

GESTTER WILLIAN LATTARI TESSARIN

Distribuição de neurônios imunorreativos para calbindina e calretinina no córtex pré-frontal do macaco-prego - *Sapajus (Cebus apella)*.

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, concentração de estudos na anatomia química do córtex cerebral do macaco-prego - *Sapajus Cebus apella*).

Orientador: Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti

ARAÇATUBA – SP

2013

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Fernando e Delaine**,

para mais essa etapa concluída vocês foram, como sempre, fundamentais. Assim como em toda minha caminhada quando tropecei, vocês incessantemente ali estavam para me estender as mãos. Pelo amor, paciência, compreensão, entendimentos, carinho e dedicação de uma vida. Aprendi que não temos a necessidade de sermos somente alguém com amplo conhecimento de uma área escolhida, mas também que precisamos ser ora criança ora adulto. Tudo que sou e tudo que tenho devo a vocês. Palavras não existem para declarar a gratidão e o amor. Muito obrigado.

Ao meu irmão **Bremer**,

que apesar da distância sempre esteve ao meu lado. Saiba que em muitas condutas meu espelho é você. Sua dignidade, honestidade e hombridade contribuíram para construir meu caminho. Tenho orgulho de ser seu irmão e, com certeza, poder contar contigo sempre.

À minha amiga **Thamires**,

que me acompanhou nos momentos mais complexos de todo esse projeto de vida. Seu apoio nessa conquista foi imprescindível. Cresço cada dia com seus ensinamentos, sendo meu exemplo de caráter, conduta e superação. Admiração infinita. Agradeço constantemente por ter te conhecido. De forma indiscutível, meus agradecimentos sinceros.

Aos meus amigos **Carlos e Rosana**,

que compreenderam todos meus momentos difíceis e de estresse para a realização deste sonho que em partes, alimentará o passado. Com vocês aprendi que tudo tem algo a ser ainda encontrado e que aqui não estamos apenas por uma simples passagem. Obrigado por me receberem como um filho e se tornarem os pais presenciais que aqui não possuí. Agradecimentos eternos.

Agradecimentos

Especiais

Agradecimentos especiais

A Deus,

por iluminar meus passos e ter tornado tudo isso que inicialmente pareceu impossível, possível. Sou infinitamente grato pelas pessoas que colocastes em meu caminho e pelas experiências boas e também as ruins, as quais foram fundamentais no aprendizado até o momento. Obrigado pelas oportunidades de exercitar a humildade, fé e dignidade.

Ao Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo,

pela paciência, sabedoria e tranquilidade com que conduziu a orientação nesses longos anos de convivência. Pouquíssimos instantes difíceis passamos, mas saiba que jamais influenciou negativamente em qualquer aspecto. Aprendi muito com o senhor. Com certeza é e será meu exemplo de como exercer uma futura pós-graduação e uma possível docência. Mais uma vez, muito obrigado.

Ao amigo Miguel Antônio Xavier de Lima,

que foi o grande responsável pelo início deste trabalho. Participou ativamente dos meus primeiros passos científicos. Ajudou e colaborou com tudo. Mesmo estando distante ainda contribui ativamente com minhas conquistas científicas. Mais do que um amigo, um irmão. Sou muito grato a você. Obrigado.

Ao amigo Rafael Dezotte da Silva,

que em todos os momentos complicados e difíceis sempre estendeu a mão e articulou palavras positivas, as quais foram fundamentais para continuar a caminhada. Suas poucas vindas à Araçatuba tornaram os momentos inesquecíveis. É ilustre saber que posso contar contigo sempre. Tornou-se mais do que um amigo e então, agora posso lhe chamar de irmão. Serei eternamente grato a você. Muito obrigado.

Às amigas Laís Leal Limieri, Isabela Rogério de Paiva e Wiry Samara Cândido Vieira,

pois todo esse trabalho não seria realizado sem vossas imensas ajudas em cada etapa de confecção. Vocês são pessoas que contribuíram muito com minha formação. Educação, honestidade, companheirismo e palavras tonaram o ambiente de trabalho algo fantástico.

Sentia alegria ao me deslocar até aqui e encontrá-las. Com certeza coisas boas as aguardam no futuro. Obrigado!

Aos amigos **Márcio Luiz Ferro Alves, Luiz Henrique Ferreira dos Santos Bonfietti, Guilherme Bergamo Brandão de Oliveira, Samuel Santos Paulon, Éverton Ribeiro Lélis, Igor de Oliveira Puttini e Ricardo Dezotte da Silva,**

pela confiança, respeito e irmandade construída nesse período de graduação e pelos bons momentos compartilhados em Araçatuba. Torço por vocês e tenho certeza que construímos uma amizade sólida, incontestável.

Às amigas **Taís Fernandes Pimenta e Jéssica de Oliveira Barbosa Ribeiro,**

que colaboraram com este sonho concluído. Já fazem parte de estudos iniciados para traçar um novo percurso. Desde agora, muito obrigado.

Agradecimentos

Agradecimentos

Agradeço à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de sua Diretora Prof^a. Dra. Adj. Ana Maria Pires Soubhia e Vice-Diretor Prof. Tit. Wilson Roberto Poi, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

À **FAPESP** (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*), pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica sob o **processo Nº 2011/20912-9**, tornando possível a realização desse projeto e de um sonho.

Ao **Departamento de Ciências Básicas**, na pessoa do Chefe de Departamento Prof. Adj. Cláudio Aparecido Casatti que possibilitou a execução de toda parte experimental do presente trabalho com adendo especial às disciplinas de Anatomia.

Ao **Prof. Ass. Dr. Cláudio Aparecido Casatti**, da **Disciplina de Histologia e Embriologia**, que entre momentos e outros colaborou intensamente com o desenvolvimento deste projeto, assim como fez parte da realização de um grande sonho. Muito obrigado.

Ao **Prof. Ass. Dra. Alaíde Gonçalves**, da **Disciplina de Histologia e Embriologia**, onde muitas conversas foram frutíferas para gerar força e ânimo para percorrer mais um pedaço do caminho. Muito obrigado.

Ao **Prof. Titular Dr. José Américo de Oliveira**, da **Disciplina de Anatomia**, pelos inúmeros ensinamentos de Anatomia, o qual sou grato desde o princípio e eternamente. Junto a ele aprendi mais claramente o quão importante é tornarmos cidadãos, além de profissionais qualificados. Muito obrigado.

Ao **Prof. Ass. Dr. Paulo Roberto Botacin**, da **Disciplina de Anatomia**, que contribuiu de forma ilustre para minha formação acadêmica e também para a formação do caráter que hoje possuo. Muito obrigado.

A **Prof. Ass. Dr. Roberta Okamoto**, da **Disciplina de Anatomia**, que chegou à parte final dessa caminhada, orientou e ajudou com toda dedicação e carisma contribuindo com meus conhecimentos. Obrigado.

Ao **Prof. Ass. Dr. Edilson Ervolino**, da **Disciplina de Histologia e Embriologia**, pela ajuda laboratorial, nos esclarecimentos de inúmeras dúvidas que emergiram para o desenvolvimento deste, nas capturas de imagens e edição. Pela sabedoria. Muito obrigado.

Aos **Servidores do Departamento de Ciências Básicas**, André Luís Mattos Piedade, Arnaldo César dos Santos, Sandra Aparecida dos Santos Pinheiro, Eliseide Maria Ferreira Silva Navega que contribuíram com respeito e humildade não só para a realização desta pesquisa, mas também para com minha formação. Em especial agradeço **José Ari Gualberto Junqueira** que também fez parte dos meus conhecimentos adquiridos de Anatomia e que ofereceu imagens de alta qualidade para ilustrar algumas aulas durante a graduação, assim como peças anatômicas, nas quais pude estudar de forma profunda. Obrigado.

Enfim, aos **animais** desse experimento, meu profundo respeito.

Epígrafe

Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.

Carl Sagan.

Resumo

TESSARIN, G.W.L. **Distribuição de neurônios imunorreativos para calbindina e calretinina no córtex pré-frontal do macaco-prego (*Sapajus - Cebus apella*)**. Trabalho de conclusão de curso. Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2013.

Resumo

O córtex pré-frontal (CPf) ocupa a região mais anterior do lobo frontal, apresentando desde um ponto de vista filogenético um aumento gradual de superfície. Seu desenvolvimento tem sido associado à aquisição de condutas cada vez mais elaboradas. Se bem o CPf de macacos do Velho Mundo (catarrinos) tem sido exaustivamente estudado, o mesmo não acontece com o CPf dos macacos platirrinos. Este grupo de primatas apresenta uma história evolutiva incerta e sujeita a acirrados debates, mas é aceito que eles evoluíram independentemente dos macacos do Velho Mundo por um período de aproximadamente 30 milhões de anos. Desde uma perspectiva evolutiva, é importante entender como esse processo de evolução paralela repercutiu na organização da circuitária cortical, e assim a distribuição de elementos neuroativos podem oferecer informações relevantes. Nesse estudo analisamos a distribuição de neurônios que expressam calbindina e calretinina em seis áreas do córtex pré-frontal do macaco-prego (*Sapajus apella*) assim como a morfologia celular. Foram utilizados dois animais machos, adultos jovens, provenientes do Núcleo de Procriação de Macacos-Prego, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP. Os animais foram perfundidos, decapitados e a região contendo o córtex pré-frontal foi removido a partir de planos estereotáticos pré-determinados. O bloco foi posteriormente crioprotegido e seccionado em microtomia de congelação, com espessura de cortes de 40µm. Os cortes resultantes foram submetidos as técnicas imuno-histoquímicas para evidênciação de calbindina e calretinina. Neurônios imunorreativos para cada técnica foram quantificados utilizando o software Image-Pro Plus, e foi posteriormente determinada a densidade neuronal (número de neurônios por mm²). Para determinar eventuais diferenças entre áreas foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e o post-teste de Dunn. Quanto aos aspectos morfológicos, foram observados diversos tipos celulares com

predominância de células bipolares localizadas nas camadas supragranulares para as duas proteínas analisadas. O neuropilo também se distribuiu homogeneamente nas áreas selecionadas para o estudo, tanto para calbindina como para calretinina. Basicamente, esta homogeneidade entre áreas foi também observada em relação aos aspectos quantitativos. Finalmente concluímos que tanto o neuropilo quanto a população neuronal imunorreativa para calbindina e calretinina se distribuíram homogeneamente nas áreas selecionadas. Assim sendo, não existe uma correspondência entre os dados qualitativos e quantitativos analisados que permita correlacionar a distribuição destas proteínas com áreas arquitetônicas já definidas para o córtex pré-frontal do *Sapajus apella*.

Palavras-chave: Córtex pré-frontal. Proteínas ligantes de cálcio. Calbindina. Calretinina. Macaco-prego (*Sapajus apella*). Tipos celulares.

Abstract

TESSARIN, G.W.L. **Distribution of immunoreactive neurons for calbindin and calretinin in the prefrontal cortex of Cebus monkeys (*Sapajus apella*)**. End of course paper. School of dentistry, São Paulo State University, Araçatuba, 2013.

Abstract

The prefrontal cortex (PFC) occupies the most anterior region of the frontal lobe, showing from a phylogenetic viewpoint a progressive increase of surface. This development has been associated with the acquisition of increasingly sophisticated behaviors. Although the PFC of Old World monkeys (catarrhines) has been extensively studied, the same does not happen with the PFC of platyrrhine monkeys. The evolutionary history of New World monkeys is still open to question, but it is accepted that they evolved independently of Old World monkeys for a period of approximately 30 million years. From an evolutionary perspective, it is important to understand how this process of parallel evolution reflected in the organization of cortical circuitry, and thus the distribution of neuroactive elements can provide relevant information. We analyzed in this study the distribution of neurons that express calbindin and calretinin in six areas of the prefrontal cortex in Capuchin monkey (*Sapajus apella*) as well as its cellular morphology. Two young adult animals were used originated from the Primate Center at the School of Dentistry of Araçatuba (UNESP – University Estadual Paulista, São Paulo, Brazil). The animals were perfused and decapitated and the region containing the prefrontal cortex was removed according to the pre-determined stereotactic plans. The block was later cryoprotected and sectioned using freezing microtome, producing 40µm width cuts. They were subjected to the immuno-histochemical techniques in order to highlight calbindin and calretinin. Immunoreactive neurons to each technique were quantified using the Image-Pro Plus software and then their neuronal densities were determined (number of neurons per mm²). In order to determine eventual differences between areas the Kruskal-Wallis non-parametric test and the Dunn post-test were applied. Regarding the morphologic aspects, several cellular types were observed; predominantly bitufted cells located in the supragranular layers for both analysed proteins. The neuropil was also homogeneously distributed in the selected areas of study, for both calbindin and calretinin. Basically, such homogeneousness between areas was also observed regarding the quantitative aspects. Finally, we have concluded that both neuropil and the immunoreactive neural population

reactive to calbindin and calretinin were homogeneously distributed in the selected areas. Thus, there is no correspondence between quantitative and qualitative data analyzed that permits us correlate the distribution of these proteins and architectonic defined areas in the prefrontal cortex of the Capucin monkey (*Sapajus apella*).

Keywords: Prefrontal cortex. Calcium binding protein. Calbindin. Calretinin. Capuchin monkey (*Sapajus apella*). Cell types.

SUMÁRIO

Sumário

Introdução	20
Proposição	27
Materiais e Métodos	29
Resultados	38
Discussão	53
Conclusões	60
Referências Bibliográficas	62
Apêndice	72

INTRODUÇÃO

Introdução

Informações preliminares.

A presente análise representa a conclusão do nosso estudo sobre a distribuição das principais proteínas ligantes de cálcio no córtex pré-frontal (CPf) do *Sapajus apella*. Anteriormente tínhamos analisado a distribuição da parvalbumina, e agora finalizamos com o estudo da distribuição da calbindina (Cb) e da calretinina (Cr).

Desta vez contamos com uma definição bastante precisa sobre as áreas citoarquitetônicas do CPf do macaco-prego. De fato, recentemente sugerimos uma nova proposta de divisão baseada na cito, mielo e quimioarquitetura desta região cortical (CRUZ-RIZZOLO, et al., 2011). Esta divisão permite agora uma descrição mais precisa da distribuição horizontal (áreas corticais) e vertical (camadas corticais) não apenas das CBPs (*do inglês*, calcium-binding-protein), mas de outras substâncias potencialmente neuroativas, correlacionando essa distribuição com o mapa arquitetônico proposto por nosso grupo.

O córtex pré-frontal nos primatas.

O córtex pré-frontal apresenta do ponto de vista filogenético um aumento gradual de superfície. Compreende 3% do neocórtex do gato, 7% no cão, 8,5% no lêmure, 11,5% em macacos catarrinos (macacos do Velho Mundo), 17% em chimpanzés, e alcança seu máximo desenvolvimento no cérebro humano, no qual ocupa aproximadamente 30% do manto cortical.

Esse progressivo aumento na árvore filogenética tem sido associado à aquisição de condutas cada vez mais elaboradas e acredita-se que esteja relacionada com as elevadas funções intelectuais observadas no homem (GOLDMAN-RAKIC, 1987; FUSTER, 1989, 1991).

A complexidade na conformação anatômica externa do CPf difere de forma acentuada nas diversas espécies. Entre os primatas pode variar desde um aspecto praticamente lisencefálico, como nos do gênero *Saguinus*, até padrões complexamente elaborados como os observados em gorilas (*Gorilla gorilla*) e no homem.

Do ponto de vista arquitetônico o estudo mais antigo sobre o CPf de primatas catarrinos foi realizado por Brodmann (1909). Utilizando uma terminologia numérica este autor distinguiu seis diferentes áreas nestes animais. Posteriormente, Vogt e Vogt (1919), em primatas do gênero *Cercopithecus* distinguiram nove áreas no córtex pré-frontal dorsolateral (CPfdl). Walker em 1940 realizou um estudo específico sobre o CPf do macaco rhesus (*Macaca mulatta*), tentando adaptar suas observações aos padrões observados por Brodmann no homem. Assim, definiu nove áreas citoarquitetônicas no CPf (áreas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 45 e 46), as quais seriam comparáveis às áreas da mesma denominação no cérebro humano.

Após o trabalho de Walker, diversos autores têm proposto novos mapas citoarquitetônicos que modificam, em parte, suas descrições (VON BONIN; BAILEY, 1947; MESULAM; MUFSON, 1982; AMARAL; PRICE, 1984; BARBAS; PANDYA, 1989; MORECRAFT et al., 1992). Estas modificações têm sido realizadas em diferentes contextos. Assim, Von Bonin e Bailey (1947) o fazem num estudo de parcelamento global do córtex cerebral do macaco rhesus, onde adotam uma terminologia de letras, seguindo a introduzida por Von Economo (1929) para o cérebro humano. Von Bonin e Bailey (1947) distinguem quatro áreas citoarquitetônicas no CPfdl do rhesus. Os outros estudos têm sido realizados em épocas mais recentes, no contexto de análises das conexões do CPf ou áreas vizinhas.

