamíferos (Gloor, 1997). É parte da amígdala expandida que forma a substância cinzenta da estria terminal e da via amigdalofugal, principais vias subcorticais da amígdala (Gloor, 1997).

Poucos dados funcionais estão disponíveis especificamente a respeito do Me humano (revisado em Dall'Oglio e col., 2013). O Me tem sido associado ao processamento dos estímulos olfatórios (Zald & Prado, 1997), recebendo, modulando e adicionando a elas um componente emocional (de Olmos, 2004). Ainda, também participa no reconhecimento de expressão facial de medo ou a interpretação emocional positiva de faces com representação feliz (Gamer e col., 2000). Esses achados sugerem que o Me é essencial para a modulação de emoções e comportamentos sociais em seres humanos, guardando certa homologia com o que tem sido descrito em ratos (revisado em Rasia-Filho e col., 2012)

Em estudos com roedores, considera-se o Me e seus subnúcleos como uma região sexualmente dimórfica, diferindo em volume, citoarquitetura, expressão de receptores para hormônios e transmissores químicos, por exemplo (revisado em Rasia-Filho e col., 2004, 2012). Em humanos, porém, não há, ainda, evidências de que haja dimorfismo sexual no Me (Murphy, 1986), embora a delimitação dos bordos precisos deste núcleo seja absolutamente difícil e controverso para que cheguem a conclusões sobre diferenças entre homens e mulheres no volume do Me (vejam-se comentários críticos em Dall'Oglio e col., 2013).

A classificação dos neurônios do Me varia de acordo com diferentes autores. Com base em dados de imunohistoquímica, Sorvari (1997) descreveu três tipos de neurônios encontrados nesse núcleo, a saber: 1) neurônios do tipo I, que apresentam soma esférico ou ovóide com 3 a 10 dendritos de mesma espessura; o dendrito primário ramifica-se em vários dendritos secundários perto do soma; são os mais encontrados na amígdala; 2) neurônios do tipo II, que apresentam corpos multipolares angulares, dendritos primários dando origem a ramificações secundárias finas e são células usualmente maiores que os neurônios do tipo I; 3) neurônios do tipo III, geralmente com corpos

fusiformes, dendritos primários ramificando-se mais distalmente ao soma, podendo ocasionalmente se dividir de modo proximal.

Em estudo recente empregando-se a técnica de Golgi adaptada a tecido humano fixado em formol a 10% por longa data (Dall' Oglio e col., 2013), foi observada a presença de cinco tipos de neurônios no Me humano. Além dos anteriormente descritos por Sorvari, dois tipos adicionais de neurônios multipolares foram relatados: um tipo com corpo celular piriforme e apresentando dois dendritos primários; e outro com corpo celular retangular e largo, com múltiplos dendritos primários – estes últimos neurônios encontrados menos frequentemente no Me. Não se conhece até o momento os detalhes a respeito da morfologia dos espinhos dendríticos nesses cinco tipos de neurônios do Me humano. Esse é um dado morfológico e funcional absolutamente relevante porque os espinhos dendríticos representam locais de contato e processamento da atividade sináptica. Com isso, pode-se buscar, a partir do estudo da forma e distribuição dos espinhos dendríticos, informações inéditas que podem direcionar os raciocínios sobre como os neurônios do Me humano processam informações aferentes e isso para comparações entre condições normais e patológicas que afetam esta estrutura neural.

2. Espinhos Dendríticos

Espinhos dendríticos são protrusões neuronais que servem como especializações sinápticas encontradas na superfície dos dendritos, descritos pela primeira vez por Santiago de Ramón y Cajal em 1888 ao estudar células de Purkinje cerebelares. São encontrados na maioria dos neurônios encefálicos e recebem principalmente contatos sinápticos excitatórios (Hering e Sheng, 2001; Yuste e Bonhoeffer, 2004; Bourne e Harris, 2007; Yuste, 2011; Lai e Ip, 2013). Uma proporção variável de espinhos dendríticos pode ser estável morfolologicamente e funcionalmente, mas outra parte, dependendo de cada região central estudada, por ser “plástica” e ter seu número, distribuição e forma alterados devido a variações elétricas e bioquímicas locais e

dependentes da demanda de atividade sináptica sobre si (revisado em Yuste, 2011, 2013).

Principais especializações dendríticas, os espinhos apresentam diferentes morfologias, e sua heterogeneidade é observada na forma, tamanho e distribuição ao longo do comprimento dendrítico (Benavides-Piccione e col., 2002), variando muito entre diferentes áreas encefálicas e espécies (Benavides-Piccione e col., 2002; Merlo e col. 2011; Rochefort e Konnerth, 2012). Existe uma diversidade de divisões na classificação dos espinhos quanto à forma, mas uma característica muito reconhecida da distribuição morfológica é o continuum na sua variabilidade de forma e tamanho (Arellano e col., 2007). Neste estudo, os espinhos serão classificados em fino, achatado, espesso, em forma de cogumelo ou ramificado (conforme Fiala e Harris, 2007; Brusco e cols., 2010 e referências citadas nestes artigos). Imagens representativas desses tipos morfológicos de espinhos são apresentadas na Figura 2. As diferenças funcionais entre esses espinhos serão exploradas mais adiante.

Ocasionalmente, espinhos ainda podem apresentar protrusões ainda menores em direção às estruturas de seu entorno, ao que se denomina de espínulas. Como uma classificação aparte, os “filopodia” são protrusões finas, sem cabeça e de maior comprimento ($\sim 5\mu\text{m}$) em comparação aos espinhos dendríticos ($\sim 2\mu\text{m}$) (Fiala e Harris, 2007), presentes em maior quantidade no encéfalo em desenvolvimento (Yuste e Bonhoeffer, 2004; Segal, 2005). Possuem caráter transitório (Fiala e Harris, 2007) e podem ser considerados precursores dos espinhos na sinaptogênese (Hering e Sheng, 2001; Segal, 2005).



