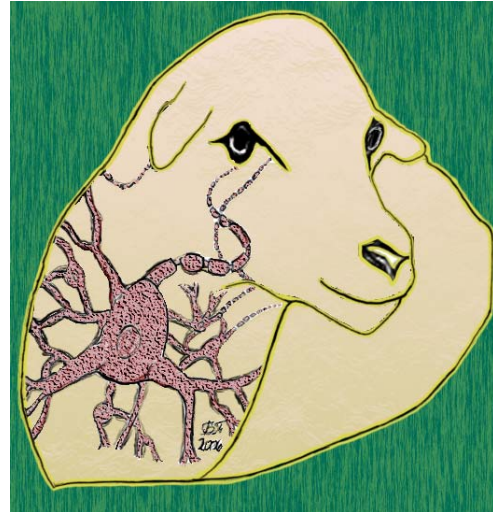


Emerson Ticona Fioretto

Aumento no número de neurônios seguido de hipertrofia neuronal pode ser mecanismo de compensação para perda neuronal resultante da remoção unilateral do gânglio cervical cranial em ovinos



Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências



Departamento:

Departamento de Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro

**São Paulo
2006**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

E. T.
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
7/4/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1674
FMVZ

Fioretto, Emerson Ticona

Aumento no número de neurônios seguido de hipertrofia neuronal pode ser mecanismo de compensação para perda neuronal resultante da remoção unilateral do gânglio cervical cranial em ovinos / Emerson Ticona Fioretto. – São Paulo: E. T. Fioretto, 2006.
102 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel.

1. Gânglio Cervical Cranial. 2. Ganglionectomia. 3. Estereologia.
4. Perda neuronal. 5. Síndrome de Horner. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
13	1º	1ª	FIORETTO	FIORETTO, E.T.
15	1º	1ª	FIORETTO	FIORETTO, E.T.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

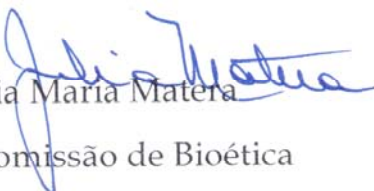
PARECER

Interessado: Emerson Fioretto

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 589/2004, intitulado: "Avaliação clínica e morfológica da ganglionectomia unilateral do gânglio cervical cranial de ovinos usando método de quantificação do "Fractionator físico" e do "Double Disector físico", no qual foram utilizadas 09 ovelhas, sob responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2005


Prof^a Dr^a Júlia Maria Matêra
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FIORETTO, Emerson Ticona

Título: Aumento no número de neurônios seguido de hipertrofia neuronal pode ser mecanismo de compensação para perda neuronal resultante da remoção unilateral do gânglio cervical cranial em ovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____



Dedicat6rias



DEDICATÓRIA

Ào meu pai,

Valdir Fioretto

*Quando nasci meu pai
sempre se fez presente
para aplaudir meus
últimos lucros.*

*Quando me ia fazendo
maior, era uma figura
que me ensinava a
diferença entre o mau e o
bem.*

*Na juventude, era a
autoridade que orientava
os limites para os
desejos.*

*Agora adulto, é o melhor
conselheiro e amigo que
tenho.*

*Meu pai: Um homem
que supõe mais do que
uma centena de
professores.*

À minha mãe,

Yolanda Ticona Fioretto

*Teus braços sempre se
abrem quando preciso
um abraço.*

*Teu coração sabe
compreender quando
preciso uma amiga.*

*Teus olhos sensíveis se
endurecem quando
preciso uma lição.*

*Tua força e teu amor me
dirigiram pela vida e me
deram as asas que
precisava para voar.*

*Minha mãe: A pessoa
que me faz compreender
e saber que não é preciso
apoiar-se em ninguém
para crescer, senão no
trabalho das próprias
conquistas.*



*À minha mais profunda amiga,
Ana Rita de Lima*

Amigo é aquela preciosa jóia ou pedra rara, difícil de encontrar, mas encontrada nos momentos mais inesperados de nossas vidas, ou nos lugares mais surpreendentes e sempre quando mais necessitamos dele! Assim encontrei você que participa da minha, divide os meus sonhos e anseios e fortalece minhas virtudes nos momentos de fraqueza. Ensinaste-me a calma e a paciência dos tempos. Sempre estiveste comigo guardando-me em teu coração. Dedico a ti minha gratidão por amar-me pelo que sou e carregar-te-ei em meu peito por toda a eternidade.



Agradecimentos



AGRADECIMENTO

É difícil saber como agradecer as pessoas que me apoiaram e se doaram para a conclusão deste trabalho, pois a gratidão é infinita. Ajudaram-me pela amizade, pelo questionamento científico, pelo desafio, por suas habilidades em alguma etapa e por muitos outros motivos. Agradeço a todos pelo carinho dedicado a este trabalho.



Obrigado *Senhor* pela sabedoria para descobrir o correto, pela vontade em elegê-lo e pela força para fazer que fosse duradouro. Por meu passado, presente e futuro guia-me para encontrar a serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar e dai-me coragem para mudar àquelas que posso e principalmente sabedoria para distingui-las.

Agradeço aos *animais* que apesar dos olhares aflitos, extrair-lhes a essência, roubar-lhes a liberdade e usufruir seus corpos, não acreditem que este sacrifício foi em vão, que não foi grato e que não foi sentida a sua dor. Foi com amor e respeito realizado. Hoje agradeço àqueles que se doaram sem compreender que suas vidas renasciam.