Até 2011, o único estudo citoarquitetônico do CPf do *Sapajus apella* tinha sido realizado por Von Bonin (1938), no contexto de um estudo global do córtex cerebral deste primata. Nesse estudo, que utilizou apenas um único animal, Von Bonin (1938) diferenciou quatro diferentes áreas no CPf do *Sapajus apella* (Figura 1). Para evitar interpretações apressadas de eventuais homologias, utilizou uma terminologia diferente da utilizada por Brodmann (1909) no cérebro humano. O mapa arquitetônico resultante desta divisão de Von Bonin (1938), no que se refere ao CPf, difere consideravelmente do proposto por Walker (1940) para o rhesus, o que poderia indicar que o CPf do *Sapajus apella* e *Macaca* apresentam grandes diferenças.

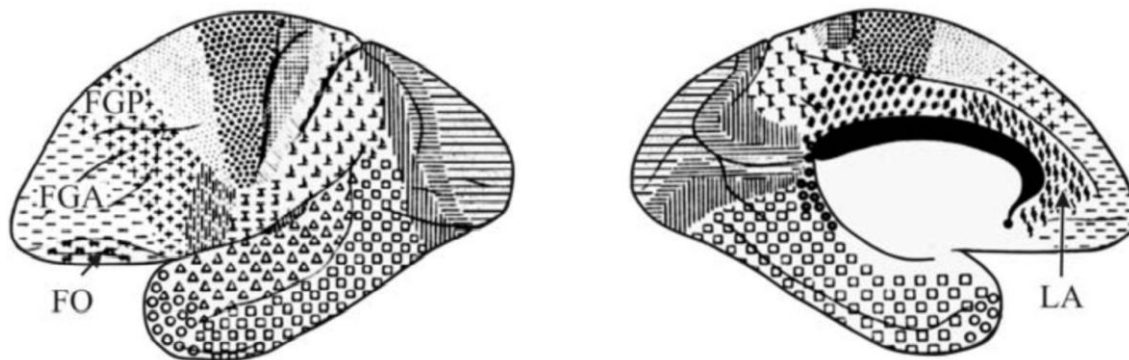


Figura. 1. Divisão arquitetônica do encéfalo do *Sapajus apella* proposta por Von Binon (1938). Neste estudo o autor dividiu o CPf em quatro áreas: frontal granular posterior, FGP; fontal granular anterior, FGA; frontal orbital, FO e área límbica anterior, LA, na superfície medial.

Em virtude dessas discrepâncias e das limitações do trabalho de Von Bonin (1938) - pelo fato de ter utilizado um único animal e critérios puramente citoarquitetônicos, nosso grupo realizou uma nova e detalhada análise desta importante região cortical, incluindo ferramentas mielo e quimioarquitetônicas. Esta reavaliação da arquitetura do CPf do *Sapajus apella* apontou grandes semelhanças em relação ao CPf de animais do gênero *Macaca* (CRUZ-RIZZOLO et al., 2011). Áreas corticais consideradas por alguns autores como especializações evolutivas de primatas antropóides como a área 46 na região periprincipalis, foram também identificadas no macaco-prego com base nas suas características topográficas e arquitetônicas. Considerando que o *Sapajus apella* e *Macaca* evoluíram de forma paralela durante um período de 35 milhões de anos enfrentando desafios ambientais diversos, esta semelhança em áreas corticais filogeneticamente recentes resulta intrigante. Desde uma perspectiva evolutiva, é importante entender como esse processo de evolução paralela repercutiu na organização da circuitaria cortical, e assim a distribuição de elementos neuroativos como as CBPs podem oferecer informações relevantes.

Importância das CBPs na fisiologia cortical

Flutuações nos níveis intracelulares de cálcio são fundamentais para o desencadeamento de diversas reações celulares (KATZ, 1969). Ao entrar na célula boa parte do cálcio é capturado por organelas como o retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e vesículas sinápticas. Além desse sistema homeostático inespecífico, vários neurônios possuem sistemas adicionais de alta afinidade. Alguns deles estão baseados nas propriedades de determinadas

proteínas modificarem sua conformação estrutural de forma a se ligarem aos íons de cálcio presentes no citoplasma. Esta família de proteínas é coletivamente denominada ligantes de cálcio e compreende mais de 250 variedades proteicas observadas em diferentes tecidos e espécies (CHRISTAKOS et al., 1989; CELIO et al., 1996; EYLES et al., 2001).

No sistema nervoso central, da grande família de CBPs as mais estudadas são a Pv, Cr e Cb (D28K), e em menor medida a calmodulina, a calcineurina e a subfamília S100. Proteínas pertencentes ao grupo S100, junto com a Cb, têm sido também descritos em células da glia (BAIMBRIDGE et al., 1992).

Se o fluxo de cálcio é importante para todas as células, ele é crítico para os neurônios. Neles o cálcio participa tanto nos processos de polarização e despolarização, fundamentais para o desencadeamento e propagação do estímulo nervoso, como também em processos enzimáticos e de sinalização que regulam o funcionamento celular. Em neurônios, CBPs participam dos dois tipos de atividades. Por exemplo, Pv, Cr e Cb estão associadas a funções relacionadas com o tamponamento homeostático do cálcio intracelular, enquanto que a calmodulina (e outras) à ativação de diversas reações enzimáticas intracelulares (HOF et al., 1999).

Pela sua ação reguladora do nível de cálcio intracelular, CBPs têm uma função neuroprotetora evidente. Estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que neurônios que expressam CBPs têm uma diminuição nas taxas de apoptose e uma resistência maior aos processos de excitotoxicidade (DOWD et al., 1992; DOWD, 1995; MATTSON et al., 1991; SCHARFMAN; SCHWARTZKROIN, 1989; LUKAS; JONES, 1994; HO et al., 1996; BERGER et al., 1998; MOCKEL; FISCHER, 1994; TERRO et al., 1998) quando comparados com neurônios que não sintetizam essas proteínas.

Outra característica importante e que tem impulsionado os estudos focados na distribuição cortical dessas proteínas nas diversas espécies, é o fato delas corresponderem a mais de 90% de todos os neurônios GABAérgicos do córtex cerebral, motivo pelo qual sua análise serve para avaliar eventuais alterações da transmissão GABAérgica nesta região (EYLES et al., 2002). Como estes circuitos parecem estar alterados em algumas condições psiquiátricas de grande interesse clínico, em particular na esquizofrenia, a análise da distribuição de CBPs em material humano e modelos experimentais têm contribuído para, de forma indireta, avaliar o comprometimento dos neurônios corticais GABAérgicos nessas condições patológicas.

CBPs: função, tipos neuronais e distribuição no córtex cerebral dos mamíferos.

Conforme descrito, a parvalbumina (Pv), calbindina (Cb) e calretinina (Cr) são observadas em subpopulações de neurônios pertencentes a vários sistemas funcionais em um grande número de espécies de vertebrados, incluindo aves, répteis, anfíbios e mamíferos (DÁVILA et al., 1997; GLEZER et al., 1993; BAIMBRIDGE et al., 1992; CELIO, 1990; MARTÍNEZ-GUIJARRO; FREUND, 1992).

Como vimos, no córtex cerebral essas proteínas são muito úteis para estudar a complexidade do sistema GABAérgico, pois colocalizam com GABA em populações distintas de interneurônios. Pv é observada em neurônios tipo candelabro e neurônios em cesto; Cb fundamentalmente em neurônios double-bouquet, e Cr em neurônios bipolares e *bitufted* (LUND; LEWIS, 1993; CONDE et al., 1994; LEWIS, 1998). Cada tipo neuronal apresenta uma arborização dendrítica que permite contatos sinápticos específicos com os neurônios de projeção cortical.

A distribuição de neurônios Pv, Cb e Cr positivos têm sido descrita nos cérebros de roedores e primatas (HENDRY et al., 1989; BLÜMCKE et al., 1990; CELIO, 1990; DEMEULEMEESTER et al., 1991; HOF; NIMCHINSKY, 1992; CONDÉ et al., 1994; KONDO et al., 1994; GABBOTT; BACON, 1996a,b; GABBOTT et al., 1997a; DEFELIPE, 1997; CELIO, 1990; DEMEULEMEESTER et al., 1991; HOF; NIMCHINSKY, 1992; CONDÉ et al., 1994; GABBOTT; BACON, 1996; GABBOTT et al., 1997; DEFELIPE, 1997), e alguns estudos relataram padrões de distribuição em áreas específicas do córtex cerebral humano (BLÜMCKE et al., 1990; FERRER et al., 1992; HOF et al., 1995; DEL RÍO; DEFELIPE, 1996; NIMCHINSKY et al., 1997).

Em primatas do novo mundo foi estudada sua distribuição no córtex visual primário e no núcleo geniculado lateral do *Callithrix* (SPATZ et al., 1994; GOODCHILD; MARTIN, 1998), na área 18 do *Squirrel monkey* (BLÜMCKE; CELIO, 1992) e no núcleo geniculado lateral, colículo superior, córtex visual primário do *Sapajus apella* (BOTELHO et al., 2006; SOARES et al., 2001), mas não existem dados sobre a distribuição destas proteínas nas áreas filogeneticamente mais recentes do CPF.

O padrão de distribuição das proteínas ligantes de cálcio no córtex cerebral de primatas foi extensamente descrito (HOF et al., 1999). Porém, a maioria dos estudos se concentra em macacos do velho mundo e também em humanos, realizados principalmente no córtex visual (MORRISON et al., 1998).

Cb e Cr apresentam algumas semelhanças estruturais e ambas podem estar presentes em alguns tipos de interneurônios piramidais e não piramidais, embora casos de colocalização sejam raros (ROGERS, 1987; DEL RÍO; DEFELIPE, 1996; DEFELIPE, 1997). Cb é encontrada em células não piramidais e também piramidais, sendo neste caso fracamente marcadas (HOF et al., 1999; DEFELIPE et al., 1989a; DEFELIPE; JONES, 1992; MORRISON et al., 1998). Localizados nas camadas II e III, os neurônios não piramidais imunorreativos possuem um corpo multipolar relativamente fino com 4 ou 6 dendritos orientado radialmente (DEFELIPE et al., 1989a). Um segundo grupo, localizado de forma mais acentuada nas camadas V e VI apresenta um corpo celular alongado ou multipolar, contendo 3 ou 6 longos dendritos, com imunorreatividade dos axônios mais acentuada. Este, por sua vez, surge de um dendrito proximal ou mesmo do corpo celular, possuindo uma orientação ascendente. De acordo com alguns autores, esse grupo celular se assemelha às células de Martinotti (FAIRÉN et al., 1984).

A imunorreatividade à Cb também está presente em células encontradas nas camadas II e VI, onde apresentam um pericário pequeno com vários dendritos que se estendem, em média, de 30 a 50µm (JONES, 1984). Na camada I, logo abaixo da pia-máter, células semelhantes às de Cajal-Retzius com corpo arredondado, oval ou triangular podem ser evidenciadas. Esse grupo celular apresenta dendritos grossos e tortuosos, com abundantes espinhas dendríticas. Seu axônio é fino e apresenta varicosidades (HOF; MORRISON, 1991; HAYES; LEWIS, 1992; KONDO et al., 1994).

Neurônios *bitufted* positivos para Cb com dendritos e axônio orientados verticalmente, podem ser observados em todas as camadas corticais, mas de forma mais marcante nas camadas II e III, (LEWIS et al., 1991; HOF; NIMCHINSKY, 1992; MORRISON et al., 1998; para revisão ver HOF, et al., 1999).

Os maiores números de neurônios imunorreativos à Cr são do tipo *bitufted*, apresentando dendritos e axônio orientados verticalmente (HOF; NIMCHINSKY, 1992; HOF et al., 1995b; MORRISON et al., 1998). Essas células são encontradas em todas as camadas corticais, porém é observado um aumento de densidade nas camadas II e III. Esse tipo de neurônio pertence à classe de interneurônios bipolares e *double-bouquet* descritos em estudos de Golgi (SOMOGYI; COWEY, 1984). Imunorreatividade à Cr tem sido também descrita em células Cajal-Retzius da camada I. De forma geral, o número de neurônios reativos para Cr no isocórtex de roedores e primatas é o dobro que o observado em relação a neurônios Pv e Cb positivos (CAULI et al., 1997).

Proposição

Proposição

O presente estudo visou quantificar a densidade celular de neurônios Cr e Cb positivos tendo como base a recente divisão arquitetônica proposta para o CPf do *Sapajus apella*. Ao final desta análise esperamos ter respondido duas questões fundamentais:

a) Estas proteínas se distribuem homogênea ou heterogeneamente nas diversas áreas do CPf do *Sapajus apella*?

b) Caso a distribuição seja heterogênea (como já verificamos no caso da Pv) até que ponto esta heterogeneidade obedece os limites entre áreas anteriormente estabelecidos para esta espécie? Quais as possíveis implicações funcionais desta distribuição?

Adicionalmente, analisamos a morfologia e distribuição em camadas dessas populações neuronais.

Materiais e Métodos

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados cortes de dois macacos-prego (*Sapajus apella*), machos, adultos jovens, pertencentes ao Núcleo de Procriação de Macacos-Prego, mantido pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP. Foram tomadas todas as medidas necessárias para utilizar o menor número possível de animais e evitar seu sofrimento.

Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão Local de Ética para a Experimentação Animal (protocolo: 2009-000847).

Anestesia

Os macacos foram retirados das gaiolas individuais por meio de uma câmara de sedação para serem sedados pela inalação de éter dietílico-sulfúrico, e anestesiados posteriormente por uma injeção intraperitoneal de tiopental sódico, na concentração de 30mg por quilograma de peso corporal. Os procedimentos anestésicos foram complementados com uma injeção intramuscular de diazepínico, na dosagem de 0,3mg por quilograma de peso corporal.

Perfusão

Após conseguirmos um plano de anestesia profunda os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico visando criar um acesso à região do mediastino, e assim chegar ao coração. Mediante perfusão intracardíaca com uso de uma bomba perfusora peristáltica, os macacos foram perfundidos de acordo com a sequência de soluções abaixo:

a) Soro salino, a temperatura ambiente e em uma quantidade suficiente para permitir um retorno vascular quase transparente (aproximadamente 1200ml). Solução usada principalmente para eliminar o sangue do sistema circulatório, para evitar assim a formação de coágulos que prejudicariam a fixação das estruturas teciduais.

b) Solução fixadora composta de paraformaldeído a 4% em tampão acetato 0,1M; pH 6,5; 4°C; 1500ml. Este fixador de pH mais baixo (6,5), se difunde melhor pelos vasos do sistema circulatório, fixando locais onde o sangue chega por vasos de pequeno calibre.

c) Solução fixadora composta de paraformaldeído 4% em tampão borato 0,1M; pH 9,5; 4°C; 1500ml. Esse fixador de pH maior (9,5), fixa as estruturas teciduais de forma mais intensa.

Remoção dos encéfalos e crioproteção

Finalizada a perfusão, os animais foram decapitados e a cabeça fixada a um aparelho estereotáxico. Realizamos então uma ampla craniotomia e em seguida removemos a dura-máter para assim expor o encéfalo. Posteriormente, com uma lâmina de bisturi acoplada à torre do aparelho estereotáxico dividimos o cérebro em blocos através de planos frontais em níveis estereotáxicos pré-determinados. O bloco mais anterior, contendo o CPf (figura 2) foi envolto em gaze e colocado em solução crioprotetora composta de glicerol 10% e DMSO 2% dissolvidos em tampão borato 0,1M; pH 9,5; a 4°C, por três dias, e mais quatro dias em solução de glicerol 20% e DMSO 2% dissolvidos no mesmo tampão, a 4°C.