Figura 2 – Desenho representativo das diferentes morfologias de espinhos dendríticos, surgindo a partir de uma linha de base que representa o ramo dendrítico, tal como se observa pelo emprego da técnica de Golgi e à microscopia de luz. Adaptado de Brusco e col. (2010).

Os espinhos podem ser estudados quanto a seu número, forma e distribuição nos ramos dendríticos. Quanto à sua densidade por micrômetro dendrítico, apesar dos mecanismos de surgimento e estabelecimento dos espinhos dendríticos ainda não estarem plenamente esclarecidos, acredita-se que podem ser formados por dois processos diferentes: proveniente de um “filopodium” e o por surgimento a partir de uma sinapse feita diretamente no tronco dendrítico (Segal, 2005, 2010). Da primeira forma, ocorre a projeção de um “filopodium” e a procura por um terminal axonal para contato o que, quando se forma uma sinapse com um terminal pré-sináptico, faz retrain o “filopodium” e desenvolver um novo espinho. Uma vez que “filopodia” raramente são encontrados em neurônios maduros, acredita-se que o mecanismo da espinogênese nestes pode ser diferente em comparação com o neurônio em desenvolvimento. Da segunda forma, pode ocorrer o surgimento ou, ao contrário, a retração e mesmo o desaparecimento de um espinho de acordo com o estabelecimento ou não de atividade sináptica no tronco dendrito. Neste

caso também é notável que há sinapses diretamente no tronco dendrítico, as quais podem gerar respostas eletrofisiológicas mais intensas que as feitas em decorrência da ativação dos espinhos, e que não necessariamente vão gerar novos espinhos locais (Segal, 2005, 2010). Por fim, é ainda possível que a demanda sináptica e a atividade imposta a cada espinho determine sua permanência ou perda. Desta forma, está descrita a redução na densidade de espinhos dendríticos em neurônios cuja circuitaria apresenta depressão de longa duração (LTD), enquanto a espinogênese está relacionada à potenciação de longa duração (LTP) (Segal, 2005).

No encéfalo maduro de mamíferos há enorme variação no tamanho e forma dos espinhos dendríticos, podendo apresentar volumes menores que $0,01\ \mu\text{m}$ a maiores que $1,5\ \mu\text{m}$ (Harris e Kater, 1994). Esses diferentes espinhos podem coexistir de forma muito próxima em um mesmo ramo dendrítico, podendo inclusive formar sinapses com o mesmo terminal pré-sináptico (Sorra e Harris, 1993). Essa proximidade, ainda, pode levar ao compartilhamento de um mesmo pescoço por duas ou mais cabeças de espinhos, ocasionando os espinhos denominados ramificados. Apesar disso, estes últimos não são achados freqüentes, podendo ser considerados um evento raro dependendo do tipo neuronal estudado (Fiala e Harris, 2007).

O tamanho dos espinhos dendríticos pode ser determinante na sua composição intracelular e vice-versa. Como exemplo, espinhos de maior tamanho contêm maior quantidade de mitocôndrias, polirribossomos na base do pescoço do espinho e maior densidade de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA no terminal pós-sináptico, como é caso dos espinhos com formato de cogumelo. Por outro lado, espinhos finos não apresentam essa mesma composição e podem ter mais receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no terminal pré-sináptico (Fiala e Harris, 2007; Bourne e Harris, 2007; Arellano e col, 2007).

A morfologia dos espinhos dendríticos pode se relacionar com suas propriedades funcionais (Benavides-Piccione e col., 2002; García-López e col., 2007; Lai e Ip, 2013). Deste modo, parâmetros como comprimento do pescoço e espessura da cabeça poderiam explicar a distribuição de receptores na

membrana pós-sináptica, a motilidade e estabilidade dos espinhos e a difusão de íons e moléculas entre espinho e ramo dendrítico (Yuste e col., 2011). A variação morfológica dos espinhos pode, então, relacionar-se com a atividade sináptica processada por este espinho (Alvarez e Sabatini, 2007). Ou seja, a densidade pós-sináptica, que corresponde a aproximadamente 10% do volume da cabeça do espinho, depende da quantidade de impulsos que este espinho recebe, tornando-o mais estável quanto à sua morfologia e funcionamento e, conseqüentemente, com a frequência e intensidade da atividade sináptica da via aferente (Segal, 2005; Bourne e Harris, 2007). Ademais, ao se estudar a ultraestrutura dos terminais pré-sinápticos e dos espinhos contactados, encontram-se sinapses preponderantemente com aspecto morfológico assimétrico (tipicamente contendo o neurotransmissor excitatório glutamato) ou, em menos de 10% das vezes, simétrico (e que contém principalmente o neurotransmissor inibitório GABA) (Merlo e col, 2011; Brusco e col., 2013).

Outras relações entre morfologia e função são possíveis de serem percebidas para os espinhos dendríticos. Como exemplos, a forma de um pescoço fino e comprido pode isolar eletricamente e bioquimicamente a cabeça do espinho do ramo dendrítico (Holmes, 1990; Segal, 2005; Alvarez e Sabatini, 2007; Rochefort e Konnerth, 2012) e o volume da cabeça e o comprimento dos pescoços dos espinhos dendríticos podem se relacionar com a compartimentalização de cálcio (Benavides-Piccione e col., 2002; Segal, 2005, 2010). Esta propriedade isolaria o dendrito dos picos de cálcio que seguem a atividade sináptica, exercendo-se papel protetor contra a morte neuronal (Segal, 2010). Tal função pode ser correlacionada, em parte, com o fato de que níveis moderados de cálcio proporcionam o crescimento do espinho, enquanto que níveis elevados induzem à diminuição de tamanho e mesmo ao seu colapso (Segal, 2005; Alvarez e Sabatini, 2007; García-López e col., 2007; Segal, 2010; Merlo e col. 2011). Tudo isso indica que o estudo das diferentes morfologias dos espinhos dendríticos dão pistas sobre o impacto que as sinapses causam nos neurônios e esta atividade como base de funcionamento de uma estrutura nervosa.