Agradeço à *FAPESP* pelo apoio e financiamento deste projeto.

Agradeço à *Universidade São Paulo* pela acolhida em seu seio estudantil e científico.

Agradeço à Prof.^a *Maria Angélica Miglino* pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho para que fosse alcançado no período necessário.

Agradeço ao Prof. *Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro*, meu orientador, pelos anos de trabalho em seu laboratório e pelos frutos colhidos por minha dedicação à pesquisa ao seu lado.

À Prof.^a *Sheila Canevese Rahal*, ao Professores *Julio Cesar Balieiro*, *Alexandre Serocum Borges*, *Carlos Roberto Teixeira* que me acolheram em suas instituições, participaram ativamente dos trabalhos e mesmo em seus momentos particulares sempre estenderam suas mãos-amigas à minha pessoa. Fica aqui minha eterna gratidão.

Um abraço especial ao meu amigo *Guilherme José Bolzani de Campos Ferreira* (Mamão) pelo apoio e ajuda nos momentos de catástrofes informáticas.

Agradeço aos amigos de laboratório, *Ana Rita*, *André*, *Cauê*, *Fernando*, *Procássia*, *Renato*, *Samanta*, *Silvio*, *Tais*, *Victor*, *Wanderley* e aos agregados aos trabalhos *Érika*, *Guilherme*, *Rosa* e *Vivian* pelos momentos de descontração das responsabilidades do dia a dia.



Aos meus *amigos* de outros mares, agradeço a paciência devido à minha ausência, pelo respeito e incentivo ao meu trabalho, pelas palavras, pelas descontrações e por quando se fizeram necessários para que eu alcançasse os objetivos desta meta.

“Um verdadeiro amigo é alguém que te conhece tal como és, compreende onde tens estado, acompanha-te em teus lucros e teus fracassos, celebra tuas alegrias, compartilha tua dor e jamais o julga por seus erros.”

Aos *colegas*, que não posso nomear todos, para não cometer a indelicadeza de omitir nomes, com o sonho alcançado, agradeço sua dedicação, contribuição e principalmente compreensão pelos momentos difíceis e exaltação nas horas de alegria do caminho. Graças ao seu apoio incondicional, as etapas foram superadas e os objetivos alcançados.

Aos *funcionários*, talvez eu tenha representado mais um na mesma rotina, mas a convivência nos tornou amigos. Deixo meu agradecimento a todos pela sua dedicação e pelos momentos profissionais e pessoais divididos.



*“ Ter verdadeiro sucesso na vida é:
Rir muito e muitas vezes
Ganhar o respeito de pessoas inteligentes
Gozar do carinho das crianças
Ganhar o reconhecimento de pessoas
qualificadas
Saber suportar a traição de falsos amigos
Apreciar a beleza
Procurar o melhor nos demais
Deixar o mundo um pouco melhor de como o
encontraste - com um filho são, um jardim
benito ou uma pessoa mais feliz
Saber que ao menos alguém viveu melhor
graças a ti.” (Anônimo)*



RESUMO

FIORETTO, Aumento no número de neurônios seguido de hipertrofia neuronal pode ser mecanismo de compensação para perda neuronal resultante da remoção unilateral do gânglio cervical cranial em ovinos. [Neuronal number increase followed by neuronal hypertrophy may be a compensation mechanism for neuronal loss as a result of unilateral remotion of cranial cervical ganglion in sheep]. 2006. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O sistema nervoso simpático é escassamente descrito em livros na anatomia veterinária e encontra-se pouca informação a respeito de seu funcionamento em grandes mamíferos. O conceito atual da estrutura e função dos gânglios simpáticos deriva de estudos desenvolvidos no gânglio cervical superior (GCC) em animais de laboratório, devido ao seu grande tamanho, facilidade de acesso e multiplicidade de território de inervação nestas espécies. A ganglionectomia unilateral do GCC causou condição patológica associada à síndrome de Horner com sinais associados à anisocoria, enoftalmia, ptose e hipertermia de orelha. Aplicando-se métodos estereológicos, objetivamos investigar a neuroplasticidade do GCC em condições de exigência funcional em diferentes períodos de tempo. A neuroplasticidade foi investigada em vista dos aspectos morfoquantitativos, tamanho e número total de neurônios. Objetivou-se encontrar variação, ou não, no tamanho dos neurônios, na densidade neuronal, no número de neurônios secundários à ganglionectomia unilateral do GCC. Alterações macroscópicas revelaram um aumento médio de 8%, 3% e 11% em comprimento, largura e espessura para os gânglios operados no grupo I. Para o grupo II encontraram-se aumentos em 4% para comprimento e largura e 5% em espessura, enquanto que para o grupo III, 29% de aumento foram encontrados para comprimento, 4% em largura e 7% em espessura. Os gânglios controle e operados apresentaram diferença significativa ($p = 0,0001$) na densidade neuronal (N_v). Os gânglios operados apresentaram diminuição na densidade neuronal em média de 89% para o grupo I, 65% para o grupo II e 47% para o grupo III. Esta redução reflete a distribuição heterogênea dos neurônios no gânglio operado. Um aumento no volume neuronal