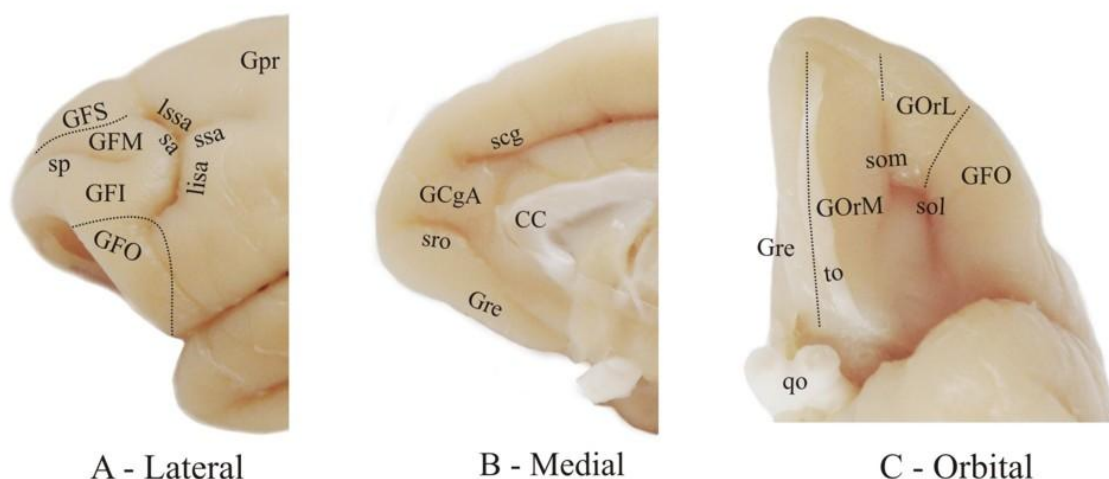


Figura 2: Superfície lateral, medial e orbital do córtex pré-frontal do *Sapajus apella*, mostrando a divisão anatômica adotada em nosso estudo. Linhas interrompidas define, aproximadamente, bordas dos giros; linhas contínuas indica os sulcos. Abreviaturas: CC- corpo caloso; GCgA- giro cingulado anterior; GFI- giro frontal inferior; GFM- giro frontal médio; GFO- giro fronto-orbital; GFS- giro frontal superior; GOrL- giro orbital lateral; GOrM- giro orbital medial; GPr- giro pré-central; GRE- giro reto; lisa- lábio inferior do sulco arcuato; lssa- lábio superior do sulco arcuato; qo- quiasma óptico; as- sulco arcuato; scg- sulco cingulado; sol- sulco orbital lateral; som- sulco orbital medial; sp- sulco principal; sro- sulco rostral; ssa- spur do sulco arcuato; to- trato olfatório.

Microtomia e armazenamento

Após a crioproteção, os blocos foram congelados a -86°C e cortados em micrótomo de congelação, com espessura de corte de $40\mu\text{m}$. Os cortes – seriados - foram recolhidos em 6 séries em *costars* contendo tampão fosfato 0,1 M.

Cada série foi utilizada da seguinte forma:

série 1: técnica de Nissl;

série 2: técnica imuno-histoquímica para calbindina;

série 3: técnica imuno-histoquímica para calretinina.

As outras sete séries serão utilizadas para testes e/ou mantidas como reserva.

Técnica de Nissl

Os cortes da série correspondente a esta técnica foram montados em lâminas gelatinizadas. Com o objetivo de intensificar a coloração, antes de iniciar a técnica, as lâminas foram colocadas em água destilada com 1- 2% de formaldeído.

Protocolo

- 1) H₂O destilada 1 minuto
- 2) Álcool 50% 3 minutos
- 3) Álcool 70% 3 minutos
- 4) Álcool 95% 3 minutos
- 5) Álcool 95% 3 minutos
- 6) Álcool 100% 3 minutos
- 7) Álcool 100% 3 minutos
- 8) Xilol 5 minutos
- 9) Xilol 5 minutos
- 10) Álcool 100% 1 minuto
- 11) Álcool 100% 1 minuto
- 12) Álcool 95% 1 minuto
- 13) Álcool 95% 1 minuto
- 14) Álcool 70% 1 minuto

- 15) Álcool 50% 1 minuto
 - 16) H₂O destilada 1 minuto
 - 17) Tionina acética 0,1% 2 a 5 minutos
 - 18) H₂O destilada 1 minuto
 - 19) H₂O destilada 1 minuto
 - 20) Álcool 50% 1 minuto
 - 21) Álcool 70% 1 minuto
 - 22) Álcool 95% 1 minuto
 - 23) Álcool 95% 1 minuto
 - 24) Álcool 100% 1 minuto
 - 25) Álcool 100% 1 minuto
 - 26) Xilol 3 minutos
 - 27) Xilol 3 minutos
- As lâminas serão posteriormente cobertas com lamínula.

Técnica imuno-histoquímica para detecção de Cb e Cr.

A reação foi realizada sobre cortes soltos, de acordo com a seguinte sequência (protocolo):

- 1) Lavar 3x15 minutos com TBS (0,1M pH 7,6).
- 2) Inibição da peroxidase endógena: 0,5ml de H₂O₂ 0,3% em 50 ml de TBS; 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação leve.
- 3) Lavar 3x15 minutos com TBS.
- 4) Bloqueio de marcações inespecíficas com soro normal de burro 5% em TBS-Tx 0,05M pH 7,6 (Tx = Triton X 0,3%), 120 minutos a temperatura ambiente sob agitação leve.
- 5) Lavar 3x15 minutos com TBS.
- 6) Incubação do anticorpo primário (Monoclonal anti-Calretinin ou Calbidin 235, SWANT -ou SIGMA-, produzido em camundongo; 1:5000, por 48 horas à temperatura ambiente sob agitação leve - TBS-Tx + soro normal de burro 2% + anti- Calretinina ou Calbindina produzido em camundongo).
- 7) Lavar 3x15 minutos com TBS-Tx.

8) Incubação do anticorpo secundário (1:200) por 120 minutos à temperatura ambiente sob agitação leve (TBS-Tx + soro normal de burro 2% + anti-camundongo biotinilado produzido em burro).

9) Lavar 3x15 minutos com TBS-Tx.

10) Incubação no complexo avidina-biotina (Kit ABC) - 90 minutos à temperatura ambiente sob agitação leve (Solução A + Solução B + TBS-Tx).

11) Lavar 3x15 minutos com TBS-Tx.

12) Lavar 3x15 minutos com Tris HCl 0,05M pH 7,6. 14

13) Revelar com DAB (DAB + Tris HCl + H₂O₂ a 30%), ou VIP (TBS + reagente 01 + reagente 02 + reagente 03 + H₂O₂).

14) Lavar 3x15 minutos com Tris HCl. Os cortes serão posteriormente montados em lâminas gelatinizadas, desidratados em série crescente de alcoóis, desengordurados com xilol e cobertos com lamínula utilizando DPX como meio de montagem.

Aquisição e organização das imagens.

Imagens representativas das técnicas foram adquiridas mediante a utilização de uma câmera AxioCam MRc5 (Carl Zeiss) acoplada a estereomicroscópio Zeiss Stemi 2000-C. O software usado foi o AxioVision 4.5. Detalhes celulares em maior aumento foram obtidos utilizando um microscópio Aristoplan (Leica), com a mesma câmera e software. As imagens resultantes foram trabalhadas em software apropriado (Corel DRAW 13) e utilizadas para ilustrar o trabalho.

Critérios de amostragem

Para elucidar se existem diferenças na distribuição desses neurônios quando comparamos as diferentes áreas do CPf, selecionaremos seis diferentes áreas arquitetônicas representativas do CPf: as áreas granulares 12l e 46v, na região dorsolateral do CPf; as áreas disgranulares 9d, também na região dorsolateral do CPf, e 13l, na região central do córtex pré-frontal orbital, e as áreas agranulares 32c, na superfície medial do CPf, e Oap, próxima ao núcleo olfatório na região posterior do córtex pré-frontal orbital (Figura 3). Estas áreas foram definidas em nosso estudo anterior (CRUZ-RIZZOLO et al., 2011).

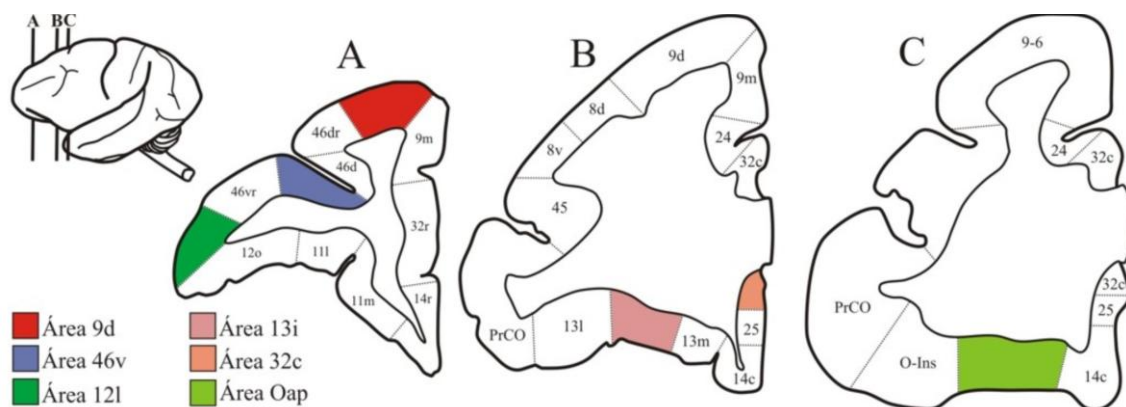


Figura 3: Localização das áreas arquitetônicas do CPF do macaco-prego. Os desenhos esquemáticos representam corte frontais do CPF do macaco-prego em três diferentes níveis ântero-posteriores (A, B e C). As linhas pontilhadas delimitam as áreas arquitetônicas definidas em nosso estudo anterior (CRUZ-RIZZOLO et al., 2011); as áreas coloridas em destaques correspondem às áreas selecionadas para o presente estudo.

Os critérios de amostragem, contagem e análise estatística foram os mesmo que os adotados em trabalho anterior, onde analisamos a distribuição de neurônios NADPh positivos no CPF do *Sapajus apella* (CRUZ-RIZZOLO et al., 2006).

Resumidamente (Figura 4), de cada uma das áreas arquitetônicas selecionadas, foram feitas cinco contagens diferentes, escolhendo cinco cortes que no sentido ântero-posterior estejam localizados aproximadamente no centro da área arquitetônica selecionada. Com isto evitamos a seleção de cortes localizados em regiões limítrofes entre duas áreas arquitetônicas, o que poderia gerar certa confusão devido à suave transição entre áreas no CPF. A distância mínima entre cortes foi de 300µm, o que nos assegura que cada neurônio (na realidade, perfis neuronais) foi contado uma única vez. Da mesma forma, para nos assegurar que estaremos aproximadamente no centro da área arquitetônica selecionada, agora no eixo dorsoventral e lateromedial, selecionamos no corte uma área retangular, central em relação à área a ser analisada, com um dos lados menores coincidentes com a superfície cortical e o outro na profundidade da substância branca, de aproximadamente 2mm. Esses “retângulos” serão capturados digitalmente mediante uma câmera acoplada ao microscópio, utilizando objetiva de 10x. Em nossos testes já verificamos que todo esse retângulo não cabe na área de captura da câmera, assim será necessário reconstruí-lo encaixando cuidadosamente cada uma das imagens obtidas, utilizando software para tratamento de imagens (Corel Draw®).

Uma vez reconstruído, e comparando sempre a imagem no microcomputador com a imagem real no microscópio, cada neurônio Cb e Cr positivo foi registrado com um símbolo

colorido (quadrado azul, por exemplo). Feito isso, registramos na imagem computadorizada o limite entre o córtex e a substância branca, assim como o limite entre as camadas supragranulares (I, II e III), a camada IV, e as camadas V e VI (Figura 4). Para isso utilizamos como orientação cortes contíguos corados pela técnica de Nissl. A imagem final resultante foi analisada posteriormente utilizando o software Image-pro Plus®. Este software nos permitiu estabelecer o número e densidade neuronal (número de neurônios por milímetro quadrado) em cada corte e em cada compartimento (córtex total; córtex supragranular, incluindo as camadas I, II e III; camada IV; córtex infragranular, incluindo as camadas V e VI; e substância branca). Após a confecção das tabelas, os resultados foram analisados utilizando-se o programa para estatística GraphPad Prism®.

Análise estatística

Dados relativos à densidade neuronal em cada área foram comparados. Para sabermos se existem diferenças significativas nas densidades neuronais em diferentes áreas e nos diferentes compartimentos, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis. Este é um tipo de teste não paramétrico de análise de variância onde não assumimos a premissa que a distribuição das nossas contagens siga uma distribuição normal.

Utilizando este tipo de teste, verificamos a hipótese nula que indica que a distribuição de neurônios Cb e Cr positivos é homogênea entre todas as áreas analisadas do CPf, e a hipótese alternativa, segundo a qual pelo menos uma das áreas teria densidade neuronal significativamente diferente das demais. Caso a hipótese alternativa esteja correta, aplicaremos o pós-teste de Dunn com comparações múltiplas, o qual nos mostrará quais destas áreas diferem entre si.

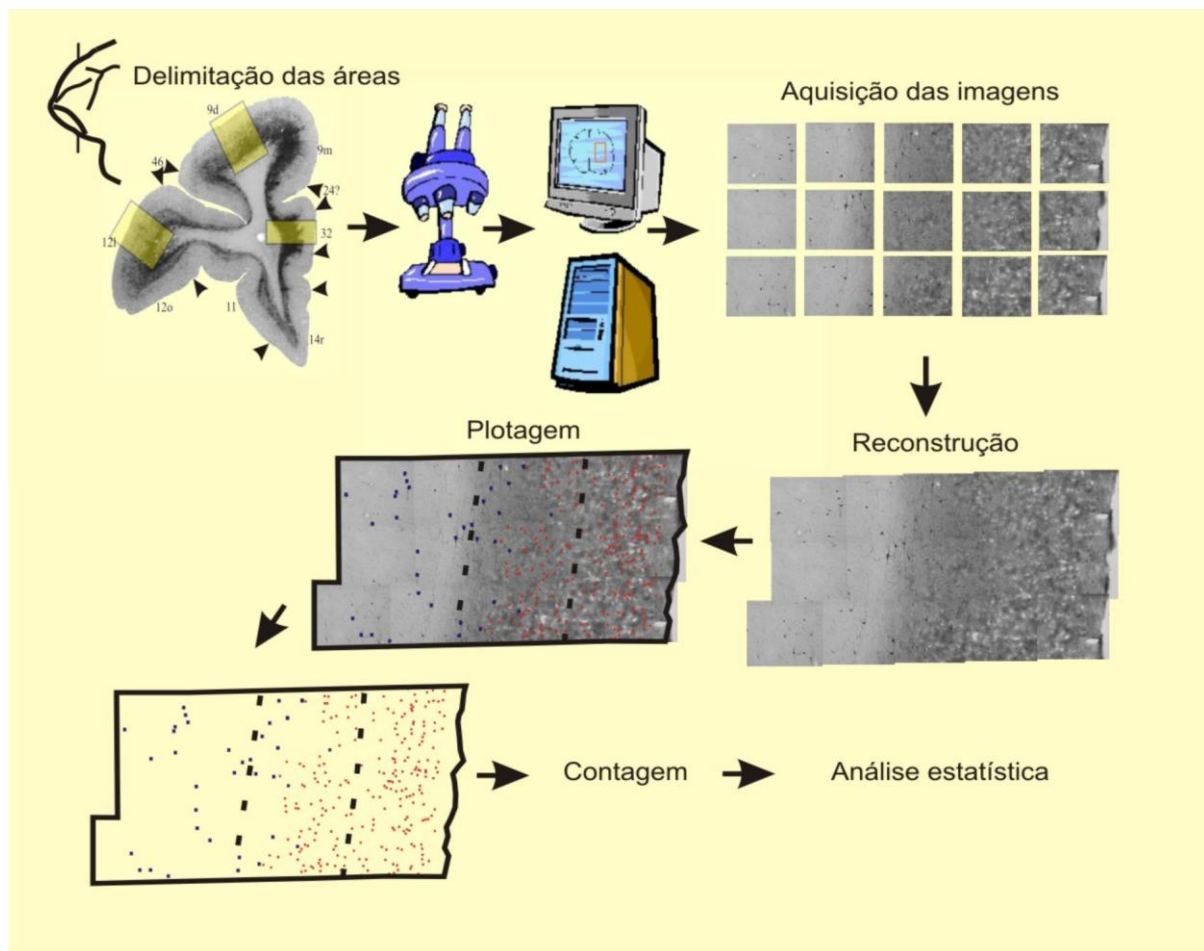


Figura 4: Representação esquemática da metodologia de seleção e aquisição de imagens, reconstrução, plotagem, contagem e análise estatística. Detalhes no texto.

RESULTADOS

Resultados

Análise morfológica.

Tipos celulares.

Calretinina: nossos resultados no córtex cerebral do *Sapajus apella* coincidiram de forma geral com os dados da literatura obtidos em outras espécies. Assim foi possível observar neurônios não piramidais Cr⁺ em todas as camadas corticais, mas com um nítido predomínio na camada II, diminuindo sensivelmente em direção à substância branca (figura 5-B). As características morfológicas dos neurônios Cr⁺ permitiram defini-los fundamentalmente como células bipolares (*bitufted*; figuras 5-D, 6-A e D) e multipolares (figuras 5-C e 6-C e F).