Apesar de terem sido considerados como estruturas estáveis por muitos anos (Bonhoeffer e Yuste, 2002) os espinhos dendríticos são definitivamente

reconhecidos como possíveis componentes celulares dinâmicos (Hering e Sheng, 2001; Fiala e Harris, 2007). Estudos *in vivo* demonstraram que a forma e o volume dos espinhos podem mudar em questão de minutos ou horas (Hering e Sheng, 2001) proporcionada principalmente pelo rearranjo de actina no citoesqueleto (Bonhoeffer e Yuste, 2002; Segal, 2005; Lent, 2008; Hotulainen e Hoogenraad, 2010; Fortin e col., 2012). Com isso, os espinhos dendríticos são estruturas chave para entendimento da plasticidade neural (Holmes, 1990), principalmente no encéfalo maduro (Lent, 2008). Os espinhos dendríticos não são, portanto, apenas achados morfológicos, mas estruturas capazes de aumentar a área de superfície dos dendritos, aumentando a conectividade entre os neurônios, para compartimentalização bioquímica da atividade sináptica e para modular de forma diferente a excitabilidade de distintas regiões neuronais (conforme revisado por Yuste, 2011, 2013).

A morfologia alterada de espinhos dendríticos, tanto na distribuição quanto na morfologia e na sua ultraestrutura, está presente em diversas desordens neurológicas (Fiala e col., 2002; Merlo e col. 2011), como autismo (Hustler e Zhang, 2010; Spronsen e Hoogenraad, 2010; Penzes e col., 2011), síndrome do X frágil (Irwin e col., 2000; Fiala e col., 2002; Hustler e Zhang, 2010; Portera-Cailliau, 2012), síndrome de Down (Fiala e col., 2002), doença de Alzheimer (Fiala e col., 2002; Spronsen e Hoogenraad, 2010; Penzes e col., 2011; Nwabuisi-Heath, 2013) e esquizofrenia (Blanpied e Ehlers, 2004; Penzes e col., 2011). A alteração mais comum é a degeneração varicosa dos dendritos, muitas vezes relacionados com excitotoxicidade e formação de radicais livres de oxigênio no local, o que leva a edema celular e alteração na morfologia dos espinhos (García-López, 2007). Por isso, é relevante também aqui estudar as alterações patológicas nos espinhos dendríticos como relacionados com as manifestações clínicas de diversas doenças que afetam o sistema nervoso central.

Devido ao seu tamanho, os espinhos dendríticos são especializações difíceis de serem estudadas à microscopia de luz. Um dos óbices decorre do seu pequeno tamanho e o fato de que espinhos podem estar localizados acima ou abaixo dos ramos dendríticos e deixarem de ser observados nos cortes histológicos (Fiala e Harris, 2007). Como estratégia, poder-se-ia explorar a sua

visualização no eixo “z” espacial do microscópio óptico, o que possibilitaria acompanhar os espinhos em toda extensão tridimensional do dendrito e, desse modo, evitar descrições parciais da morfologia. Apesar do relato recente da presença de neurônios com espinhos dendríticos no Me humano, não há ainda na literatura descrições detalhadas sobre a morfologia tridimensional desses espinhos.

3. Técnica de Golgi

A técnica de Golgi foi a primeira na Citologia e Histologia que permitiu a visualização simultânea do soma, axônio e dendritos de neurônios. Camillo Golgi publicou a técnica em 1873, porém somente anos mais tarde, em 1885, ela recebeu mais atenção com os achados de Bleuer e Ramón y Cajal. Desde então, o método tem sido utilizado para descrever a morfologia de neurônios de diferentes espécies (Larriva-Sahd, 2013).

Esta técnica se baseia na impregnação argêntica de neurônios e células gliais em secções histológicas de tecido nervoso. A variabilidade na qualidade e intensidade da impregnação do tecido é bastante comum, porém, quando bem sucedida, permite a visualização dos componentes neuronais por meio de uma coloração negra, a qual contrasta com um “fundo” pardo. Em geral, estima-se que tal reação impregna entre 1 a 10% das células de uma região, o que frequentemente possibilita a visualização mais detalhada e fidedigna dos neurônios isolados de células adjacentes. Deve-se atentar, entretanto, a diversos fatores que podem afetar a qualidade dos resultados, como a idade do animal, o tempo de fixação do tecido antes da execução da técnica, a temperatura ambiente e das substâncias empregadas e as diferentes regiões do tecido nervoso a serem estudadas (Dall'Oglio e col., 2007). Os espinhos dendríticos, por si só já representam uma dificuldade para estudo uma vez que seus detalhes morfológicos podem estar no limite da resolução do microscópio de luz.

Desde a publicação original da técnica por Camillo Golgi, diversas variações foram desenvolvidas, a fim de facilitar a execução e obter resultados

com maior sucesso. Neste estudo, utilizamos uma variação do procedimento ‘single-section’ adaptado para tecido humano e descrito por Dall’Oglio e col. (2010).

Ao analisar as imagens obtidas, é importante considerar alguns cuidados para a aquisição de dados que se enquadrem em critérios rígidos de aceitação para estudo. Dentre esses cuidados, destacam-se a necessidade de saber corretamente a localização da região a ser estudada, a prática de evitar os bordos das regiões de interesse e células em zonas de transição entre núcleos ou subnúcleos, a escolha de neurônios que estejam bem impregnados pela prata em toda a sua extensão e que apresentem espinhos dendríticos que permitam ser identificados e classificados sem dúvidas (Dall’Oglio et al, 2007). Para todos os intentos de estudo, faz-se ainda necessária a utilização de equipamento adequado e que possibilite a visualização dos espinhos em grande aumento e com preservação da nitidez das imagens (Fiala e Harris, 2007; Dall’Oglio, 2007). Isso foi desenvolvido para esta dissertação de mestrado e envolve a reconstrução tridimensional de espinhos dendríticos do Me humano Impregnados pela técnica de Golgi e estudados sob microscopia de luz.