global foi significativamente detectado ($p = 0,0001$), o gânglio operado apresentou aumentos médios de 13% para o grupo I, 24% para o grupo II e 29% para o grupo III, sugestivo de maior exigência funcional em resposta à ganglionectomia. O número total de neurônios apresentou diferenças significativas ($p = 0,0514$) e dois efeitos distintos nos gânglios operados. No grupo I observou-se um aumento de 3% no número total de neurônios enquanto que uma redução foi determinada para os grupos II (8%) e III (20%). A avaliação global dos resultados leva-nos a inferir duas hipóteses associadas e consecutivas: 1) a hipertrofia neuronal estaria associada a um mecanismo compensatório para a re-inervação contralateral sendo que a maior exigência funcional poderia levar estes neurônios à morte, seguido de hipertrofia de tecido não-neuronal cicatricial refletido na diminuição da densidade neuronal; 2) a hipertrofia neuronal estaria associada a um mecanismo compensatório à morte celular determinada pela maior exigência funcional. As alterações quantitativas principais secundárias à ganglionectomia unilateral do GCC no gânglio remanescente estão associadas à: perda significativa no número total de neurônios a partir da 8ª semana de evolução da doença, perda significativa na densidade neuronal a partir da 8ª semana e aumento significativo na área e volume neuronal.

Palavras chave: Gânglio Cervical Cranial. Ganglionectomia. Estereologia. Perda neuronal.

Síndrome de Horner.



ABSTRACT

FIORETTO, Neuronal number increase followed by neuronal hypertrophy may be a compensation mechanism for neuronal loss as a result of unilateral remotion of cranial cervical ganglion in sheep. [Aumento no número de neurônios seguido de hipertrofia neuronal pode ser mecanismo de compensação para perda neuronal resultante da remoção unilateral do gânglio cervical cranial em ovinos]. 2006. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The sympathetic nervous system is briefly described in veterinary anatomy text-books and there is little information so far concerning its function in large mammal species. The current concept of the structure and function of the sympathetic ganglia is derived from studies on the cranial cervical ganglia (CCG) carried out in laboratory animals due to very attractive characteristics of CCG in these species such as large size, accessibility and multiplicity of target organs. The CCG unilateral ganglionectomy caused a pathological condition associated with Horner's syndrome which includes anisocoria, enophthalmos, ptosis and increase in the temperature of ear as a result of peripheral vasodilatation. Using stereology-designed methods, we aimed to study CCG neuroplasticity under experimental functional overloading along distinct periods of time. Neuroplasticity was investigated according to morphoquantitative aspects, mostly size and total number of neurons. We wanted to find out whether or not neuron size, numerical density and nerve cell numbers would vary as a result of CCG ganglionectomy. Gross anatomic differences were considered to the increase in the operated ganglia, means of 8%, 3% and 11% for length, width and thickness, respectively in the group I. For group II it was encountered means increases of 4% for length and width and 5% in thickness. Group III showed means values of 29% increase in length, 4% in width and 7% in thickness. Control and operated sheep CCG revealed significant difference ($p=0.0001$) in the neuronal density (N_v). The operated ganglia revealed reduction in the neuronal density of 89% for group I, 65% for group II and 47% for group III. This reduction in the operated ganglia reflects its inhomogeneous distribution of neurons. An increase in the global neuronal



volume was significantly detected ($p= 0.0001$), the operated ganglia showed increases in the means of 13% for group I, 24% for group II and 29% for group III, suggesting a functional overload response for the unilateral ganglionectomy. The total number of neurons presented significant differences ($p = 0.0514$) and two distinct effects in the operated ganglia. In the group I, an increase of 3% was encountered meanwhile reduction in the total number was associated to groups II (8%) and group III (20%). An overlook of the results suggests two consecutive and associated hypotheses: 1) the hypertrophy of neurons would be associated to a compensatory mechanism for contralateral re-innervation although the functional overload would drive these neurons to cellular death, followed by hypertrophy of non-neuronal tissue as reflected in the neuronal density; 2) the neuronal hypertrophy would be associated to a compensatory mechanism to cellular death caused by the functional overload

The main quantitative changes in the remaining ganglia are: Significant loss in the total number of neurons from the 8th week of evolution of the disease; Significant decrease in the numerical density (Nv) from the 8th week and significant increase in both neuron area and neuron volume.

Key words: Cranial Cervical Ganglion. Ganglionectomy. Stereological design. Neuronal loss. Horner's syndrome.



LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Fotomicrografias seqüenciais representando as etapas da ganglionectomia unilateral esquerda do GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino. Em A observa-se o posicionamento da cabeça do animal. Em B visualiza-se a incisão ventrolateral. Em C observamos o osso epihióide (seta branca). Em D representa-se o momento de extração do gcc (seta cheia).....59
- Figura 2 – Fotografia do plano nasal de um ovino ilustrando a ausência da sudorese no hemi-plano nasal esquerdo (cabeças de setas cheias) após a ganglionectomia unilateral do GCC (gânglio cervical cranial) enquanto no hemi-plano nasal direito observa-se o aspecto brilhante da sudorese (cabeças de setas vazias).61
- Figura 3 – Fotografia da face de um ovino demonstrando a ptose da pálpebra superior (traço) presente após a ganglionectomia unilateral do GCC (gânglio cervical cranial). posicionaram-se dois traços (amarelos - dois centímetros) idênticos entre os pontos mais côncavos da mucosa palpebral superior e inferior em ambos os olhos. Observa-se a diferença de altura da pálpebra superior esquerda para o traço em comparação à direita, caracterizando a ptose no olho esquerdo.....62
- Figura 4 – Fotomicrografias ilustrando um disector aplicado no GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino avaliado após a ganglionectomia unilateral (controle) do grupo I. Nesta montagem observa-se que a secção referencia (A) está sob a look-up (B). Setas pretas indicam neurônios que estavam presentes na secção de referência e desapareceram na look-up, ao passo que setas brancas indicam neurônios presentes nas duas secções. Nota-se que a altura do disector é de 12 μ m. Observa-se distribuição homogênea dos neurônios no gânglio controle. Técnica de coloração: azul de toluidina. Escala de barra: 25 μ m.....67
- Figura 5 – Fotomicrografias ilustrando um disector aplicado no GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino avaliado duas semanas (grupo I) após ganglionectomia unilateral (operado). Nesta montagem observa-se que a secção referencia (A) está sob a look-up (B). Setas pretas indicam neurônios que estavam presentes na secção de referência e desapareceram na look-up, ao passo que setas brancas indicam neurônios presentes nas duas secções. Nota-se que a altura do disector é de 12 μ m. Observa-se distribuição heterogênea dos neurônios no gânglio operado. Técnica de coloração: azul de toluidina. Escala de barra: 25 μ m68
- Figura 6 – Fotomicrografias ilustrando um disector aplicado no GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino avaliado após a ganglionectomia unilateral (controle) do grupo II. Nesta montagem observa-se que a secção referencia (A) está sob a look-up (B). Setas pretas indicam neurônios que estavam presentes na secção de referência e desapareceram na look-up, ao passo que setas brancas indicam neurônios presentes nas duas secções. Nota-se que a altura do



- disector é de 12 μ m. Observa-se distribuição homogênea dos neurônios no gânglio controle. Técnica de coloração: azul de toluidina. Escala de barra: 25 μ m 69
- Figura 7 – Fotomicrografias ilustrando um disector aplicado no GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino avaliado sete semanas (grupo II) após ganglionectomia unilateral (operado). Nesta montagem observa-se que a secção referencia (A) está sob a look-up (B). Setas pretas indicam neurônios que estavam presentes na secção de referência e desapareceram na look-up, ao passo que setas brancas indicam neurônios presentes nas duas secções. Nota-se que a altura do disector é de 12 μ m. Observa-se distribuição heterogênea dos neurônios no gânglio operado. Técnica de coloração: azul de toluidina. Escala de barra: 25 μ m 70
- Figura 8 – Fotomicrografias ilustrando um disector aplicado no GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino avaliado após a ganglionectomia unilateral (controle) do grupo III. Nesta montagem observa-se que a secção referencia (A) está sob a look-up (B). Setas pretas indicam neurônios que estavam presentes na secção de referência e desapareceram na look-up, ao passo que setas brancas indicam neurônios presentes nas duas secções. Nota-se que a altura do disector é de 12 μ m. Observa-se distribuição homogênea dos neurônios no gânglio controle. Técnica de coloração: azul de toluidina. Escala de barra: 25 μ m 71
- Figura 9 – Fotomicrografias ilustrando um disector aplicado no GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino avaliado doze semanas (grupo III) após ganglionectomia unilateral (operado). Nesta montagem observa-se que a secção referencia (A) está sob a look-up (B). Setas pretas indicam neurônios que estavam presentes na secção de referência e desapareceram na look-up, ao passo que setas brancas indicam neurônios presentes nas duas secções. Nota-se que a altura do disector é de 12 μ m. Observa-se distribuição heterogênea dos neurônios no gânglio operado. Técnica de coloração: azul de toluidina. Escala de barra: 25 μ m 72
- Gráfico1– Gráfico descreve as estimativas das médias individuais para a área do núcleo (μm^2), área do corpo celular (μm^2), volume neuronal (μm^3), Nv (neurônios. mm^{-3}) e N (número total de neurônios) no gânglio cervical cranial (GCC) de ovinos avaliados em três diferentes períodos pós-operatórios: 2 semanas (gI); 7 semanas (gII) e 12 semanas (gIII). Círculos (o) representam estimativas individuais e barras horizontais (-) assinalam médias dentro de cada grupo de acordo com o tratamento empregado: controle e operado, São Paulo – 2006 80



LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Representação do número de “disectors” e numero total de perfis neuronais encontrados em cada animal de cada grupo – São Paulo, 2006	53
Tabela 2 – Representação dos dados macromorfométricos do gcc obtidos durante o ato cirúrgico e abate dos animais, São Paulo – 2006.....	59
Tabela 3 – Representação dos dados obtidos de observação clínica para a grupo I durante o período pós cirúrgico, São Paulo, 2006	63
Tabela 4 – Representação dos dados obtidos de observação clínica para a grupo II durante o período pós cirúrgico, São Paulo, 2006	64
Tabela 5 – Representação dos dados obtidos de observação clínica para a grupo III durante o período pós cirúrgico, São Paulo, 2006	65
Tabela 6 – Representação das medias dos resultados obtidos para as áreas do núcleo e corpo celular e volume do neurônio de gânglios controle e operados de ovinos avaliados em diferentes períodos após a ganglionectomia unilateral do gcc, São Paulo, 2006.....	78
Tabela 7 - Representação da estimativa de neurônios mm^{-3} e a estimativa do número total de neurônios do gcc de ovinos controle e tratados avaliados em diferentes épocas após a ganglionectomia unilateral. São Paulo, 2006.....	79



SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	27
3	REVISÃO DE LITERATURA	29
3.1	LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO	29
3.2	MICROESTRUTURA E ULTRAESTRUTURA	32
3.3	REMOÇÃO EXPERIMENTAL DE GÂNGLIOS SIMPÁTICOS (GANGLIONECTOMIA E SUAS ALTERAÇÕES)	35
3.4	ESTUDOS MORFOMÉTRICO E ESTEREOLÓGICO.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	MATERIAL	43
4.2	MÉTODOS.....	44
4.2.1.	Anatomia Macroscópica.....	44
4.2.1.1	<i>Estudo piloto</i>	44
4.2.1.2	<i>Técnica Operatória</i>	45
4.2.2	Estudo clínico	46
4.2.3	Microscopia de luz de cortes semi-finos	48
4.2.4	Estudo estereológico.....	50
4.2.4.1	<i>Estimativa do número total de neurônios ganglionares obtida pelo método "Physical Fractionator"</i>	50
4.2.4.2	<i>Estimativa da densidade numérica (N_v) pelo método do "Two way physical Disector"</i>	52
4.2.4.3	<i>Estimativa global do volume neuronal</i>	54
4.2.5	Estudo Morfométrico (Tamanho dos neurônios ganglionares).....	55
4.2.5.1	<i>Área Seccional do corpo celular e núcleo neuronal</i>	55



4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
5	RESULTADOS	58
5.1.	ANATOMIA MACROSCÓPICA E TECNICA CIRÚRGICA.....	58
5.2.	ANÁLISE CLÍNICA.....	60
5.3.	MICROESTRUTURA	66
5.4	ESTUDO ESTEREOLÓGICO.....	73
5.4.1	Densidade neuronal e número total de neurônios	73
5.4.2	Estimativa global do volume neuronal.....	74
5.5	ESTUDO MORFOMÉTRICO	76
5.5.1	Área seccional do núcleo neuronal.....	76
5.5.2	Área seccional do corpo celular neuronal	77
6	DISCUSSÃO	82
6.1	TÉCNICA OPERATÓRIA	82
6.2	ANATOMIA MACROSCÓPICA.....	83
6.3	ESTUDO CLÍNICO	84
6.4.	MICROESTRUTURA	85
6.5	ESTUDO ESTEREOLÓGICO.....	86
6.5.1	Densidade Neuronal	87
6.5.2	Número total de neurônios	88
6.5.3	Estimativa global do volume neuronal.....	90
6.6	ESTUDO MORFOMETRICO	91
6.6.1	Área seccional do núcleo neuronal.....	91
6.6.2	Área do corpo celular neuronal	92
7	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	96

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Classicamente o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) é definido como um sistema eferente de transmissão de impulsos do Sistema Nervoso Central (SNC) aos órgãos periféricos, sendo constituído por um arranjo extenso de gânglios e nervos, sendo estes gânglios classificados segundo sua localização anatômica em paravertebral, pré-vertebral, paravisceral e intramural. Os gânglios paravertebrais arranjam-se em duas cadeias simpáticas dispostas em ambos os lados da coluna vertebral e comunicam-se com o SNC via ramos comunicantes brancos conectando-se à medula espinhal (BAKEWELL, 1995; GABELLA, 2004).

Os efeitos do SNA vinculam-se ao controle do ritmo cardíaco, constrição e dilatação de vasos sanguíneos, contração e relaxamento de musculatura lisa de vários órgãos, acomodação visual, regulação das secreções exócrinas e endócrinas do corpo entre outras. Os nervos autônomos compõem-se por fibras eferentes e aferentes. Reporta-se a existência de fibras autônomas aferentes, ou seja, responsáveis pela transmissão dos impulsos da periferia para o SNC, relacionadas à mediação da sensação de algumas vísceras, à regulação vasomotora e aos reflexos respiratórios, tais como, os baro e quimiorreceptores no seio carotídeo e no arco aórtico (BAKEWELL, 1995).

Quanto ao papel fisiológico, reporta-se que, os gânglios simpáticos representam locais de interação sináptica, não sendo apenas estações simples de retransmissão, mas locais de convergência, facilitação e inibição de impulsos nervosos (ECCLES, 1935; MATTHEWS, 1983).

No pescoço, o tronco simpático cervical situa-se dorsalmente ao nervo vago e próximo à artéria carótida comum, ventralmente ao processo transversal e músculos pré-vertebrais.

Destacam-se dois gânglios: gânglio cervical superior (GCS) ou cervical cranial (GCC) e gânglio cervical inferior, geralmente fusionado aos primeiros gânglios torácicos (gânglio estrelado). Às vezes um gânglio mediano pode estar presente (BALJET; DRUKKER, 1979; HEDGER; WEBBER, 1976).

O conhecimento atual sobre a estrutura e função dos gânglios simpáticos é derivado principalmente de estudos histofisiológicos realizados nos gânglios cervicais craniais (GCC) em animais de laboratório devido ao seu grande tamanho, facilidade de acesso nestes animais e multiplicidade de seus órgãos alvos. Este gânglio tem sido escolhido devido a sua população celular distinta e funções bem definidas (DAIL; BARTON, 1983; FLEET; BELL, 1991).