Eles apresentaram corpos celulares pequenos e de forma oval (embora possam ser encontrados de tipo arredondado, fusiforme ou multipolar) com dois prolongamentos originados a partir dos polos do corpo celular. Esses tipos celulares foram encontrados em todas as camadas do córtex, porém com maior concentração nas camadas II-III (figura 5-D e 6-A).

Poucos neurônios Cr⁺ foram também encontrados na camada I, próximos à camada II. Pelas suas características morfológicas alguns autores descrevem estas células como Cajal-Retzius (figura 6-B).

Nas camadas V e VI, a maioria dos neurônios Cr⁺ exibiram prolongamentos orientados verticalmente (figura 6-D). Ocasionalmente os processos celulares dos neurônios localizados nas camadas III e V apresentaram-se numa disposição horizontal ou oblíqua, atravessando mais de uma camada cortical (Figura 6-C e E).

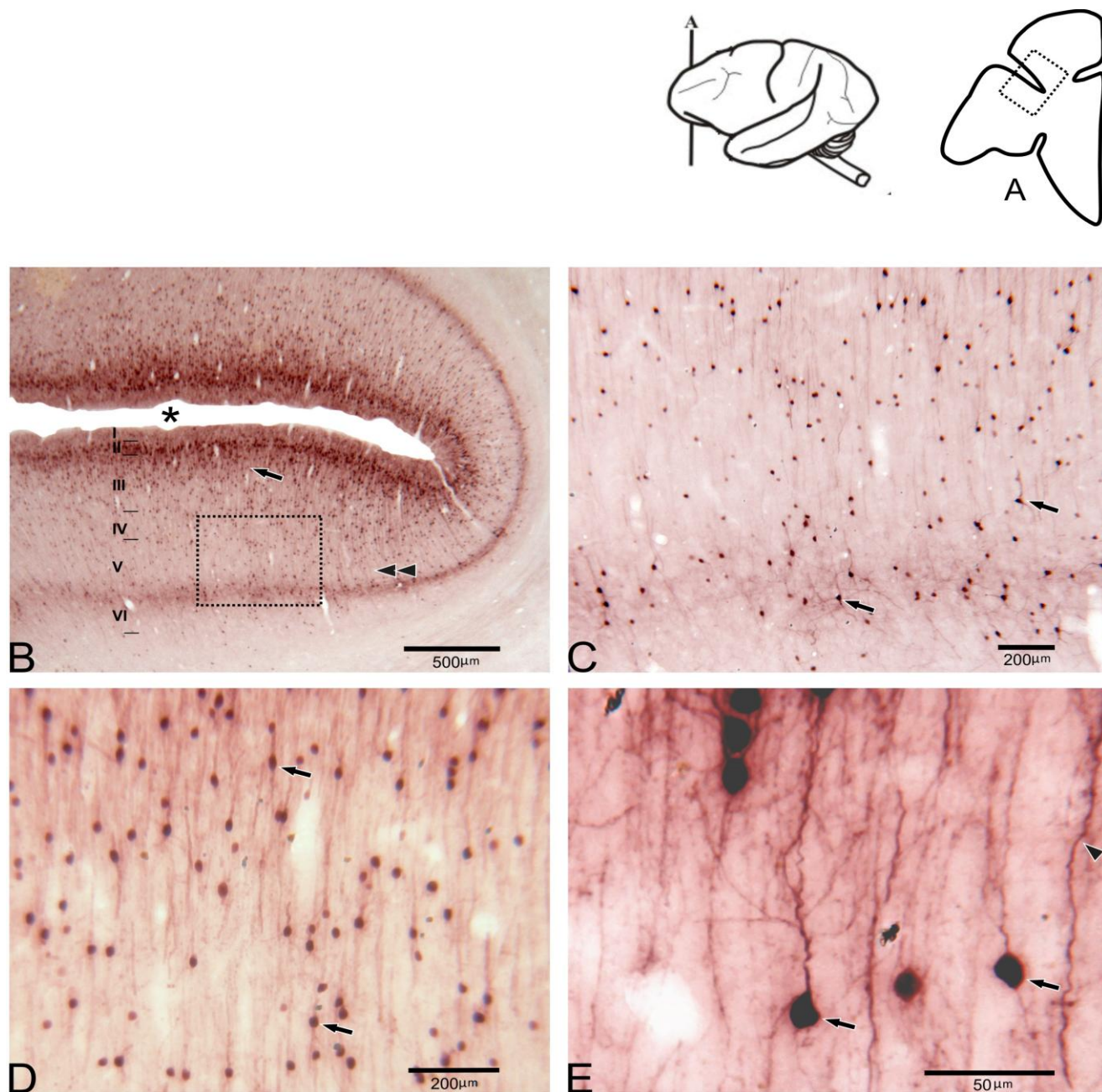


Figura 5. Fotomicrografias em campo claro de preparações evidenciando neuropilo e neurônios Cr+. Em A, à esquerda, uma vista lateral do encéfalo do *Sapajus apella*, indicando o plano do corte desenhado à direita, onde é destacado (retângulo) o sulco principal. Em B visualizamos em pequeno aumento a região do sulco principal (asterisco). As camadas corticais estão indicadas no lábio inferior do sulco (área 46v). Observar a heterogeneidade na marcação de neurônios e neuropilo (seta – mais corado; cabeças de seta – menos corado) nas diversas camadas. Em C (região destacada pelo retângulo na figura B), células multipolares com processos orientados em diversas direções (setas). Em D, as setas apontam neurônios bipolares com fibras cursando verticalmente. Em E, as setas apontam neurônios Cr+ da camada V, cujos corpos celulares são relativamente maiores em relação a outras células Cr+ nas camadas supragranulares. Na cabeça de seta prolongamento celular orientado perpendicularmente.

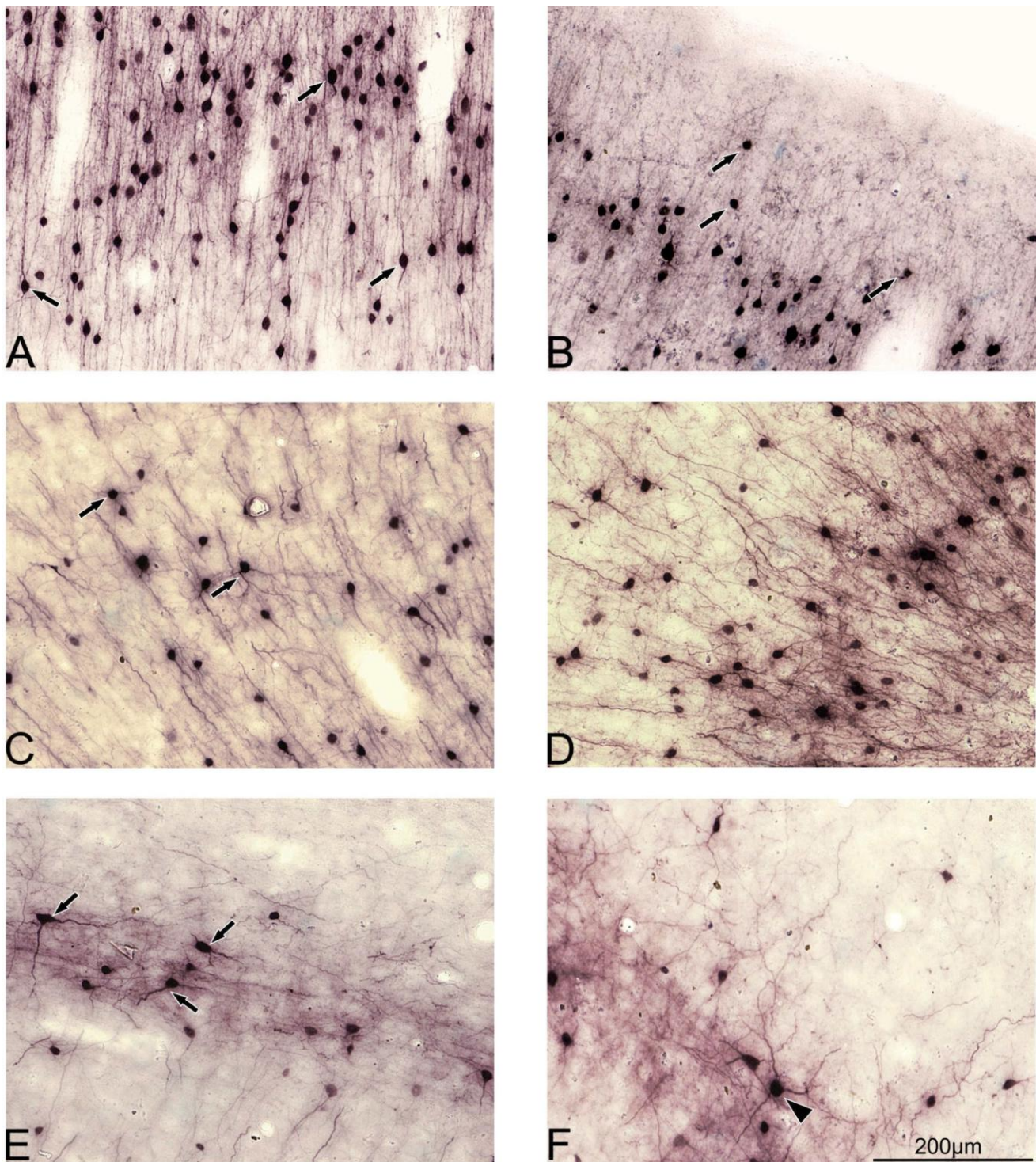


Figura 6. Fotomicrografias em campo claro de preparações evidenciando neurônios Cr+. Em A, aspecto da camada II e III do encéfalo do *Sapajus apella* evidenciando neurônios bipolares Cr+ com prolongamentos emergindo dos polos celulares. Em B, as setas apontam neurônios Cr+ localizados na camada I. Em C são indicadas neurônios Cr+ da camada III que apresentaram prolongamentos celulares com orientação radial. Em D, E e F, além de neurônios com diversas características morfológicas nas camadas infragranulares, pode ser observada a heterogênea marcação do neuropilo (setas em E, neurônios Cr+ com prolongamentos cursando horizontalmente; e em F a ponta de seta indica neurônio com prolongamentos distribuídos radialmente)

Calbindina: no CPf foi possível diferenciar neurônios Cb+ tanto de aspecto não piramidal (a maioria) como piramidais (estes geralmente corados de forma menos intensa), distribuídos heterogeneamente nas camadas corticais, com forte predomínio nas camadas II e III. (figura 7-D e 8-B).

Um dos tipos neuronais não piramidais, localizado nessas camadas, apresentou características morfológicas que permitiram caracterizá-lo como células bipolares (*bitufted*), com prolongamentos orientados verticalmente (Figura 7-D e 8-A). Um segundo tipo, também nas camadas II e III, apresentou morfologia multipolar (figura 8-D). Os dois tipos celulares eram de pequeno a médio tamanho.

Nas camadas infragranulares observamos também células Cb+ com corpos celulares multipolares ou ocasionalmente alongados, relativamente maiores que os descritos anteriormente, com prolongamentos orientados de forma radial ao redor do soma (figuras 7-E, 8- C e E).

Já os neurônios piramidais, com diversos graus de imunorreatividade foram mais frequentes na camada III de todas as áreas corticais analisadas neste estudo.

Finalmente, observamos poucos alguns neurônios Cb+ do tipo Cajal-Retzius na camada I.

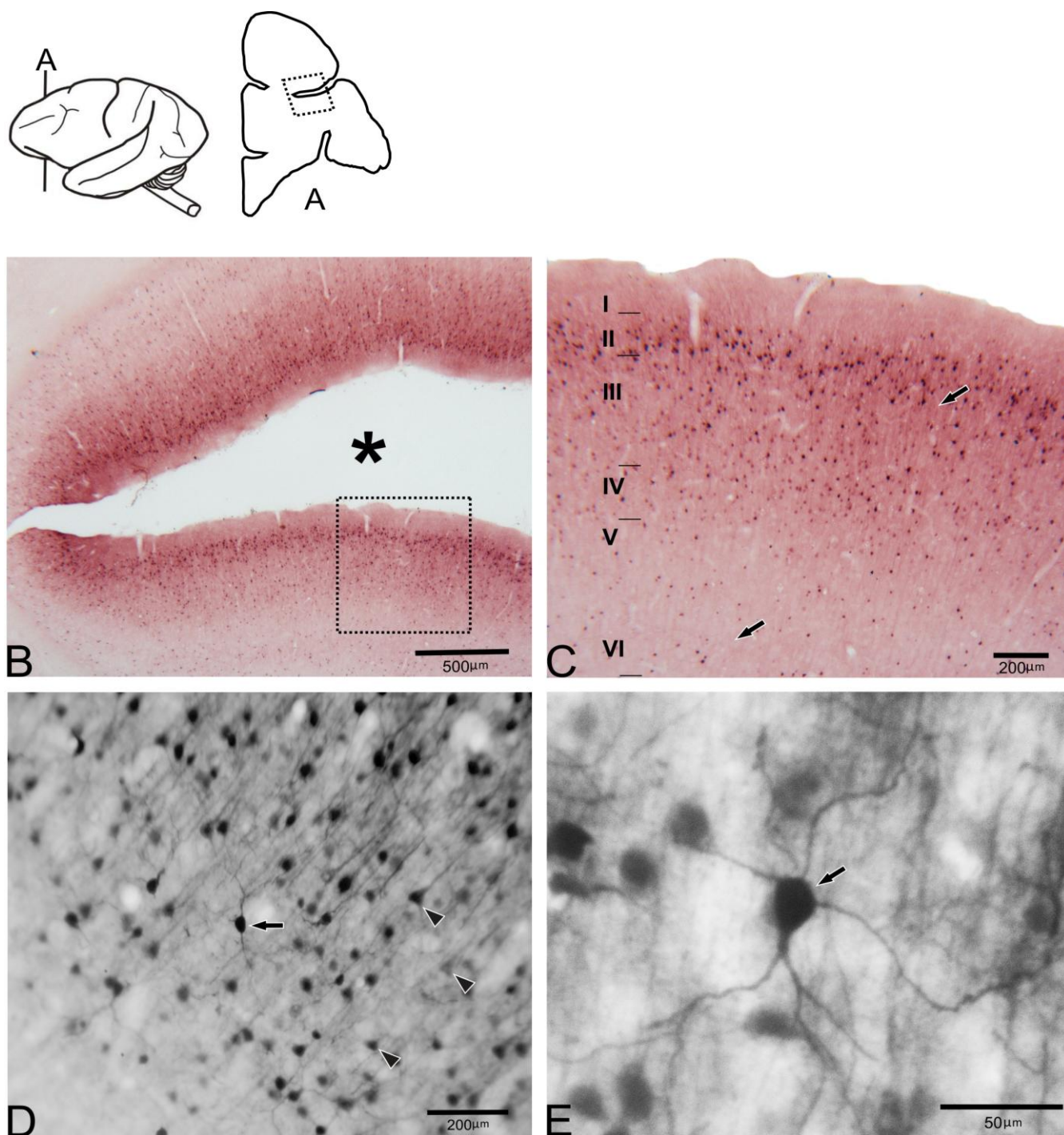


Figura 7. Fotomicrografias em campo claro de preparações evidenciando neuropilo e neurônios Cb+. Em A, à esquerda, uma vista lateral do encéfalo do *Sapajus apella* indicando o plano do corte desenhado à direita, onde é destacado (retângulo) o sulco principal. O asterisco em B sinaliza esse sulco, com os lábios superior e inferior apresentando forte imunomarcagem. Em C são indicadas as divisões das camadas corticais e a distribuição de células reativas à Cb. As setas indicam diversos níveis de intensidade de marcação do neuropilo. Em D, neurônio bipolar (seta) e piramidais (cabeças de seta). Em E, neurônio multipolar com seus processos emergindo radialmente do corpo celular.