4. Técnica do Dil e microscopia confocal

A microscopia confocal é técnica de imagem mais recente e que utiliza feixe de laser de entrada, o feixe de excitação, focado numa pequena área de tecido e no sentido das lentes das objetivas. A denominação confocal deriva do fato de que lasers nas 3 coordenadas espaciais são colocado em um plano focal conjugado na amostra de tecido. Um detector é utilizado na captação da imagem confocal, permitindo-se, ao mudar o ponto focado, a captura da imagem para posterior reconstrução tridimensional (Nwaneshiudu e col., 2012). Esta técnica possibilita a visualização das imagens com melhor contraste e resolução em comparação à microscopia de luz (Rasia-Filho e col., 2010).

Com esta técnica, é possível estudar a morfologia dos espinhos dendríticos por meio do uso do corante fluorescente lipofílico do grupo das carbocianinas denominado “1,1’-dioctadecyl-3,3,Y,3’-tetramethylindocarbocyanine perchlorate” (Dil). A aplicação extracelular deste fluorocromo em secções encefálicas e o uso de microscopia confocal permite a visualização de detalhes dos espinhos dendríticos em imagens reconstruídas tridimensionalmente e com nitidez que pode vir a retificar ou ratificar os dados obtidos com a microscopia de luz (Rasia-Filho e col., 2010, Brusco e col., 2010). De fato, o procedimento técnico empregando-se Dil é, em geral, mais fácil, quando comparado com a técnica de Golgi, devido à sua rapidez e reprodutibilidade.

Algumas complicações na difusão do corante podem ocorrer e, em várias ocasiões, ramos dendríticos e espinhos são observados no neurópilo, mas não concomitantemente com os corpos celulares de origem (Rasia-Filho e col., 2010). A técnica também sofre com a perda da estrutura da membrana celular, por onde o Dil deve se difundir, o que representa grau de dificuldade adicional no seu emprego em tecido humano *post mortem*. Quando se visualizam os espinhos dendríticos, no entanto, eles podem ser descritos quanto à sua variedade morfológica. A quantificação dos resultados obtidos para os espinhos, quer seu comprimento, diâmetro de cabeça e pescoço ou volume total são absolutamente questionáveis e problemáticos em tecido que teve processos patológicos de autólise, modificação osmótica e de pH teciduais e que foi submetido a processamento histológico, como o emprego de substâncias químicas para preservação ou a desidratação e retirada de lipídeos do tecido. Isso faz com que os espinhos dendríticos do Me humano estudados em tecido *post mortem* venham a ser descritos quanto à sua presença, densidade e o aspecto morfológico como um *continuum* de formas e não com seus dados morfométricos plenos. A rigor, todos os aspectos dos espinhos poderiam sofrer algum grau de alteração pela não preservação do tecido como *in vivo*, mas as abordagens neurocirúrgicas que envolvem o Me humano raramente mantêm-no intacto no momento da remoção de tecido traumatizado, ou invadido por células neoplásicas ou quando da aspiração do tecido para a remoção de área epileptogênica.

Tendo por base os comentários acima e a intenção de contribuir para o avanço do conhecimento dos detalhes da morfologia neuronal do Me humano, mormente dos espinhos dendríticos locais, conjugaram-se técnicas para estudo na presente dissertação: a técnica de Golgi com emprego da microscopia de luz e a técnica do Dil com emprego da microscopia confocal. Em ambas trabalhou-se para fazer a reconstrução tridimensional das imagens diminutas dos espinhos dendríticos e descrevê-los quanto à sua presença nos 5 tipos neuronais descritos recentemente no Me humano e os aspectos morfológicos gerais desses espinhos, o que veio a se comprovar como tendo desde formas simples até complexas que nunca haviam sido relatadas anteriormente nem no ser humano e nem em outros animais estudados em laboratório.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Descrever e caracterizar os espinhos dendríticos de neurônios encontrados no Me de seres humanos por meio da técnica de reconstrução tridimensional de imagem sob microscopia de luz e confocal

1.1. Objetivos específicos

Descrever detalhadamente os tipos de espinhos dendríticos somáticos e dendríticos encontrados no Me humano.

Classificar os tipos morfológicos de espinhos somáticos e dendríticos nos diferentes neurônios presentes no Me humano e discutir as possíveis correlações funcionais desses espinhos com a atividade sináptica local.

REFERÊNCIAS

AKMAEV, I G; KALIMULLINA, L B; SHARIPOVA, L A. The central nucleus of the amygdaloid body of the brain: cytoarchitectonics, neuronal organization, connections. ***Neuroscience and Behavioral Physiology***. 2004.

ALVAREZ, V A; SABATINI, B L. Anatomical and Physiological Plasticity of Dendritic Spines. ***Annual Review of Neuroscience***. 30:79–97, 2007.

AMARAL, D G. Memory: anatomical organization of candidate brain regions. In: Plum F. (ed). Handbook of physiology – the nervous system V, Part 2. American Physiological Society, Washington DC, pp. 211-294, 1987.

AMARAL, D G; PRICE, J L; PITKÄNEN, A; CARMICHAEL, S T. Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In: Aggleton JP. (ed). The Amygdala. Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction. Wiley- Liss, New York, pp 1–66, 1992.

ARELLANO, J I; BENAVIDES-PICCIONE, R; de FELIPE, J; YUSTE, R. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. ***Frontiers of Neuroscience***. 1:131-143, 2007.