Estudos relacionados à topografia funcional reportam que o GCC apresenta populações de neurônios especificamente direcionadas à inervação da pineal, íris, membrana nictante, músculo de Müller, glândula submandibular, tireóide, língua, mucosa oral, pele da face, pele da orelha e pele do pescoço (FLEET; BELL, 1991).

Além da abordagem sobre a população de neurônios do GCC, a microvascularização foi também investigada. As observações microscópicas revelaram que o GCC recebe sangue arterial proveniente de duas a três pequenas artérias do lado mediano da artéria carótida externa e pequenos ramos da artéria carótida comum. Outros estudos a respeito da microvascularização de gânglios simpáticos mostraram, em ratos senis e jovens, uma relação constante entre neurônios e micro vasos no GCC (BAKER et al., 1989; CHUNHABUNDIT et al., 1993).

Relatos da interação do GCC e seu território alvo demonstram controle sobre a mineralização óssea. O metabolismo ósseo é dependente das linhagens osteoblásticas e osteoclásticas, sendo esta última célula a principal responsável pela síntese e degradação do osteóide e subsequente desmineralização sofrendo influência de vários fatores locais ou sistêmico sendo o sistema nervoso autônomo um de seus fatores reguladores. O efeito da

ganglionectomia cervical unilateral em ratos sob a mineralização óssea e na densidade da mandíbula foi investigada demonstrando-se relação entre a simpatectomia deste gânglio e alterações qualitativas na modelagem e remodelagem do osso. (APPENZELLER, 1990; LADZIESKY et al., 2000)

Com relação à simpatectomia do gânglio cervical cranial (GCC), Soinila e Eranko (1983) afirmam que o GCC é um órgão simétrico permitindo-se submeter um dos gânglios a experimento enquanto o contra lateral pode ser mantido como controle.

Em estudo estereológico da substância negra em humanos, o número total de neurônios melanina-positivos e negativos foram estimados em 28 homens com idade entre 19 e 92 anos por meio do emprego de "disector" óptico. Encontrou-se significativo decréscimo no número total de neurônios melanina-positivos em função da idade, em contrapartida, considerou-se um achado inesperado a verificação do aumento de tamanho dos neurônios contendo melanina. Apesar de a literatura reportar a hipertrofia neuronal estando relacionada a um efeito do envelhecimento, ligado a degeneração e necrose da própria célula, os autores não descartam a possibilidade de a hipertrofia de algumas células nervosas estarem associados a um mecanismo compensatório da perda neuronal adjacente, uma vez que o déficit-motor comumente observado em idosos apresentar-se de natureza mais limitada em comparação com a quantidade de tecido neuronal perdido (CABELLO et al., 2002).

Alterações associadas à região cervical podem desencadear disfunções simpáticas generalizadas com a participação direta ou indireta do GCC em mamíferos humanos e não humanos. A ganglionectomia do GCC é uma técnica cirúrgica capaz de mimetizar síndromes na propositura de modelos para estudá-las.

Uma disfunção específica é a Síndrome de Horner representada por um grupo de sinais clínicos resultante na alteração da inervação simpática do olho e estruturas adjacentes. Estes sinais incluem anisocoria, enoftalmia e protrusão de terceira pálpebra, ptose e aumento da temperatura da face como resultado da vasodilatação periférica. Há relatos desta síndrome em

cães da raça Golden Retriever, entretanto os autores não confirmam haver uma maior predisposição racial. Não obstante, encontram-se relatos da síndrome de Horner em humanos causada por tumores benigno e maligno, representando 60% de casos. Outra condição associada à esta síndrome são as hemorragias que impedem a provisão vascular ao GCC (BELL et al., 2001; BOYDELL, 1995; SKARDA et al., 1985).

A espécie ovina foi contemplada neste projeto, pois sua criação no estado de São Paulo tem apresentado amplo desenvolvimento na exploração agroindustrial havendo, portanto, grande interesse no melhor entendimento do manejo produtivo e clínico dos animais. Apesar dos inúmeros estudos realizados nesta espécie, não são encontrados artigos detalhados descrevendo a inervação simpática de estruturas cefálicas. O GCC foi descrito em animais de laboratório como uma estrutura com amplo sítio de inervação simpática na cabeça e conhecido envolvimento no controle de vários órgãos. O conhecimento do número total de neurônios, sua plasticidade e distribuição ao longo do órgão e sob condições de sobrecarga metabólica proverão bases morfológicas para futuras pesquisas comparativas em neuroanatomia, neurofisiologia, neuroendocrinologia, além de promover dados substanciais para a neurologia clínica em animais de produção.

Portanto, este estudo visa estabelecer parâmetros macro e microestruturais do GCC na espécie ovina, bem como estimar o tamanho e o número total de neurônios no GCC em animais submetidos a sobrecarga funcional, determinada pela ganglionectomia unilateral, e correlacioná-los aos achados neuroclínicos visando fornecer subsídios à Neurologia Veterinária, especialmente no que tange ao diagnóstico e tratamento das simpatopatias como a síndrome de Horner.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Neste estudo, a simpatectomia unilateral do gânglio cervical cranial (GCC) avaliará comparativamente possíveis alterações morfoquantitativas decorrentes da ganglionectomia unilateral com conseqüente sobrecarga funcional do GCC remanescente, incluindo hipertrofia neuronal e modificação no número total de neurônios ganglionares.