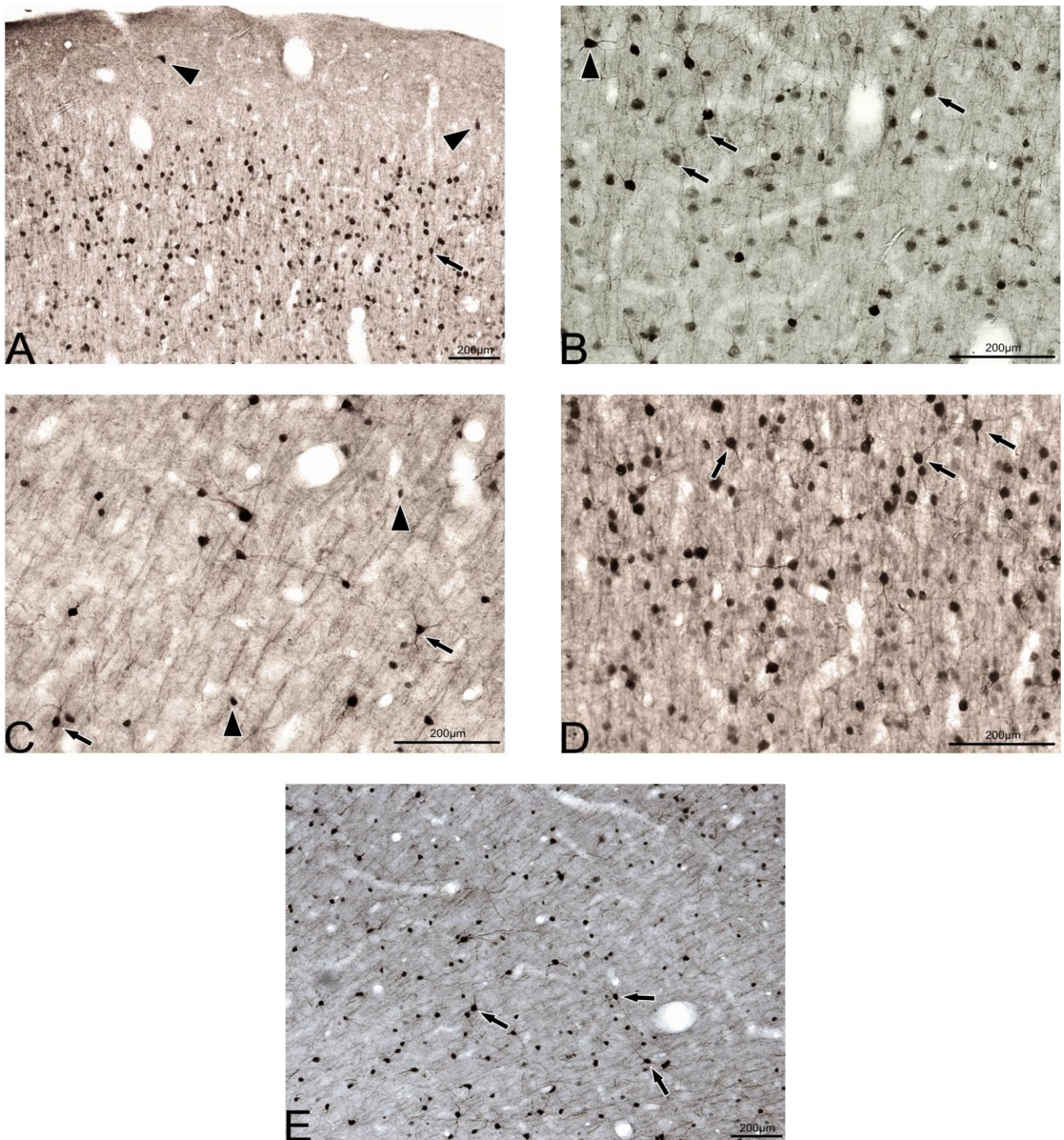


Figura 8. Fotomicrografias em campo claro de preparações evidenciando neurônios Cb+. Em A, as cabeças de setas indicam neurônios Cb+ na camada I. Em B as setas apontam neurônios piramidais imunorreativos. Na cabeça de seta observamos neurônio multipolar localizado na camada III. Em C, setas e cabeças de seta apontam neurônios Cb+ de diversos tamanhos e características morfológicas (detalhes no texto). Em D as setas apontam neurônios multipolares.

Neuropilo.

Calbindina: coincidindo com a distribuição por camadas da população neuronal, o neuropilo apresentou um aspecto de tinção bastante homogêneo ao longo de todo o córtex. A banda de tinção mais intensa ocupou as camadas I e II, alcançando a camada III. A camada IV estava fracamente corada e eventualmente bandas discretas ocuparam as camadas V-VI e o limite com a substância branca, o que em certas áreas (fundamentalmente em 46v e 32c) conferiu um aspecto trilaminar.

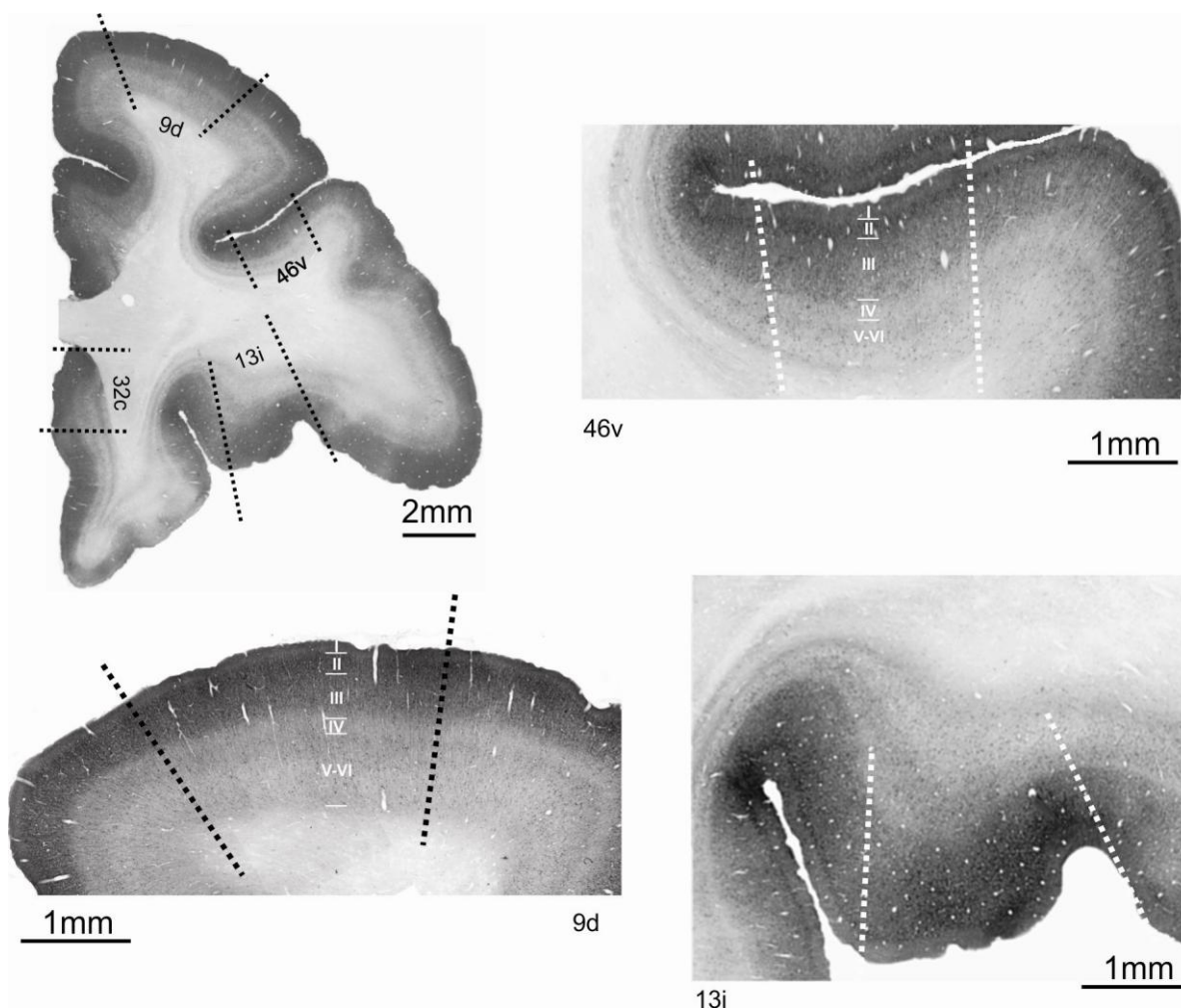


Figura. 9. Fotomicrografias em pequeno aumento mostrando aspectos da tinção de neuropilo mediante uso da técnica para evidenciação de calbindina. Acima, à esquerda, corte do CPf do *Sapajus apella*, indicando o limite aproximado de diversas áreas arquitetônicas baseado em estudo anterior (CRUZ-RIZZOLO et al., 2011). Em destaque imagens em maior aumento das áreas 46v, 9d e 13i. Em 46v e 9d estão indicados os limites entre as camadas corticais. Estes limites foram obtidos mediante a superposição de cortes corados pela técnica de Nissl. Pode ser observado um aspecto de tinção bastante homogêneo ao longo de todo o córtex. A banda de tinção mais intensa ocupa as camadas I e II, alcançando a camada III. A camada IV é fracamente corada e eventualmente bandas discretas podem ser observadas nas camadas V-VI e no limite com a substância branca, o que em alguns casos confere um aspecto trilaminar.

Calretinina: o padrão de tingção após imunorreacção para calretinina também se mostrou homogêneo ao longo do córtex, entretanto diferiu em relação ao observado após evidencição de calbindina. A banda de tingção mais intensa ocupou as camadas I e II, sem quase invadir a camada III. A camada IV estava fracamente corada e uma banda mais intensa foi visível na camada V, próximo à camada IV. Esta característica confere de forma geral um aspecto bilaminar. Na área 32c o padrão de tingção foi similar, porém mais intenso.

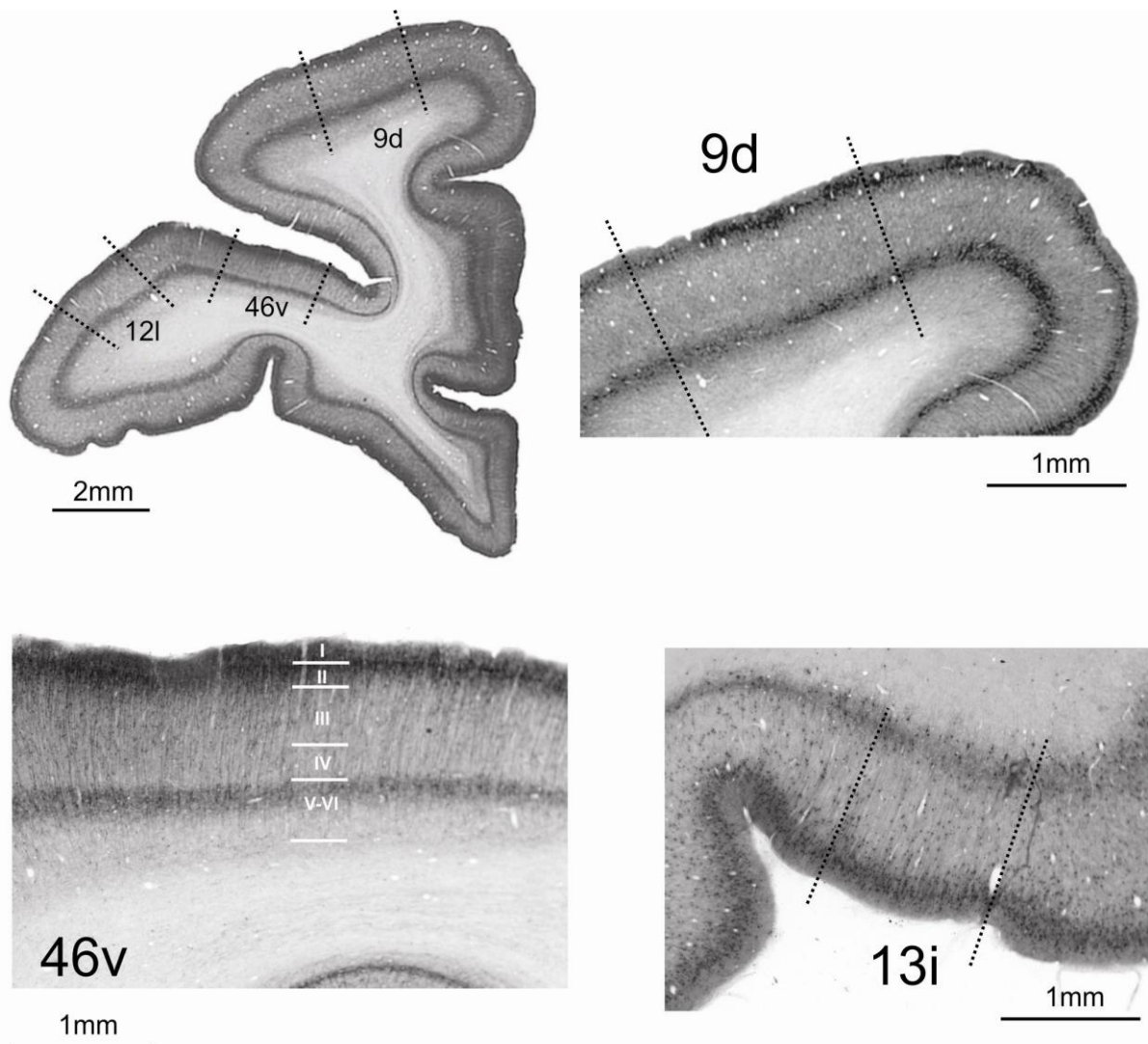


Figura 10. Fotomicrografias em pequeno aumento mostrando aspectos da tingção de neuropilo mediante uso da técnica para evidencição de calretinina. Acima à esquerda, corte do CPF do *Sapajus apella*, indicando o limite aproximado de diversas áreas arquitetônicas, baseado em estudo anterior (CRUZ-RIZZOLO et al., 2011). Em destaque as imagens em maior aumento das áreas 46v, 9d e 13i. Em 46v estão indicados os limites entre as camadas corticais. Estes limites foram obtidos mediante a superposição de cortes corados pela técnica de Nissl. Embora o padrão de tingção seja também homogêneo ao longo do córtex, ele difere em relação ao observado após evidencição de calbindina. A banda de tingção mais intensa ocupa as camadas I e II, mas praticamente não alcança a camada III. A camada IV é fracamente corada e uma banda mais intensa é visível na camada V. Esta característica confere um aspecto bilaminar.

Aspectos quantitativos.

Ao analisar os aspectos quantitativos, nosso objetivo foi verificar se seria possível pela análise da densidade neuronal (na realidade, a densidade de perfis neuronais), estabelecer critérios que permitissem diferenciar áreas arquitetônicas no CPf deste animal. Já tínhamos verificado que isto era possível utilizando outra proteína ligante de cálcio, a parvalbumina. Com esta finalidade, o parâmetro mais útil seria a contagem de todos os neurônios dos compartimentos supra e infragranular (córtex total, CT). Outra informação importante era estabelecer se estas populações celulares predominavam nos compartimentos supra ou infragranular. Nossa metodologia permitiu responder as duas indagações.

Distribuição de neurônios Cb+ nas áreas do CPf.

Pelos dados da nossa análise estatística, que utilizou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (índice de significância de 0,05%) e o post-test de Dunn, ao comparar as densidades médias no compartimento “Córtex Total” de cada área, obtivemos apenas diferenças significativas entre as áreas 46v e 9d nos animais M1 e M2, além de 9d e Oap no animal M2.

Animal 1, comparação das densidades neuronais por área. Compartimento "Córtex Total".

Calbindina

Table Analyzed			
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0030		
Exact or approximate P value	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	18		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant P < 0.05	Summary
46v vs 9d	18	Yes	*
46v vs 12l	2,0	No	ns
46v vs 13i	3,6	No	ns
46v vs 32c	4,0	No	ns
46v vs Oap	15	No	ns
9d vs 12l	-16	No	ns
9d vs 13i	-14	No	ns
9d vs 32c	-14	No	ns
9d vs Oap	-2,6	No	ns
12l vs 13i	1,6	No	ns
12l vs 32c	2,0	No	ns
12l vs Oap	13	No	ns
13i vs 32c	0,40	No	ns
13i vs Oap	12	No	ns
32c vs Oap	11	No	ns

Animal 2, comparação das densidades neuronais por área. Compartimento "Córtex Total".

Calbindina

Table Analyzed			
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0013		
Exact or approximate P value	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	20		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant P < 0.05	Summary
46v vs 9d	-17	Yes	*
46v vs 12l	-8,6	No	ns
46v vs 13i	-8,2	No	ns
46v vs 32c	-1,0	No	ns
46v vs Oap	5,2	No	ns
9d vs 12l	8,2	No	ns
9d vs 13i	8,6	No	ns
9d vs 32c	16	No	ns
9d vs Oap	22	Yes	**
12l vs 13i	0,40	No	ns
12l vs 32c	7,6	No	ns
12l vs Oap	14	No	ns
13i vs 32c	7,2	No	ns
13i vs Oap	13	No	ns
32c vs Oap	6,2	No	ns

Distribuição de neurônios Cr+ nas áreas do CPf.