BENAVIDES-PICCIONE, R; BALLESTEROS-YÁÑEZ, I; de FELIPE, J; YUSTE, R. Cortical area and differences in dendritic spine morphology. ***Journal of Neurocytology***. 31:337–346, 2002.

BLANPIED, T A; EHLERS, M D. Microanatomy of Dendritic Spines: Emerging Principles of Synaptic Pathology in Psychiatric and Neurological Disease. ***Biological Psychiatry***. 55:1121–1127, 2004.

BOURNE, J; HARRIS, K M. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? ***Current Opinion in Neurobiology***. 17:381–386, 2007.

BREECE, E; PACIOTTI, B; NORDHAL, C W; OZONOFF, S; van de WATER, J A; ROGERS, S J; AMARAL, D; ASHWOOD, P . Myeloid dendritic cells frequencies are increased in children with autism spectrum disorder and associated with

amygdala volume and repetitive behaviors. ***Brain, Behavior, and Immunity***. 37, 69-75, 2013.

BRODAL, A. Neurological Anatomy. Oxford University Press, New York. 1053 pp, 1981

BRUSCO, J; MERLO, S; IKEDA, E T; PETRALIA, R S; KACHAR, B; RASIA-FILHO, A A; MOREIRA, J E. Inhibitory and multisynaptic spines, and hemispherical synaptic specialization in the posterodorsal medial amygdala of male and female rats. ***Journal of Comparative Neurology***. 522: 2075-2088, 2014.

BRUSCO, J; DALL'OGGIO, A; ROCHA, L B; ROSSI, M A; MOREIRA, J E; RASIA-FILHO, A A. Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial amygdala. ***Neuroscience Letters***. 483:152-156, 2010.

DALL' OGLIO, A; XAVIER, L L; HILBIG, A; FERME, D; MOREIRA, J E; ACHAVAL, M; RASIA-FILHO, A A. Cellular Components of the Human Medial Amygdaloid Nucleus. ***The Journal of Comparative Neurology***. 52,1, 589-611, 2013.

DALL' OGLIO, A; FERME, D; BRUSCO, J; MOREIRA, J E, RASIA-FILHO, A A. The "single-section" Golgi method adapted for formalin-fixed human brain and light microscopy. ***Journal of Neuroscience Methods***. 189: 51–55, 2010.

DALL' OGLIO, A; MARCUZZO, S; de CASTILHOS, J; RASIA-FILHO, A A. Método de Golgi. In: Métodos em neurociência. Roca, Ed 1, 2007.

DAVIDSON, R J; IRWIN, W. The functional neuronanatomy of emotion and affective style. ***Trends in Cognitive Sciences***. 3(1):11-21, 1999.

DAVIDSON, R J. Darwin and the neural bases of emotion and affective style. ***Annals of New York Academy of Sciences***, 1000:316-36, 2003.

DAYAS, C V; BULLER, K M. CRANE, J W; XU, Y; DAY, T A. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. ***European Journal of Neuroscience***. 14(7):1143-1152, 2001.

de OLMOS, J S. Amygdala. In: Paxinos G, Mai J. (eds). The Human Nervous System. Second Edition. Elsevier, San Diego, pp. 739-868, 2004.

EVERITT, B. Limbic lobe and olfactory pathways. In: Berry, M M; Bannister, L H; Standring, S M. Gray's anatomy. Churchill Livingstone, pp 901-1398, 1995.

FIALA, J C; HARRIS, K M. Dendritic Spines. In: STUART, G; SPRUSTON, N; HÄUSSER, M . Dendrites. 550 pp, 2007.

FIALA, J C; SPACEK, J; HARRIS, K M. D endritic Spine Pathology: Cause or Consequence of Neurological Disorders? ***Brain Research Reviews***. 39, 29–54, 2002.

FORTIN, D A; SRIVASTAVA, T; SODERLING, T R S. Structural modulation of dendritic spines during synaptic plasticity. ***Neuroscientist***. 18: 326-341, 2013.

FUDGE, J L; EMILIANO, A B. The Extended Amygdala and the Dopamine System: Another Piece of the Dopamine Puzzle. ***Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences***. 2003 ; 15(3): 306–316, 2003.

GAMER, M; ZUROWSKI, B; BÜCHEL, C. Different amygdale subregions mediate valence-related and attentional effects of oxytocin in humans. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***. 107:9400-9405, 2010.

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***. 83:110–130, 2007.

GLOOR, P. The Temporal Lobe and Limbic System. Oxford University Press. New York. pp. 865, 1997.

HARRIS, K M; KATER, S B. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. ***Annual Review of Neuroscience***. 17:341-71, 1994.

HERING, H; SHENG, M. Dendritic spines: dynamics and regulation. ***Nature Reviews Neuroscience***. v.2; 880-888, 2001.

HOLMES, W R. **Is the function of dendritic spines to concentrate calcium?** Brain Research. 519: 338-342, 1990.

HUSTLER, J J; ZHANG, H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. **Brain research**.1309, 8, 83-94, 2010.

HÜTTMANN, K; YILMAZER-HANKE, D; SEIFERT, G; SCHRAMM, J; PAPE, H; STEINHÄUSER, C. Molecular and functional properties of neurons in the human lateral amygdale. **Molecular and Cellular Neuroscience**. 31:210-217, 2006.

KIERNAM, J A. Anatomy of temporal lobe. **Epilepsy Research and Treatment**. 2012:1-12, 2012.

LAI, K O, IP, N Y. Structural plasticity of dendritic spines: The underlying mechanisms and its dysregulation in brain disorders. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1832, 2257–2263, 2013.

LARRIVA-SAHAD, J. Cytological organization of the alpha component of the anterior olfactory nucleus and olfactory limbus. **Frontiers of Neuroscience**. 27:6-23, 2012.