Sendo assim, os seguintes aspectos serão avaliados comparativamente entre gânglios controle e tratados:

- 1) Morfologia geral de neurônios ganglionares.
- 2) Organização geral do tecido conjuntivo ganglionar.
- 3) Densidade neuronal.
- 4) Número total dos neurônios ganglionares.
- 5) Tamanho dos neurônios.

A clínica neurológica associada à simpatectomia será investigada visando:

- 6) O aparecimento de sintomas específicos relacionados à síndrome de Horner.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

A literatura consultada para embasamento científico é discriminada nesta seção dividida em capítulos pertinentes a cada item de relevância para a condução desta pesquisa.

3.1 LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO

O sistema nervoso simpático de ruminantes é escassamente descrito em tratados de anatomia veterinária quanto ao seu aspecto funcional. No intuito de prover informações para a exposição e exame do sistema nervoso simpático cervical encontrou-se na literatura pesquisa realizada sobre a abordagem cirúrgica lateral do GCC de ovinos utilizando-se nove cordeiros castrados (2-3 meses) (APPLETON; WAITES, 1957).

Macroscopicamente, estudos anatômicos foram desenvolvidos em camelos no qual se demonstrou o GCC como uma estrutura bem desenvolvida, com média de 15-20 mm em comprimento, 4-6 mm em largura e 3 mm de espessura, situado na superfície rostrolateral do músculo longo do pescoço, ventral ao músculo esterno-mastóideo e recoberto pela glândula salivar mandibular. Os ramos nervosos do GCC incluíram o nervo carótico interno que se dirigia em direção à bula timpânica formando o plexo carótico interno; o nervo carótico externo consistindo em dois ramos que terminavam junto ao seio carótico e o outro ramo se unia ao plexo carótico comum; e o nervo jugular, junto com algumas fibras que conectava o gânglio ao glossofaríngeo, vago, hipoglosso e primeiro nervos cervicais (SHENG et al., 1988).

Estudos em ratos, cães, felinos e eqüinos afirmaram que o GCC apresentava aparência

fusiforme situado dorsal à bifurcação da artéria carótida. Foram observadas algumas fibras nervosas deixando o gânglio e seguindo a artéria carótida interna e a artéria carótida externa (CASTRO, 2001; DE ABREU, 2002; FIORETTO, 2002; HEDGER; WEBER, 1976).

O GCC situava-se profundamente à bula timpânica e nervos cranianos IX, X, XI e XII. A maioria dos ramos ganglionares se ramifica ao deixar o GCC enviando ramos para as artérias carótida externa e interna, para o gânglio vagal inferior, o nervo laríngeo superior e para os nervos cervicais, além de prover os ramos cardíacos e tireóideos. Em humanos, anormalidades simpáticas funcionais a partir de injúrias no nervo de laríngeo superior durante cirurgia da tiróide foram descritas. Não obstante, uma complexa arborização é descrita em humanos e está presente entre o gânglio cervical inferior do nervo vago e o GCC (BRAUEUCKER, 1923; CANNIZZARO et al., 1991; FICK, 1926; HOFFMAN, 1957; SIWE, 1931; STROMBERG, 1993; ZERILLI et al., 1994).

Historicamente o GCC tem sido objeto de estudo, pois é usado como modelo de investigação de problemas neurobiológicos. Por meio da implantação de neurotraçadores em ratos foram estudadas as características das fibras pós-ganglionares do GCC projetada às glândulas submandibular, olhos e glândula pineal. Nas áreas medianas do gânglio os corpos de neurônios que se projetavam à glândula submandibular eram maiores, os projetados ao olho eram menores e à glândula pineal tinham tamanho intermediário. Os neurônios que se projetavam à glândula submandibular foram achados ao longo do gânglio, enquanto foram localizadas populações que se projetavam ao olho e pineal apenas nos quadrantes rostrais (LUEBKE; WRIGHT, 1992).

Quanto ao território de inervação foi referido que o gânglio cervical cranial provê inervação a pineal por meio do nervo carótico interno, e para a tiróide e paratireóide pelo nervo carótico externo. Após ganglionectomia cervical superior acompanhou-se depressão de LH, FSH, TSH, GH e aumento em ATCH e prolactina. Os autores afirmaram que o GCC por meio dos nervos caróticos age como caminho paralelo de comunicação do cérebro com o

sistema endócrino (CARDINALI; STERN, 1994; KENNY, 1961).

A artéria tireóidea superior foi suprida por ramos provindos do GCC, enquanto a glândula tireóidea foi inervada por um ramo distinto do nervo laríngeo externo, assim sendo, encontram-se muitos relatos do risco de dano nervoso durante o tratamento cirúrgico para carcinoma da tiróide e durante linfadenectomia cervical, particularmente na inervação da laringe (JONES et al., 1994; SUGENOYA et al., 1993). Outro exemplo da complexidade do território de inervação do GCC foi descrito entre o mesmo e o nervo vago sendo um exemplo raro de comunicação presente em 113 cadáveres de indivíduos adultos da raça japonesa (SATO; SATO; 1997).