Pelos dados da nossa análise estatística, que utilizou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (índice de significância de 0,05%) e o post-test de Dunn, ao comparar as densidades médias no compartimento “Córtex Total” de cada área, obtivemos apenas diferenças significativas entre as áreas 9d e Oap nos animais M1 e M2, além de 46v x 13i e 46v x 9d no animal M2.

Animal 1, comparação das densidades neuronais por área. Compartimento “Córtex Total”.

Calretinina

Table Analyzed				
Kruskal-Wallis test				
P value	0,0129			
Exact or approximate P value	Gaussian Approxiation			
P value summary	*			
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	6			
Kruskal-Wallis statistic	14			
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant P < 0.05	Summary	
9d vs 46v	-7,0	No	ns	
9d vs 12l	-12	No	ns	
9d vs 13i	-15	No	ns	
9d vs 32c	-16	No	ns	
9d vs Oap	-18	Yes	*	
46v vs 12l	-5,0	No	ns	
46v vs 13i	-8,0	No	ns	
46v vs 32c	-9,2	No	ns	
46v vs Oap	-11	No	ns	
12l vs 13i	-3,0	No	ns	
12l vs 32c	-4,2	No	ns	
12l vs Oap	-5,6	No	ns	
13i vs 32c	-1,2	No	ns	
13i vs Oap	-2,6	No	ns	
32c vs Oap	-1,4	No	ns	

Animal 2, comparação das densidades neuronais por área. Compartimento “Córtex Total”.

Calretinina

Table Analyzed			
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0006		
Exact or approximate P value	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	22		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant P < 0.05	Summary
46v vs 12l	11	No	ns
46v vs 13i	9,8	No	ns
46v vs 32c	18	Yes	*
46v vs Oap	5,6	No	ns
46v vs 9d	22	Yes	***
12l vs 13i	-0,80	No	ns
12l vs 32c	7,6	No	ns
12l vs Oap	-5,0	No	ns
12l vs 9d	12	No	ns
13i vs 32c	8,4	No	ns
13i vs Oap	-4,2	No	ns
13i vs 9d	13	No	ns
32c vs Oap	-13	No	ns
32c vs 9d	4,2	No	ns
Oap vs 9d	17	Yes	*

Densidade neuronal por compartimento

Para analisar a distribuição de neurônios Cb⁺ e Cr⁺ em cada compartimento cortical (supragranular e infragranular) em cada área, seguimos o procedimento adotado em outros estudos, dividindo a densidade média encontrada em cada compartimento (SG/IG). Assim, valores próximos a 1 indicam uma distribuição equilibrada entre os dois compartimentos, valores acima de 1 predomínio no compartimento supragranular e valores inferiores a 1 predomínio no compartimento infragranular. Como pode ser observado nas tabelas abaixo, os resultados foram bastante consistentes em relação à calretinina nos dois animais estudados, e tivemos maiores flutuações no caso da calbindina. Mesmo assim, em todos os casos a relação revela um predomínio destas populações neuronais no compartimento supragranular.

Não foi possível observar uma relação entre as características arquitetônicas da área (granulares, 46v - 12l; disgranulares 9d – 13i; agranulares 32c – Oap) e um maior ou menor predomínio desta distribuição.

**Relação da distribuição nos compartimentos supragranular (SG) e infragranular (IG): SG/IG
(foram utilizadas as médias das cinco contagens de cada área em cada compartimento)**

Calretinina

<u>Área</u>	<u>M1</u>	<u>M2</u>
46v	2,55	2,52
12l	2,61	2,62
9d	2,07	2,53
13i	2,38	1,94
32c	1,84	1,46
Oap	2,14	2,27

**Relação da distribuição nos compartimentos supragranular (SG) e infragranular (IG): SG/IG
(foram utilizadas as médias das cinco contagens de cada área em cada compartimento)**

Calbindina

<u>Área</u>	<u>M1</u>	<u>M2</u>
46v	2,08	2,6
12l	1,36	2,63
9d	2,1	2,73
13i	1,45	2,96
32c	1,54	1,25
Oap	1,78	2,41

Discussão

Discussão

Considerações metodológicas

No presente estudo, os dados quantitativos foram obtidos mediante a contagem de perfis neuronais em cortes semiseriados. Este método não permite uma contagem real do número de neurônios, nem a densidade destes neurônios por unidade de área (ou volume; para revisão ver COGGESHALL; LEKAN, 1996), a qual só poderia ser obtida mediante análise estereológica sem viés. Entretanto, apenas por uma questão de simplicidade, ao longo do texto fazemos referência à densidade de neurônios, embora estejamos nos referindo sempre a perfis neuronais.

Por outra parte, como o número de perfis neuronais (e, claro, de neurônios) que podem ser quantificados pode depender de fatores como sexo, alterações patológicas, condições experimentais, fixação, permeabilidade aos anticorpos, etc., nós evitamos fazer comparações entre animais, mesmo tendo utilizado animais sadios, do mesmo sexo e da mesma idade aproximada.

Nosso objetivo foi apenas comparar áreas num mesmo animal, e nesse contexto, nossa metodologia apesar de suas limitações, parece adequada. Não haveria motivo para supor que condições experimentais tenham alterado a densidade neuronal em determinada área em detrimento de outra no mesmo corte. Isto poderia ter acontecido como decorrência de problemas durante a fixação, quando áreas do cérebro podem ficar pouco expostas ao fixador. Para verificar se isso aconteceu, nossas preparações com a técnica de Nissl foram cuidadosamente examinadas, não tendo encontrado nenhum sinal deste tipo de artefato.

É importante também ressaltar que este é o resultado obtido em apenas dois animais. O ideal teria sido utilizar um número maior de primatas, porém isto foi impossível em virtude da crescente dificuldade em ter autorização para utilizar macacos em pesquisas.

Ao contabilizar e comparar o número de neurônios Cb+ e Cr+ positivos entre os animais observamos variações individuais importantes. Estas variações, já descritas em estudos anteriores, podem estar relacionadas tanto com características funcionais individuais como diferenças não programadas no processamento dos tecidos, desde a perfusão até a realização da reação imuno-histoquímica, e impedem fazer comparações numéricas entre os animais. Entretanto, embora o número total de neurônios marcados apresentasse estas variações individuais, sua distribuição por áreas foi relativamente constante nos animais estudados.

Aspectos morfológicos

Os tipos celulares Cb⁺ e Cr⁺ que observamos e descrevemos nas diversas áreas do CPF do *Sapajus apella* correspondem de forma geral aos descritos para outras espécies, em particular primatas (CONDÉ et al., 1994; GABBOTT; BACON, 1996; DEFELIPE et al., 1994). É sempre importante salientar que a evidenciação dos corpos neuronais mediante estas técnicas imuno-histoquímicas não permite uma visualização completa dos seus prolongamentos – fundamentalmente do seu axônio –, o que dificulta uma classificação precisa, a qual só pode ser conseguida com a utilização de técnicas de impregnação, como a técnica de Golgi. Assim, sua identidade morfológica deve ser sempre considerada com ressalvas.

Os diversos tipos de neurônios Cb⁺ e Cr⁺ que descrevemos em nossos resultados apresentaram uma distribuição horizontal (entre áreas corticais) bastante uniforme, diferindo entretanto em sua distribuição vertical (entre camadas corticais), fato que coincide com descrições anteriores (GABBOTT; BACON, 1996; HOF et al., 1999; CONDÉ et al., 1994).

Em nosso material destinado à evidenciação de Cb foi possível reconhecer diversos tipos neuronais. Fundamentalmente localizados nas camadas II e III, neurônios do tipo *double-bouquet*, conforme descrito por Defelipe et al., (1989), foram os mais numerosos. Ainda entre os não piramidais, neurônios relativamente maiores de formato multipolar ou alongado, como os que descrevemos nas camadas infragranulares, parecem corresponder aos neurônios de Martinotti, descritos por Fairen et al., (1984) em material impregnado pela técnica de Golgi e também observados no córtex cerebral de várias espécies de mamíferos (HOF et al., 1999).

Também confirmamos a existência de neurônios Cb⁺ na camada I, os quais parecem ser os remanescentes, no adulto, das células de Cajal-Retzius, comuns na zona marginal da placa cortical durante o desenvolvimento (MARIN-PADILLA, 1982; DERER; DERER, 1990).

Já em relação aos neurônios piramidais, nossos resultados coincidem com os da literatura (HOF; MORRISON, 1991; HAYES; LEWIS, 1992; KONDO et al., 1994) em relação ao seu predomínio na camada III, na variabilidade do seu padrão de afinidade tintorial, e no fato de eles serem mais numerosos em áreas associativas. Talvez por causa disso tenham sido frequentes no CPF do *Sapajus apella*.

Em relação à população neuronal Cr⁺, os neurônios do tipo bipolar, com prolongamentos orientados verticalmente, dispostos em todas as camadas, mas com predomínio nas camadas II e III, conforme descrito em nossos resultados, foram também identificados por vários

autores (JACOBOWITZ; WINSKY, 1991; LEWIS et al., 1991; GLEZER et al., 1992; HOF; NIMCHINSKY, 1992; RESIBOIS; ROGERS, 1992; CONDE' et al., 1994; HOF et al., 1995b; GABBOTT; BACON, 1996a,b; GABBOTT et al., 1997b; MESKENAITE, 1997; NIMCHINSKY et al., 1997; MORRISON et al., 1998), em várias espécies de mamíferos.

Como no caso da Cb, também observamos células Cr⁺ do tipo Cajal-Retzius na camada I, fato que também confirma descrições realizadas para primatas. É interessante destacar que células de Cajal-Retzius sintetizam também reelina, uma glicoproteína da matriz extracelular que desempenha papel importante nos processos de migração neuronal - durante a fase embrionária - e na sinaptogênese na fase pós-natal (TISSIR; GOFFINET, 2003). Essa glicoproteína apresenta uma grande quantidade de funções tanto no córtex cerebral adulto quanto no córtex em desenvolvimento. Durante as primeiras fases da corticogênese, a reelina sintetizada pelas células de Cajal-Retzius participa guiando neurônios e glia radial durante o processo de migração que leva à correta formação das camadas corticais. De acordo com alguns estudos mais de 57% destas células reelina positiva colocalizam também com Cr, o que sugere possíveis funções adicionais desta proteína ligante de cálcio durante os processos de formação cortical (PESOLD et al., 1999).

Distribuição vertical (por camadas) dos neurônios Cb⁺ e Cr⁺.

Em relação à distribuição vertical (por camadas) dos diversos tipos celulares Cb⁺ e Cr⁺, nossos resultados indicam que, independente do tipo celular, neurônios imunorreativos para estas CBPs concentram-se nas camadas II e III, chegando a ser seu número nestas camadas – em alguns casos - quase três vezes maior que no compartimento infragranular. No caso da Cr, o maior número de neurônios imunorreativos se concentra na região mais superior da camada II, diminuindo de forma evidente em direção à substância branca. Já neurônios Cb⁺ são mais numerosos nas camadas II e III, mas é ainda possível observar outra banda na camada V. Estes resultados coincidem com os já descritos por outros autores (DEFELIPE et al., 1989a; KOBAYASHI et al., 1990; VAN BREDERODE et al., 1990; HOF; MORRISON, 1991; DEFELIPE; JONES, 1992; FERRER et al., 1992a; HAYES; LEWIS, 1992; HOF; NIMCHINSKY, 1992; CONDE' et al., 1994; GABBOTT; BACON, 1996a,b; GABBOTT et al., 1997a; MORRISON et al., 1998).

Esta distribuição heterogênea pode ser analisada no contexto do desenvolvimento cortical (para revisão ver RAKIC et al., 1988; CAVINESS et al., 1995). Neurônios nas camadas infragranulares são os primeiros a iniciar o processo migratório a partir da superfície ventricular. A cada onda migratória, os novos neurônios ultrapassam os anteriores na placa cortical embrionária e vão ocupando sucessivamente as camadas mais superiores. Segundo esta dinâmica, os neurônios das camadas II e III são embriologicamente mais recentes que os das camadas V e VI.

Paralelamente e em um contexto evolutivo o desenvolvimento do córtex cerebral é acompanhado justamente por um incremento das camadas supragranulares, reproduzindo assim o desenvolvimento ontogenético. É a partir destas camadas que se originam as projeções corticocorticais, que potencializaram a capacidade de processamento cerebral. Assim, um acúmulo de neurônios imunorreativos às CBPs nas camadas II e III, em virtude das complexas funções que essas células desempenham na circuitaria cerebral (ver Introdução), teria a capacidade de interferir no processamento da informação - especificamente em nosso caso -, nas diversas áreas do CPf.

Nesse sentido, é importante observar que em doenças psiquiátricas onde a capacidade cognitiva está comprometida e onde o CPf está envolvido, como na esquizofrenia, alguns estudos apontam alterações quantitativas nestas células Cb⁺ ou Cr⁺ (DAVISS; LEWIS, 1995; IRITANI et al., 1999; EYLES et al., 2002).

Distribuição horizontal (por área) de neurônios Cr⁺ e Cb⁺.

Não são muitos os estudos que tenham abordado especificamente a distribuição das populações neuronais imunorreativas às CBPs nas diversas áreas do CPf do primata. Entre estes, os mais relevantes são os de Hendry et al., (1987), Condé et al., (1994), Gabbot e Bacon (1996) e Elston e Gonzalez-Albo (2003). Nem todos eles, entretanto, são quantitativos e em alguns casos abordam apenas alguns setores do CPf, fundamentalmente seu setor medial. Apenas o trabalho de Dombrowski et al., (2001) realizado no CPf do macaco rhesus permite uma comparação mais aproximada com nosso estudo.

Estes autores verificaram a possibilidade de utilizar dados quantitativos, como densidade neuronal geral, densidade glial, e densidade de neurônios Pv⁺, Cb⁺ e Cr⁺, na delimitação de áreas corticais no CPf do macaco rhesus, ou em outras palavras, testaram a hipótese segundo a

qual a distribuição desses marcadores acompanhava os parcelamentos do CPF desse primata obtidos mediante critérios cito, mielo ou quimioarquitetônicos em estudos anteriores.

É importante ressaltar que nosso estudo sobre a distribuição das CBPs iniciou na realidade com a análise da distribuição de neurônios imunorreativos para a parvalbumina e agora se completa com as CBPs Cb e Cr. No caso da Pv, tínhamos descrito que esta técnica era de fato útil como ferramenta arquitetônica porque:

a) sob o aspecto morfológico, a heterogênea distribuição de neuropilo permitia diferenciar áreas arquitetônicas no CPF do *Sapajus apella*, mesmo quando os cortes eram analisados com pequenos aumentos. De fato, em muitos casos essa heterogeneidade acompanhava os limites de áreas corticais definidos pela cito e mieloarquitetura.

b) desde o ponto de vista quantitativo variações estatisticamente significantes da densidade neuronal acompanhavam também a arquitetura cortical.

No caso de neurônios Pv+ tínhamos observado que sua densidade média no córtex total (compartimentos SG e IG), nas mesmas áreas analisadas na presente análise, apresentava em 75% dos animais diferenças estatisticamente significantes entre as áreas disgranulares e agranulares, e em 50% entre as áreas granulares e disgranulares. Apesar dessas diferenças estatísticas não serem consistentes em todos os casos, nosso estudo mostrou que existia uma tendência na qual os maiores valores de densidade de neurônios Pv+ estavam situados nas áreas granulares, seguida pelas disgranulares e finalmente as agranulares.

Isto, em parte, correspondia ao fato de a maior concentração de neurônios Pv+ ocorrer nas camadas III, IV e V, e assim áreas com uma camada IV bem desenvolvida (como as áreas 46v e 12l) tendiam a ter uma maior quantidade de neurônios Pv+ em relação, por exemplo, às áreas agranulares 32c e Oap. Esses dados corroboravam os resultados de Dombrowski et al., (2001) que também tinham observado que no rhesus a Pv representava, por estes critérios quantitativos, uma ferramenta arquitetônica bastante útil.

Em relação aos dados presentes, observamos que as populações neuronais Cb+ e Cr+ apresentam diferenças claras em relação aos nossos resultados com Pv. Primeiramente, a distribuição horizontal (entre áreas) de fibras e plexos foi bastante uniforme em todas as áreas corticais estudadas, não existindo a possibilidade de diferenciar limites arquitetônicos com nenhuma das duas técnicas, fato que coincide com a descrição de outros autores (para revisão ver HOF et al., 1999).