LE DOUX, J E; MULLER, J. Emotional memory and psychopathology. **Philosophical Transactions of the Royal Society**. 352, 1719-1726, 1997.

LE DOUX, J E. The emotional brain, fear and the amygdale. **Cellular and Molecular Neurobiology**. 23(4-5):727-738, 2003.

LE DOUX, J E. O Cérebro emocional. Objetiva, 336pp., 2005.

LENT, R. Neuroplasticidade. In: LENT, R. Neurociência da mente e do comportamento. Guanabara Koogan, 372 pp., 2008.

LEONTOVICH, T A; MUKHINA, Y K; FEDOROV, A A. Neurons of the basal ganglia of the human brain (striatum and basolateral amygdale) expressing the enzyme NADPH-d. **Neuroscience and Behavioral Physiology**. , 2004.

MAI, J K; PAXINOS, G; VOSS, T. Atlas of the Human Brain. Academic Press, New York. 271 pp., 2007.

MC DONALD, A J. Cortical pathways to the mammalian amygdale. **Progress in Neurobiology**.. 55, pp. 257- 332, 1998.

MERLO, S; BRUSCO, J; PADOVAN-NETO, F E; ROHNER, C J S; IKEDA, R T, ROSS, J B; BUENO, L S; RUGGIERO, R N; FACHIM, H A; MOREIRA, J E. O ciclo da vesícula sináptica, espinhos dendríticos e a transdução de sinal. **Medicina (Ribeirão Preto)**. 44(2): 157-71, 2011.

MOREY, R A et al. Amygdala volume changes with posttraumatic stress disorder in a large case-controlled veteran group. **Archives of General Psychiatry**. 69(11): 1169–1178, 2012.

MURPHY, G M Jr. The human medial amygdaloid nucleus: no evidence for sex differences in volume. **Brain Research**. 106:321-332, 1986.

NECKEL, H; QUAGLIOTTO, E; CASALI, K R; MONTANO, N; DAL LAGO, P; RASIA-FILHO, A A. Glutamate and GABA in the medial amygdala induce selective central sympathetic/parasympathetic cardiovascular responses. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 90 (5):525-36, 2012.

NWABUISI-HEATH, E; REBECK G W; LA DU, M J; YU, C. ApoE4 delays dendritic spine formation during neuron development and accelerates loss of mature spines in vitro. **American Society for Neurochemistry**. 6(1):21-28, 2013.

NWANESHIUDU, A; KUSCHAL, C; SAKAMOTO, F H; ANDERSON,R; SCHWARZENBERGER, K; YOUNG, R C. Introduction to Confocal Microscopy. **Journal of Investigative Dermatology**. 3:132-137, 2012.

PENZES, P; CAHILL, M E; JONES, K A; VAN LEEUWEN, J; WOOLFREY, K M. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**. 14(3): 285–293, 2011.

PHELPS, E A; ANDERSON, A K. Emotional memory: What does the amygdala do? **Current Biology**. 7:11–14, 1997.

PHELPS, E A; LE DOUX, J E. Contributions of the Amygdala to Emotion Processing: From Animal Models to human Behavior. **Neuron**. 48, 175–187, 2005.

PITKÄNEN; A; TUUNANEN, J; KÄLVIÄINEN, R; PARTANEN, K; SALMENPERÄ, T. Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**. 32: 233–253, 1998.

POHL, A; ANDERS, S; SCHULTE-RUTHER, M; MATHIAK, K; KIRCHER, T. Positive Facial Affect – An fMRI Study on the Involvement of Insula and Amygdala. **PLoS ONE**. 8(8): 69886, 2013.

PORTERA-CAILLIAU, C. Which Comes First in Fragile X Syndrome, Dendritic Spine Dysgenesis or Defects in Circuit plasticity? **The Neuroscientist**. 18(1):28–44, 2012.

PRICE, J L; RUSSCHEN, F T; AMARAL; D G. The limbic region. II: The amygdaloid complex. In: Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 5, pp. 279±388. Eds. A. Björklund, T. Hökfelt and L.W Swanson. Elsevier: Amsterdam, 1987.

RASIA-FILHO, A A; FABIAN, C; RIGOTI, K; ACHAVAL, M. Influence of sex, estrous cycle and motherhood in dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. **Neuroscience**. 126:839–847, 2004.

RASIA-FILHO, A A; HILBIG, A. Papel da amígdala e do hipocampo no transtorno do estresse pós-traumático. In: Güntert, Bl.; Chinally M. (eds.). Transtorno do estresse pós traumático. Parte I. Casa do Psicólogo, São Paulo, pp 37-53, 2005.

RASIA-FILHO, A A; GIOVENARDI, M; ALMEIDA, R M M. Drugs and aggression. **Recent Patents on CNS Drug Discovery**. 3, 40-49, 2008.

RASIA-FILHO, A A; DALL’OGLIO, A; DALPIAN, F; IDE, L M; BRUSCO, J; MOREIRA, J E. The adapted “single-section” Golgi method and the Dil fluorescent dye in microscopy for describing neuronal and glial morphology in different species. In: Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. MÉNDEZ-VILLAS, A e DÍAZ, J. vol.1, pp.1-784, 2010.

RASIA-FILHO, A; BRUSCO, J; ROCHA, L; MOREIRA, J. Dendritic spines observed by extracellular Dil dye and immunolabeling under confocal microscopy. **Protocol Exchang**. 2010.

RASIA-FILHO, A A; DALPIAN, F; MENEZES, I C; BRUSCO, J; MOREIRA, J E; COHEN, R S. Dendritic spines of the medial amygdala: plasticity, density, shape, and subcellular modulation by sex steroids. **Histology and Histopathology**. 27(8):985-1011, 2012.

ROCHEFORT, N L; KONNERTH, A. Dendritic spines: from structure to in vivo function. **European Molecular Biology Organization**. 13 (8): 699-708, 2012.

SAHA, S. Role of the central nucleus of the amygdale in the control of blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 32: 450-456, 2005.

SAYGIN, Z M; OSHER, D E; AUGUSTINACK, J; FISCHL, B; GABRIELI, J D E. Connectivity-based segmentation of human amygdale nuclei using probabilistic tractography. **NeuroImage**. 56:1353–1361, 2011.

SCHUMANN, C M; BAUMAN, M D; AMARAL, D G. Abnormal structure or function of the amygdala is a common component of neurodevelopmental disorders. **Neuropsychologia**. 49: 745-759, 2011.

SEGAL, M. Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. **European Journal Neuroscience**. 31:2178-2184, 2010.

SEGAL, M. Dendritic spines and long-term plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**. 6: 277:84, 2005.

SIMS, K S; WILLIAMS, R S. The human amygdaloid complex: a cytologic and histochemical atlas using nissl, myelin, acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase staining. **Neuroscience**. 36 (2):449-472, 1990.

SORRA, K E; HARRIS, K M. Occurrence and three-dimensional structure of multiple synapses between individual radiatum axons and their target pyramidal cells in hippocampal area CA1. **Journal of Neuroscience**. 13:3736-48, 1993.

SORVARI, H. Neurons containing calcium-binding proteins in the human amygdaloid complex. PhD Thesis. University of Kuopio, Kuopio, Finland, 1997.

SPRONSEN, M; HOOGENRAADM, C C. Synapse Pathology in Psychiatric and Neurologic Disease. **Current Neurology and Neuroscience Reports**. 10:207–214, 2010.

ULFIG, N; SETZER, M; BOHL, J. Ontogeny of the human amygdala. **Annals of New York Academy of Sciences**. 985: 22-33, 2003.

QUAGLIOTTO, E; NECKEL, H; RIVEIRO, D F; CASALI, K R; MOSTARDA, C; IRIGOYEN, M C; DAL LAGO, P; RASIA-FILHO, A A. Histamine in the posterodorsal medial amygdala modulates cardiovascular reflex responses in awake rats. **Neuroscience**.157(4):709-719, 2008.

WHALEN, P J; PHELPS, E A. The human amygdala. The Guilford Press, 429 pp., 2009.

YILMAZER-HANKE, D M. Amygdala. In: Paxinos G, Mai J. (eds). The Human Nervous System. Third Edition. Elsevier, San Diego, pp. 759-834, 2012.

YUSTE, R. Electrical compartmentalization in dendritic spines. **Annual Review of Neuroscience**. 36, 429-449, 2013.

YUSTE, R. Dendritic spines and distributed circuits. **Neuron**. 71: 772-781, 2011.

YUSTE, R; BONHOEFFER, T. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. **Nature Reviews Neuroscience**. 5:24-34, 2004.

YUSTE, R; BONHOEFFER, T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. **Annual Review of Neuroscience**. 24:1071–89, 2001.

ZALD, D.H.; PRADO, J.V. Emotion, olfaction, and the human amygdala: Amygdala activation during aversive olfactory stimulation. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA***. 94:4119-4124, 1997.

ZALD, D H. The human amygdale and the emotional evaluation of sensory stimuli. ***Brain Research Reviews***. 41:88-123, 2003.

ARTIGO

SOMATIC AND DENDRITIC SPINES IN THE HUMAN MEDIAL AMYGDALOID NUCLEUS

^{1*}Ana Carolina L. Dutra,^{1*}Aline Dall'Oglio, ^{2#}Jorge E. Moreira, ^{1#}Alberto A. Rasia-Filho

¹Laboratory of Morphology and Experimental Physiology, Department of Basic Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), RS 90050-110, Brazil

²Laboratory of Synaptic Structure, Department of Cell, Molecular Biology and Biopathogens, and Department of Neuroscience and Behavior, Ribeirão Preto School of Medicine/University of São Paulo (FMRP/USP), SP14049-900, Brazil

Abbreviated title: Dendritic spines in the human medial amygdala

Number of tables: 1

Number of figures: 13

*These authors contributed equally to the present study.

Corresponding authors:

#Prof. Alberto A. Rasia-Filho

UFCSPA, Sarmiento Leite 245, Porto Alegre RS 90050-170, Brazil

Phone: +55 51 91161643. E-mail: rasiafilho@pq.cnpq.br, aarf@ufcspa.edu.br

#Prof. Jorge E. Moreira

FMRP/USP, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto SP 14049-900, Brazil

Phone: +55 16 36023284. E-mail: cello@fmrp.usp.br

Key-words: Amygdala cytology, Neuronal morphology, Spine shape, Golgi method, Dil dye, 3D reconstruction, Human brain.

O artigo será submetido à Journal of Comparative Neurology.

Abstract

The human medial amygdaloid nucleus (Me) has been recognized as an important subcortical area for the interpretation of visual and olfactory stimuli, the elaboration of emotions and social behaviors, and alterations in various neuropathological conditions. This addresses the importance of a detailed study of the Me neurons and spines, specialized postsynaptic compartments where most excitatory contacts are made. Here, we provide these data and depict somatic and dendritic spines in the 5 types of multipolar neurons of the adult male human Me from both hemispheres using the Golgi method and light microscopy, and the carbocyanine Dil fluorescent dye and confocal microscopy. The Me spines had their bidimensional and tridimensional images reconstructed and showed a continuum of shapes and sizes, laying isolated or forming clusters, and were classified as: thin, mushroom, stubby/wide, ramified or, notably, as atypical and with a notable complex morphology (e.g., double spines, enlarged spines with both thin thorns and variable bulbous protrusions, spines with racemose appendages, and thorny excrescences). Large thin spines with a gemmule appearance, spinules, and filopodium-like protrusion were also observed. Although with particularities, these pleomorphic spines were found on the cell body, in proximal dendrites, and along different lengths of dendritic branches, which indicate a potentially variable synaptic strength and plasticity in the human Me. The present data set another level of complexity to the understanding of the Me cellular specialization and synaptic organization and provide a basic contribution to the implications of this brain area in normal and pathological conditions.