Já quando analisamos as variações de densidade neuronal encontramos poucas variações estatisticamente significantes, e quando estas ocorriam pareciam estar mais relacionadas com

flutuações derivadas das limitações inerentes ao sistema de contagem que obedecendo algum tipo de critério arquitetônico, como ficava claro no caso da Pv. De fato, o pós-test de Dunn em cada animal do presente estudo mostrou que de 15 pareamentos possíveis por animal e por técnica (ver Resultados), no caso da calbindina só tivemos um pareamento com diferença estatisticamente significativa no Animal 1, e dois no Animal 2. No caso da Cr, um no Animal 1 e três no Animal 2. Assim, nossa hipótese que a densidade de neurônios imunorreativos às CBPs acompanharia os limites arquitetônicos no CPf do *Sapajus apella* só foi parcialmente corroborada para a Pv e não confirmada para Cb e Cr.

Isto, em parte, parece estar relacionado à distribuição por camadas destas populações neuronais. Como citamos no caso da Pv, a maior concentração de neurônios se localiza numa faixa central (camadas III, IV e V). Já no caso da Cb e Cr, a maior concentração ocorre nas camadas II e III e depois, de forma bem menos intensa - como vimos em nossos resultados quando estabelecemos a relação SG/IG -, em outra faixa nas camadas V-VI. Se isto estiver correto, o fato de uma área ter ou não uma camada granular interna (IV) desenvolvida pouco interferiria na densidade total destes neurônios Cb e Cr positivos.

Resultados semelhante foram obtidos por Dombrowski et al., (2001), que também verificaram que a Pv poderia ser utilizada para estabelecer critérios arquitetônicos quantitativos, isto raramente ocorria com Cb e em nenhuma circunstância com Cr.

Embora nossos resultados coincidam de forma geral com os obtidos por Dombrowski et al., (2001), nossos dados não confirmam as observações destes autores segundo as quais neurônios Cb+ seriam mais numerosos em regiões “límbicas” do CPf (correspondentes a nossas áreas agranulares 32c e Oap). Como pode ser observado em nossos resultados, não tivemos diferenças ou tendências consistentes que suportassem esta hipótese.

Conclusões

Conclusões

Em relação aos objetivos propostos no início deste estudo, podemos concluir que:

a) De forma diferente ao que tínhamos descrito anteriormente no caso da parvalbumina, observamos uma distribuição relativamente homogênea de neuropilo imunorreativo para calretinina e calbindina nas áreas arquitetônicas do CPf do *Sapajus apella* selecionadas neste estudo.

b) Esta distribuição homogênea também é observada na população neuronal imunorreativa para ambas as proteínas (Cr e Cb), não havendo diferenças significativas consistentes na densidade neuronal entre as áreas estudadas.

c) Desta forma, não existe uma correspondência entre os dados qualitativos e quantitativos analisados que permita correlacionar a distribuição destas proteínas (Cb e Cr) com as áreas arquitetônicas já definidas para o CPf do *Sapajus apella*.

d) As populações neuronais Cb⁺ e Cr⁺ observadas no CPf do *Sapajus apella* correspondem às descritas - em primatas - na literatura. O mesmo se aplica à distribuição por camadas destas células.

Referências Bibliográficas.

- AMARAL, D. G.; PRICE, J. L. Amigdalocortical projections in the monkey. *J. Comp. Neurol.* v. 230, p. 465-496, 1984.
- BAIMBRIDGE, K.G., CELIO, M.R., ROGERS, J.H. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends. Neurosci.* v. 15, p. 303–307, 1992.
- BARBAS, H.; PANDYA, D. N. Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* v. 286, p. 353-375, 1989.
- BERGER, F., GAGE, F.H., VIJAYARAGHAVEN, S. Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J. Neurosci.* v. 18, p. 6871–6881, 1998.
- BLÜMCKE, I., CELIO, M.R. Parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivities coexist within cytochrome oxidase-rich compartments of squirrel monkey area 18. *Exp. Brain Res.* v. 92, p. 39–45, 1992.
- BLÜMCKE, I., HOF, P.R., MORRISON, J.H., CELIO, M.R. Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the visual cortex of Old World monkeys and humans. *J. Comp. Neurol.* v. 301, p. 417–432, 1990.
- BONIN, von, G.; BAILEY, P. The Neocortex of *Macaca mulatta* Urbana, IL: University of Illinois Press, 1947.
- BOTELHO, E.P., SOARES, J.G.M., PEREIRA, S.S., FIORANI, M., GATTASS, R. Distribution of calbindin- 28kD and parvalbumin in V1 in normal adult *Cebus apella*. Distribution of calbindin-28kD and parvalbumin in V1 in normal adult *Cebus apella* monkeys and in monkeys with retinal lesions. *Brain Res.* v. 1117, p. 1- 11, 2006.
- BRODMANN, K. Vergleichende Localisationslehre der Grosshirnrinde. In: *Ihre Prinzipien Dargestellt auf Grund des Zellenbaues*, Leipzig. 1909.

- CAULI, B., AUDINAT, E., LAMBOLEZ, B., ANGULO, M.C., ROPERT, N., TSUZUKI, K., HESTRIN, S., ROSSIER, J. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.* v. 17, p. 3894–3906, 1997.
- CAVINESS, V.,S. JR.; TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R.S. Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci.*, v. 18(9), p. 379-383, 1995.
- CELIO, M. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system, *Neuroscience*, v.35 p. 375-475, 1990.
- CELIO, M.R., PAULS, T.L., SCHWALLER, B. Introduction to EFhand calcium binding proteins. In: Celio, M.R. (Ed.), *Guidebook to the calcium-binding proteins*. Sambrook and Tooze Publication, Great Britain, p. 15– 20, 1996.
- COGGESHALL E LEKAN. Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *J. Comp. Neurol*, v. 364, p. 6-15, 1996.
- CONDÉ, F., LUND, J.S., JACOBOWITZ, D.M., BAIMBRIDGE, K.G., LEWIS, D.A. Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: Distribution and morphology. *J. Comp. Neurol.* v. 341, p. 95–116, 1994.
- CHRISTAKOS, S., GABRIELIDES, C., RHOTEN, W.B. Vitamin Ddependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology. *Endocr. Rev.* v. 10, p. 3 –26, 1989.
- CRUZ-RIZZOLO, R.J., HORTA-JÚNIOR, J.A.C., BITTENCOURT, J., ERVOLINO, E., DE OLIVEIRA, J.A., CASATTI, C.A. Distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons in the prefrontal cortex of the *Cebus* monkey. *Brain Res.* v. 1083, p. 118-133, 2006

- CRUZ-RIZZOLO, R.J.; DE LIMA, MIGUEL A.X.; ERVOLINO, E.; DE OLIVEIRA J. A.; CASATTI, C. A. Cyto- myelo- and chemoarchitecture of the prefrontal cortex of the Cebus monkey. *Neuroscience*, v. 12, p. 1-26, 2011.
- DÁVILA, J.C., PADIAL, J., ANDREU, M.J., REAL, M.A., GUIRADO, S. Calretinin immunoreactivity in the cerebral cortex of the lizard *Psammodromus algirus*: A light and electron microscopic study. *J.Comp. Neurol.* v. 382, p. 382–393, 1997.
- DAVISS, S.R.; LEWIS, D.A. Local circuit neurons of the prefrontal cortex in schizophrenia: selective increase in the density of calbindin-immunoreactive neurons. *Psychiatry Res.*, v. 59(1-2), p. 81-96, 1995.
- DEFELIPE, J., HENDRY, S.H. AND JONES, E.G. Visualization of chandelier cell axons by parvalbumin immunoreactivity in monkey cerebral cortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86 p. 2093-2097, 1989.
- DEFELIPE, J. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28k, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J. Chem. Neuroanat.* v. 14, p. 1–19, 1997.
- DEFELIPE, J., JONES, E.G. High-resolution light and electron microscopic immunohistochemistry of colocalized GABA and calbindin D-28k in somata of double bouquet cell axons of monkey somatosensory cortex. *Eur. J. Neurosci.* v. 4, p. 46–60, 1992.
- DEMEULEMEESTER, H., ARCKENS, L., VANDESANDE, F., ORBAN, G.A., HEIZMANN, C.W. AND POCHET, R. Calcium binding proteins and neuropeptides as molecular markers of GABAergic interneurons in the cat visual cortex, *Exp. Brain Res.*, v. 84, p. 538-544, 1991.
- DERER e DERER. Cajal-Retzius cell ontogenesis and death in mouse brain visualized with horseradish peroxidase and electron microscopy, *Neuroscience.*; v36(3), p.839–856, 1990.

- DEL RÍO, M.R., DEFELIPE, J. Colocalization of calbindin D-28k, calretinin, and GABA immunoreactivities in neurons of the human temporal cortex. *J. Comp. Neurol.* v. 369, p. 472–482, 1996.
- DOMBROWSKI, S.M.; HILGETAG, C.C.; BARBAS, H. Quantitative architecture distinguishes prefrontal cortical systems in the rhesus monkey. *Cereb Cortex.*, v. 11(10), p. 975-988, 2001.
- DOWD, D.R., MACDONALD, P.N., KOMM, B.S., HAUSSLER, M.R., MIESFELD, R.L. Stable expression of the calbindin-D28K complementary DNA interferes with the apoptotic pathway in lymphocytes. *Mol. Endocrinol.* v. 6, p. 1843– 1848, 1992.
- DOWD, D.R. Calcium regulation of apoptosis. In: Means, A.R. (Ed.), *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*. Raven Press, New York, v. 30 ,p. 255–280, 1995.
- ECONOMO, VON C. *The cytoarchitectonics of the human cerebral cortex*. London: Oxford University Press, 1929.
- ELSTON, G.N.; GONZALEZ-ALBO. Parvalbumin-, calbindin-, and calretinin-immunoreactive neurons in the prefrontal cortex of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*): a standardized quantitative comparison with sensory and motor areas. *Brain Behav. Evol.*, v. 62(1), p.19-30, 2003.
- EYLES, D.W.; MCGRATH, J.J.; REYNOLDS, G.P. Neuronal calcium-binding proteins and schizophrenia. *Schizophrenia Research.* v. 57, p. 27– 34, 2002.
- FAIRÉN, A., DEFELIPE, J., REGIDOR, J. Nonpyramidal neurons: General account. In: Peter, A., Jones, E.G. (Eds.), *Cerebral Cortex 1, Cellular Components of the Cerebral Cortex*. Plenum, New York, p. 210– 253, 1984.
- FERRER, I.; TUÑÓN, T.; SORIANO, E.; DEL RIO, A.; IRAIZOZ, I.; FONSECA, M.; GUIONNET, N. Calbindin immunoreactivity in normal human temporal neocortex. *Brain Res.* v. 572(1-2), p.33-41, 1992

- FUSTER, J. M. The prefrontal cortex. New York: Raven Press, 1989. –
- FUSTER, J. M. The prefrontal cortex and its relation to behavior. Prog. Brain Res. v. 87, p. 201-211, 1991.
- GABBOTT, P.L.A., BACON, S.J. Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24 a,b,c, 25 and 32 in the monkey: I. Cell morphology and morphometrics. J. Comp. Neurol. v. 364, p. 567–608, 1996.
- GABBOTT, P.L.A., BACON, S.J. Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: II. Quantitative areal and laminar distributions. J. Comp. Neurol. v. 364, p. 609- 636, 1996.
- GABBOTT, P.L.A, DICKIE, G.M., VAID, R.R., HEADLAM, A.J.N., BACON, S.J. Local-circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32, and 24b) in the rat: Morphology and quantitative distribution. J. Comp. Neurol. v. 377, p. 465–499, 1997.
- GOLDMAN-RAKIC, P.S. Circuitry of primate prefrontal cortex and the regulation of behavior by representational memory. In: MOUNTCASTLE, V.B; PLUM, F.; GEIGER, S.R. (Eds): Handbook of Physiology. The Nervous System, Md.: American Physiological Society, Bethesda, v.5, p.373-417, 1987.
- GLEZER, I. I.; HOF, P.R.; MORGANE P.J. Calretinin-immunoreactive neurons in the primary visual cortex of dolphin and human brains. Brain Res., v. 595(2), p. 181-188, 1992.
- GLEZER, I.I., HOF, P.R., LERANTH, C. AND MORGANE, P.J. Calcium-binding protein-containing neuronal populations in mammalian visual cortex: a comparative study in whales, insectivores, bats, rodents, and primates, Cereb. Cortex, v.3, p. 249-272, 1993.
- GOODCHILD, A.K., MARTIN, P.R. The distribution of calcium binding proteins in the lateral geniculate nucleus and visual cortex of a New World monkey, the marmoset, *Callithrix jacchus*. Vis.Neurosci. v. 15, p. 625–642, 1998.

- HAYES, T. L.; LEWIS, D.A. Nonphosphorylated neurofilament protein and calbindin immunoreactivity in layer III pyramidal neurons of human neocortex. *Cereb. Cortex*, v.2(1), p.56-67, 1992.
- HENDRY, S.H.; SCHWARK, H.D.; JONES, E.G.; YAN, J. Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. *J. Neurosci.*, v. 7(5), p. 1503-1519, 1987.
- HENDRY, S.H.C., JONES, E.G., EMSON, P.C., LAWSON, D.E.M., HEIZMANN, C.W., STREIT, P. Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities. *Exp. Brain Res.* v. 76, p. 467–472, 1989.
- HO, B-K., ALEXIANU, M.E., COLOM, L.V., MOHAMED, A.H., SERRANO, F., APPEL, S.H. Expression of calbindin-D28K in motoneuron hybrid cells after retroviral infection with calbindin- D28K cDNA prevents amyotrophic lateral sclerosis IgGmediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 93, p. 6796– 6801, 1996.
- HOF, P.R., MORRISON, J.H. Neocortical neuronal subpopulations labelled by a monoclonal antibody to calbindin exhibit differential vulnerability in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* v. 111, p. 293–301, 1991.
- HOF, P.R., NIMCHINSKY, E.A. Regional distribution of neurofilament and calcium-binding proteins in the cingulate cortex of the macaque monkey. *Cereb. Cortex.* v. 2, p. 456–467, 1992.
- Hof, P.R., Mufson, E.J., Morrison, J.H. The human orbitofrontal cortex: Cytoarchitecture and quantitative immunohistochemical parcellation. *J. Comp. Neurol.* 359, 48–68, 1995b.

- HOF PR, GLEZER II, CONDE F, FLAGG RA, RUBIN MB, NIMCHINSKY EA, VOGT B, WEISENHORN DM. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat.* v. 16, p. 77–116, 1999.
- HUANG, Z. J; Di Cristo, G.; Ango, F. Development of GABA innervations in the cerebral and cerebellar cortices. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 8, p. 673-689, 2007.
- IRITANI, S.; KUROKI, N.; IKEDA, K.; KAZAMATSURI, H. Calbindin immunoreactivity in the hippocampal formation and neocortex of schizophrenics. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.*, v. 23(3), p.409-21, 1999.
- JACOBOWITZ, D.M; WINSKY L. Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *J Comp Neurol*, v. 304(2),p.198-218, 1991.
- JONES, E.G. Neurogliaform or spiderweb cells. In: Peter, A., Jones, E.G. (Eds.), *Cerebral Cortex 1, Cellular Components of the Cerebral Cortex*. Plenum, New York, p. 409–418, 1984.
- JONES, E.G., HENDRY, S.H.C. Basket cells. In: Peter, A., Jones, E.G. (Eds.), *Cerebral Cortex 1, Cellular Components of the Cerebral Cortex*. Plenum, New York, p. 309–336, 1984.
- KATZ, B. *The Release of Neurotransmitter Substances*. Liverpool University Press, London, 1969.
- KOBAYASHI, K., EMSON, P.C., MOUNTJOY, C.Q., THORNTON, S.N., LAWSON, D.E.M., MANN, D.M.A.,. Cerebral cortical calbindina D28k and parvalbumin neurones in Down's syndrome. *Neurosci.Lett.* 113, 17–22, 1990.
- KONDO, H., HASHIKAWA, T., TANAKA, K., JONES, E.G. Neurochemical gradient along the monkey occipito-temporal cortical pathway. *NeuroReport* . v. 5, p. 613–616, 1994.
- LEWIS, D.A. Chandelier cells: shedding light on altered cortical circuitry in schizophrenia. *Mol. Psychiatry.* v. 3, p. 468– 471, 1998.