INTRODUCTION

The human amygdaloid complex is an aggregate of various nuclei with distinct cytoarchitectonical, connectional, and functional features in the subcortical part of the dorsomedial pole of the temporal lobe, rostral to the hippocampus, and close to the inferior margins of the claustrum, putamen, and globus pallidus (Brodal, 1981; Everitt, 1995; de Olmos, 2004; Yilmazer-Hanke, 2012; Dall'Oglio et al., 2013). The medial amygdaloid nucleus (Me) has a superficial position, lateral to the optic tract and at the fundus of the endorhinal sulcus, with an irregular shape in the rostro-caudal axis (Everitt, 1995; Gloor, 1997; de Olmos, 2004). There are some evidence to suggest that the Me can form a continuum with part of the bed nucleus of the stria terminalis (BST) in monkey and human (Martin et al., 1991; Heimer et al., 2008), but the definitive subdivision of the human Me could not be reliably and uniformly established until the moment (Dall'Oglio et al., 2013 and references therein).

The connectivity and functional implications of the primate Me are under study as well (Yilmazer-Hanke, 2012). As reviewed elsewhere (Dall'Oglio et al., 2013), the monkey Me receives intra-amygdaloid connections from the basal and lateral nuclei and projects to the accessory basal, anterior cortical and central nuclei, to the periamygdaloid cortex, and to the amygdalohippocampal area (Everitt, 1995; Freese and Amaral, 2009). Major afferences to the Me come from the brainstem peripeduncular nucleus, the hypothalamic ventromedial nucleus, the lateral area, the supramammillary region, and the rostral insular cortex; whereas relevant output projections reach the medial areas of the BST, the medial preoptic area and the

anterior medial hypothalamus, including the paraventricular and supraoptic nuclei as well as the hypothalamic ventromedial, the dorsal and ventral premammillary nuclei, and the midline thalamic nuclei (Everitt, 1995; Freese and Amaral, 2009). Accordingly, the Me neurons are placed in various neural circuits and can influence the processing of relevant social stimuli. For example, the human Me likely participates in the interpretation of olfactory stimuli (Zald and Prado, 1997), in the gonadal hormone-mediated premenstrual increase in stress-induced negative affect (Ossewaarde et al., 2013), and the perception and processing of aversive stimulus caused by fearful faces or the positive valence of happy faces needed for the elaboration of emotions and behavioral displays (Gamer et al., 2010). Although it is technically difficult to determine the separate functions and specific disturbances occurring in each amygdaloid nucleus, which hopefully will be improved by new image techniques (Saygin et al., 2011), the Me has been associated with the pathogenesis of various neurological and psychiatric disorders, such as epilepsy, autism, schizophrenia, Parkinson's disease, Huntington's corea, and Alzheimer's disease (e.g., Sorvari, 1997; Schumann and Amaral, 2005, and references therein).

These data reinforce the need for a detailed study of the Me neurons and local synaptic organization. In this sense, spines are specialized protrusions mainly involved with signaling excitatory synaptic input onto neurons (c.f., Harnett et al., 2012; Fortin et al., 2013; but see also Brusco et al., 2014), the elaboration of voltage-sensitive postsynaptic responses, and the ensuing electrophysiological activity of the neuron on integrated neural networks (Gulledge et al., 2012; Lee et al., 2012; Rochefort and Konnerth, 2012; Yuste, 2013). The structural plasticity of dendritic spines is evident by their variable shapes, sizes, and distribution, which can be

affected by both synaptic demand and strength (García-López et al., 2010). Dendritic spines can also buffer synaptically-mediated calcium increase (Segal, 2010), compartmentalize intracellular biochemical cascades or initiate the mechanisms for information storage (Boersma et al., 2011; Fortin et al., 2012; see also Yuste, 2011). Therefore, the study of spines provide insight into the wiring of brain circuits, the selective formation and retention of synaptic contacts between neurons, the mechanisms for arranging new connections in adult brains, and those of altered synapses in various disease states (Belichenko et al., 2009; García-López et al., 2010; Kuwajima et al., 2013). It is remarkable that structural aspects of dendritic spines can vary according to the increasing inputs and integrative capacity of neurons, among brain areas (Jacobs et al., 1997; 2001; Anderson et al., 2009), and between species (Benavides-Piccione et al., 2002), including differences when comparing humans with other great ape species, our closest living relatives (Bianchi et al., 2012).

Recently, 5 types of neurons were identified in the human Me based on the Golgi method (Dall'Oglio et al., 2013), which expanded previous immunohistochemical results (Sorvari, 1997), but no detailed description of the spines in these different populations of Me neurons was available. The presence and shape of somatic spines are rarely described in morphological studies. Here, we provide these data and show details on the shape and distribution of both somatic and dendritic spines in the neurons of the human Me by bidimensional- and tridimensional (3D)- reconstruction of images obtained with the Golgi method and light microscopy, and with the carbocyanine Dil fluorescent dye and confocal microscopy. We observed both isolated and clustered spines with a continuum of different classical shapes, but,

interestingly, also found some atypical and more complex dendritic spines in the human Me with no absolute counterpart in the Me of other already studied species (e.g., based on the available images: rat, Rasia-Filho et al., 2004; Cooke et al., 2007; Rasia-Filho et al., 2012; Brusco et al., 2014; mouse, Bian et al., 2008; Niimi et al., 2012; Bian, 2013; cat, Hall, 1972; monkey, Pitkänen and Amaral, 1994; McDonald et al., 1995).