- LEWIS, D.A.; CRUZ, D.A; MELCHITZKY, D.S.; PIERRI, J.N. Lamina-specific deficits in parvalbumin-immunoreactive varicosities in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia: evidence for fewer projections from the thalamus. *The American Journal of Psychiatry*, v.158, p.1411–1422, 2001.
- LUKAS, W., JONES, K.A. Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and excitotoxicity in vitro. *Neuroscience*. v. 61, p. 307– 316, 1994.
- LUND, J.S., LEWIS, D.A. Local circuit neurons of developing and mature macaque prefrontal cortex: golgi and immunocytochemical characteristics. *J. Comp. Neurol.* v. 328, p. 282– 312, 1993.
- MARIN-PADILLA M. Origin, prenatal development and structural organization of layer I of the human cerebral (motor) cortex. A Golgi study. *Anatomy and Embryology*, v.164 (2), p.161-206.
- MARTÍNEZ-GUIJARRO, F.J., FREUND, T.F. Distribution of GABAergic interneurons immunoreactive for calretinin, calbindin-D28k, and parvalbumin in the cerebral cortex of the lizard *Podarcis hispanica*. *J. Comp. Neurol.* v. 322, p. 449–460, 1992.
- MATTSON, M.P., RYCHLIK, B., CHU, C., CHRISTAKOS, S. Evidence for calcium-reducing and excitoprotective roles for the calciumbinding protein calbindin-D28K in cultured hippocampal neurons. *Neuron*. v. 6, p. 41– 51, 1991.
- MESKENAITE V. Calretinin-immunoreactive local circuit neurons in area 17 of the cynomolgus monkey, *Macaca fascicularis*. *J Comp Neurol.* v. 379(1), p.113-132, 1997.
- MESULAM, M. M.; MUFSON, E. J. Insula of the Old World monkey. I: Architectonics in the insulo-orbitotemporal component of the paralimbic brain. *J. Comp. Neurol.*, v. 212, p. 1-22, 1982.

- MOCKEL, V., FISCHER, G.I., 1994. Vulnerability to excitotoxic stimuli of cultured rat hippocampal neurons containing the calcium-binding proteins calretinin and calbindin D28K. *Brain Res.* v. 648, p. 109–120, 1994.
- MORECRAFT, R. J.; GEULA, C.; MESULAM, M. M. Cytoarchitecture and neural afferents of orbitofrontal cortex in the brain of the monkey. *J. Comp. Neurol.*, v. 323, p. 341–358, 1992.
- MORRISON, J.H., HOF, P.R., HUNTLEY, G.W. Neurochemical organization of the primate visual cortex. In: Bloom, F.E., Björklund, A., Hökfelt, T. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy 14, The Primate Nervous System, Part II*. Elsevier, Amsterdam, pp. 299–430, 1998.
- NIMCHINSKY, E.A., VOGT, B.A., MORRISON, J.H., HOF, P.R. Neurofilament and calcium-binding proteins in the human cingulate cortex. *J. Comp. Neurol.* v. 384, p. 597–620, 1997.
- PESOLD, C., LIU, W.S., GUIDOTTI, A., COSTA, E., CARUNCHO, H. J. Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expression. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, v. 96, p. 3217–3222, 1999.
- RAKIC, P. Specification of cerebral cortical areas.. *Science* 241(4862):170–6, 1988.
- RÉSIBOIS, A.; ROGERS, J.H. Calretinin in rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, v. 46(1), p.101–134, 1992.
- ROGERS, J.H. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J. Cell Biol.* v. 105, p. 1343– 1353, 1997.
- TERRO, F., YARDIN, C., ESCLAIRE, F., AYER-LELIEVRE, C., HUGON, J. Mild kainite toxicity produces selective motoneuron death with marked activation of CA2 + -permeable AMPA/kainite receptors. *Brain Res.* v. 809, p. 319–324, 1998.

- TISSIR F.; GOFFINET, A.M. Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci.*, v.4(6), p.496-505, 2003.
- SCHARFMAN, H.E., SCHWARTZKROIN, P.A. Protection of dentate hilar cells from prolonged stimulation by intracellular calcium chelation. *Science* v. 246, p. 257– 260, 1989. --
- SPATZ, W.B., LLLING, R.B. AND WEISENHORN, D.M., Distribution of cytochrome oxidase and parvalbumin in the primary visual cortex of the adult and neonate monkey, *Callithrix jacchus*, *J. Comp. Neurol.* v. 339, p. 510- 534, 1994.
- SOARES, J.G.M. BOTELHO, E.P., GATTASS, R. Distribution of calbindin, parvalbumin and calretinin in the lateral geniculate nucleus and superior colliculus in *Cebus apella* monkeys. *J. of Chemical Neuroanatomy*, v. 22, p. 139–146, 2001.
- SOMOGYI, P., COWEY, A. Double-bouquet cells. In: Peters, A., Jones, E.G. (Eds.), *Cerebral Cortex 1, Cellular Components of the Cerebral Cortex*. Plenum, New York, pp. 337– 360, 1984.
- VAN BREDERODE, J.F.; MULLIGAN, K.A.; HENDRICKSON, A.E. Calcium-binding proteins as markers for subpopulations of GABAergic neurons in monkey striate cortex. *J Comp Neurol.*, v. 298(1),p.1-22, 1990.
- VOGT, C.; VOGT, O. Allgemeine Ergebnisse unserer Hirnforschung. *J. Psychol. Neurol.* v. 25, p. 279- 462, 1919.
- VON BONIN G. The cerebral cortex of the *Cebus* monkey. *J Comp Neurol.* v. 69, p. 181- 227, 1938.
- WALKER AE. A cytoarchitectural study of the prefrontal area of the macaque monkey. *J Comp Neurol.* v. 73, p. 59- 86, 1940.

APÊNDICE

OBSERVAÇÃO:

Para a realização deste trabalho foram utilizados cortes de encéfalos de macacos-prego (*Sapajus apella*) anteriormente utilizados no projeto **“DISTRIBUIÇÃO DE NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS PARA PARVALBUMINA NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DO MACACO-PREGO (*Cebus apella*)**. Assim, não foram utilizados adicionais para este estudo. O certificado aprovado pelo COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, cujo pode ser verificado logo abaixo.

Apêndice

Planilhas totais (densidades neuronais por área e dados estatísticos gerais)

Calbindina

Animal 1

46v ig	46v sg	46v ct	9d ig	9d sg	9d ct	12l sg	12l ig	12l ct	13i sg	13i ig	13i ct	32c sg	32c ig	32c ct	Oap sg	Oap ig	Oap ct
27,58	37,92	58,98	6,92	15,78	11,09	13,41	11,76	12,67	14,81	6,79	11,42	24,85	13,02	20,02	9,49	3,54	6,78
7,26	20,29	14,36	5,27	7,79	6,59	14,31	8,91	11,47	23,47	11,78	16,90	19,16	17,71	18,46	9,86	4,00	7,33
6,46	14,31	11,55	2,94	6,92	4,68	8,83	15,00	25,26	9,80	8,98	9,40	20,91	7,71	13,75	4,58	4,24	4,43
14,08	36,48	24,36	2,42	5,84	4,05	22,02	10,17	15,93	18,26	12,76	15,51	10,79	9,48	10,11	7,65	7,40	7,59
6,87	16,61	12,05	2,02	4,74	3,38	17,82	7,86	11,80	16,11	17,13	16,62	10,05	8,31	9,27	14,71	6,78	11,11

	46ig	46sg	46ct	9ig	9sg	9ct	12sg	12ig	12ct	13sg	13ig	13ct	32sg	32ig	32ct	Oap sg	Oap ig	Oap ct
Number of values	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Minimum	6,5	14	12	2,0	4,7	3,4	8,8	7,9	11	9,8	6,8	9,4	10	7,7	9,3	4,6	3,5	4,4
25% Percentile	6,7	15	12	2,2	5,3	3,7	11	8,4	12	12	7,9	10	10	8,0	9,7	6,1	3,8	5,6
Median	7,3	20	14	2,9	6,9	4,7	14	10	13	16	12	16	19	9,5	14	9,5	4,2	7,3
75% Percentile	21	37	42	6,1	12	8,8	20	13	21	21	15	17	23	15	19	12	7,1	9,4
Maximum	28	38	59	6,9	16	11	22	15	25	23	17	17	25	18	20	15	7,4	11
Mean	12	25	24	3,9	8,2	6,0	15	11	15	16	11	14	17	11	14	9,3	5,2	7,4
Std. Deviation	9,0	11	20	2,1	4,4	3,1	4,9	2,8	5,8	5,0	3,9	3,4	6,5	4,2	4,8	3,7	1,8	2,4
Std. Error	4,0	5,0	9,0	0,94	2,0	1,4	2,2	1,2	2,6	2,2	1,8	1,5	2,9	1,9	2,2	1,7	0,79	1,1
Lower 95% CI	1,2	11	-0,68	1,3	2,8	2,1	9,1	7,3	8,3	10	6,6	9,8	9,1	6,1	8,3	4,7	3,0	4,5
Upper 95% CI	24	39	49	6,5	14	9,8	21	14	23	23	16	18	25	16	20	14	7,4	10

Calbindina

Animal 2

46 SG	46 IG	46 CT	9 SG	9 IG	9 CT	12 SG	12 IG	12 CT	13 SG	13 IG	13 CT	32 SG	32 IG	32 CT	Oap SG	Oap IG	Oap CT
20,63	7,52	14,25	43,67	14,98	29,73	37,54	11,21	20,87	33,30	12,74	21,80	15,81	15,39	15,62	15,87	6,13	10,93
19,75	7,00	13,63	28,98	12,61	21,43	15,80	8,29	11,88	25,67	6,62	17,05	15,67	12,38	14,40	12,30	4,92	8,37
22,13	9,98	15,93	41,60	12,55	27,09	25,57	9,22	17,46	25,52	8,22	16,85	14,34	10,26	12,76	25,36	6,31	14,59
20,08	6,53	12,76	35,64	11,20	24,31	29,35	9,21	17,28	31,76	13,84	23,25	12,25	9,17	11,17	10,87	6,96	8,88
12,91	5,68	9,13	54,21	23,47	39,40	37,74	14,77	23,26	20,06	4,28	12,70	14,81	13,72	14,26	12,60	6,44	9,52

	46 SG	46 IG	46 CT	9 SG	9 IG	9 CT	12 SG	12 IG	12 CT	13 SG	13 IG	13 CT	32 SG	32 IG	32 CT	Oap SG	Oap IG	Oap CT
Number of values	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Minimum	13	5,7	9,1	29	11	21	16	8,3	12	20	4,3	13	12	9,2	11	11	4,9	8,4
25% Percentile	16	6,1	11	32	12	23	21	8,8	15	23	5,5	15	13	9,7	12	12	5,5	8,6
Median	20	7,0	14	42	13	27	29	9,2	17	26	8,2	17	15	12	14	13	6,3	9,5
75% Percentile	21	8,8	15	49	19	35	38	13	22	33	13	23	16	15	15	21	6,7	13
Maximum	22	10	16	54	23	39	38	15	23	33	14	23	16	15	16	25	7,0	15
Mean	19	7,3	13	41	15	28	29	11	18	27	9,1	18	15	12	14	15	6,2	10
Std. Deviation	3,6	1,6	2,5	9,4	4,9	6,9	9,2	2,6	4,3	5,3	4,1	4,2	1,4	2,5	1,7	5,9	0,75	2,5
Std. Error	1,6	0,73	1,1	4,2	2,2	3,1	4,1	1,2	1,9	2,4	1,8	1,9	0,64	1,1	0,77	2,6	0,34	1,1
Lower 95% CI	15	5,3	10	29	8,8	20	18	7,3	13	21	4,1	13	13	9,1	12	8,1	5,2	7,4
Upper 95% CI	24	9,4	16	53	21	37	41	14	23	34	14	24	16	15	16	23	7,1	14

Calretinina

Animal 1

9-SG	9-IG	9CT	46-SG	46-IG	46-CT	12-SG	12-IG	12-CT	13-SG	13-IG	13-CT	32-SG	32-IG	32-CT	Oap-SG	Oap-IG	Oap-CT
17,63	9,79	13,72	28,74	10,08	18,18	20,11	7,77	13,38	24,50	9,52	15,30	27,06	15,14	22,52	17,39	32,99	23,85
21,12	6,71	14,03	22,34	8,14	15,91	24,26	8,20	17,03	37,93	18,16	28,04	20,64	11,51	14,51	10,48	29,85	19,60
14,08	5,41	9,44	19,83	7,46	14,61	19,56	6,38	13,45	26,02	24,41	25,21	29,34	17,01	24,43	13,91	25,20	21,57
17,87	6,36	11,62	20,40	9,19	13,54	64,48	24,77	45,52	24,48	14,30	19,41	39,88	31,56	36,52	22,31	49,43	35,20
11,82	4,61	8,53	22,40	10,23	16,23	46,53	19,54	38,37	51,98	18,45	30,87	39,88	31,56	36,52	22,89	60,52	42,86

	9-SG	9-IG	9-CT	46-SG	46-IG	46-CT	12-SG	12-IG	12-CT	13-SG	13-IG	13-CT	32-SG	32-IG	32-CT	Oap-SG	Oap-IG	Oap-CT
Number of values	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Minimum	12	4,6	8,5	20	7,5	14	20	6,4	13	24	9,5	15	21	12	15	10	25	20
25% Percentile	13	5,0	9,0	20	7,8	14	20	7,1	13	24	12	17	24	13	19	12	28	21
Median	18	6,4	12	22	9,2	16	24	8,2	17	26	18	25	29	17	24	17	33	24
75% Percentile	19	8,3	14	26	10	17	56	22	42	45	21	29	40	32	37	23	55	39
Maximum	21	9,8	14	29	10	18	64	25	46	52	24	31	40	32	37	23	61	43
Mean	17	6,6	11	23	9,0	16	35	13	26	33	17	24	31	21	27	17	40	29
Std. Deviation	3,6	2,0	2,5	3,5	1,2	1,8	20	8,3	15	12	5,5	6,4	8,4	9,5	9,5	5,3	15	10
Std. Error	1,6	0,88	1,1	1,6	0,54	0,79	8,9	3,7	6,8	5,4	2,5	2,8	3,8	4,3	4,3	2,4	6,6	4,5
Lower 95% CI of mean	12	4,1	8,4	18	7,5	14	10	3,0	6,6	18	10	16	21	9,5	15	11	21	16
Upper 95% CI of mean	21	9,0	15	27	11	18	60	24	44	48	24	32	42	33	39	24	58	41

Animal 2

46-SG	46-IG	46-CT	9-SG	9-IG	9-CT	12-SG	12-IG	12-CT	13-SG	13-IG	13-CT	32-SG	32-IG	32-CT	Oap-SG	Oap-IG	Oap-CT
57,31	21,42	40,99	15,75	6,48	11,11	68,75	25,06	50,99	53,41	25,86	40,71	17,46	9,36	14,12	56,98	26,88	41,94
77,68	27,32	52,44	15,99	7,85	12,20	36,78	15,94	28,05	60,91	22,21	40,17	49,46	24,94	38,87	67,01	32,41	51,12
62,83	26,51	47,01	17,21	8,07	12,64	44,46	18,94	32,90	40,42	16,05	27,59	12,81	5,08	9,52	59,04	30,38	45,43
94,50	42,80	70,42	15,40	9,09	12,50	45,32	16,63	28,74	34,69	11,42	21,26	18,79	11,41	15,60	56,69	23,97	38,76
77,99	28,17	53,44	19,11	9,54	14,32	40,33	14,43	29,24	60,07	30,76	46,67	19,02	13,24	16,48	49,21	20,17	34,69

	46-SG	46-IG	46-CT	9-SG	9-IG	9-CT	12-SG	12-IG	12-CT	13-SG	13-IG	13-CT	32-SG	32-IG	32-CT	Oap-SG	Oap-IG	Oap-CT
Number of values	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Minimum	57	21	41	15	6,5	11	37	14	28	35	11	21	13	5,1	9,5	49	20	35
25% Percentile	60	24	44	16	7,2	12	39	15	28	38	14	24	15	7,2	12	53	22	37
Median	78	27	52	16	8,1	13	44	17	29	53	22	40	19	11	16	57	27	42
75% Percentile	86	35	62	18	9,3	13	57	22	42	60	28	44	34	19	28	63	31	48
Maximum	95	43	70	19	9,5	14	69	25	51	61	31	47	49	25	39	67	32	51
Mean	74	29	53	17	8,2	13	47	18	34	50	21	35	24	13	19	58	27	42
Std. Deviation	15	8,0	11	1,5	1,2	1,2	13	4,2	9,7	12	7,7	10	15	7,4	11	6,4	4,9	6,3
Std. Error	6,5	3,6	4,9	0,68	0,53	0,52	5,6	1,9	4,3	5,3	3,4	4,7	6,6	3,3	5,1	2,8	2,2	2,8
Lower 95% CI	56	19	39	15	6,7	11	32	13	22	35	12	22	5,2	3,6	4,7	50	21	35
Upper 95% CI	92	39	67	19	9,7	14	63	23	46	65	31	48	42	22	33	66	33	50