3.2 MICROESTRUTURA E ULTRAESTRUTURA

Por meio de estudos realizados em microscopia de luz em diversas espécies como em caninos, felinos e eqüinos, descreveu-se que o gânglio cervical cranial (GCC) é composto em seu interior por agrupamentos de corpos de neurônios, delimitados por septos de tecido conjuntivo emitidos pela cápsula ganglionar, caracterizando-o como um complexo ganglionar arranjado em "lojas". No interior do GCC ainda relatou-se a presença de outras células, tais como as células intensamente fluorescentes (SIF) ou células contendo grânulos, células de Schwann, fibroblastos, alguns mastócitos e estruturas como fibras mielínicas e amielínicas (CASTRO, 2001; DE ABREU, 2002; FIORETTO, 2002).

As células contendo grânulos presentes no GCC foram examinadas à microscopia de luz e eletrônica. Descreveram-se estas células distribuídas espaçadamente, em agrupamentos pequenos de cerca de 2-5 células envoltos por células satélites e de disposição pericapilar. Evidências sugeriram que estas células continham catecolaminas, provavelmente noradrenalina ou análogos a dopamina. As células contendo grânulos podiam ser classificadas como inter-neurônios que recebiam impulsos das fibras pré-ganglionares e transmitiam aos pequenos nervos ao longo do gânglio (WILLIAMS; PALEY, 1969).

Baseado nos critérios morfológicos estabelecidos para sinapses, as células SIF foram consideradas como pós-sinápticas em sinapses do tipo 1 e pré-sináptica em sinapses do tipo 2, correspondendo-se a sinapses aferente e eferente, respectivamente (MATTHEWS; RAISMAN, 1969; PAPPAS; WAXMAN, 1972; SIEGRIST et al., 1968; e YOKOTA, 1973).

Experimentos realizados no GCC revelaram a predominância de sinapses do tipo 2 entre axônios e células SIF, sendo apenas algumas observações discriminadas entre dendritos e células SIF. Sinapses do tipo 1 ocorreram em um número pequeno de axônios que também

continham sinapses do tipo 2. Assim, alguns segmentos de um axônio eram pré-sinápticos às células SIF e outros segmentos eram pós-sinápticos. Como um único axônio formou predominantemente sinapses tipo 2 com muitas células SIF nos GCC e nodoso afirmou-se que a direção principal de transmissão foi das células SIF em direção aos axônios (KONDO, 1977).

Duas possíveis explicações foram tomadas para a origem dos axônios reconstruídos no GCC. Uma de origem extra ganglionar advinda dos axônios no tronco simpático cervical que alcançaram o gânglio. Outra de origem intra-ganglionar provinda de axônios colaterais recorrentes de células ganglionares. A separação do tronco pré-ganglionar resultou em degeneração da maioria dos perfis neuronais justapostos às células SIF (MATTHEWS; OSTBERG, 1973). Então, seria possível que estes axônios originavam-se dos presentes no tronco pré-ganglionar. Isto sugeriu que alguns axônios no tronco podem conduzir impulsos sensitivos das células SIF. Uma interpretação semelhante tinha sido apresentada após resultados obtidos em estudos fisiológicos (RIKER; SZRENIAWSKI, 1959; VOLLE; KOELLE, 1961).

Experimentos demonstraram que gânglios simpáticos continham dois derivados adrenérgicos da crista neural: neurônios principais e pequenas células intensamente fluorescentes (SIF). Os mecanismos de desenvolvimento responsável para a geração destas duas células in vivo não foram bem determinados. O possível desenvolvimento e relações de linhagem diferenciando neurônios principais e células SIF foram investigadas sob microscopia de luz, empregando-se técnicas de fluorescência por meio de anticorpos contra tirosina hidroxilase (TH) e histofluorescência à catecolamina, a investigação combinou ainda exames ultraestruturais do GCC em período embrionário e pós-natal. Quase todas as células intensamente fluorescentes observadas foram encontradas justapostas à capilares dentro do gânglio. Estas células embrionárias intensamente fluorescentes foram maiores do que as células SIF observadas no pós-natal. Exame ultraestrutural dos gânglios em desenvolvimento

confirmou que as células contendo numerosas e grandes vesículas denso-coradas (LDCVS) era uma característica proeminente dos gânglios que também continham células intensamente fluorescentes. Além disso, algumas células embrionárias que contêm LDCVS eram mitóticas. Subseqüentemente, células similares às células SIF maduras localizavam-se próximo a vasos sanguíneos onde podiam receber outros sinais como glicocorticóides. Este esquema sugeriu ser a diferenciação de neurônios principais e células SIF regulada independentemente, e que a habilidade de células SIF para converter-se em neurônios principais observada in vitro pode não responder pela geração de neurônios in vivo (HALL; LANDIS, 1991).

3.3 REMOCÃO EXPERIMENTAL DE GÂNGLIOS SIMPÁTICOS (GANGLIONECTOMIA E SUAS ALTERAÇÕES)

As técnicas da ganglionectomia unilateral ou bilateral do GCC (gânglio cervical cranial) são aplicadas, em sua maior parte em animais de laboratório, para estudos da atuação do controle do sistema nervoso autônomo sobre os órgãos alvo ou para avaliar o comportamento do próprio gânglio contralateral remanescente.

A ganglionectomia unilateral do GCC e técnica de "sham operation" foram realizadas em ratos no intuito de se avaliar os efeitos da divisão pré-ganglionar do nervo sobre o peso do gânglio, sobre o volume, o número e a densidade celular de neurônios principais e células não neuronais. A divisão pré-ganglionar unilateral do nervo causou, no lado esquerdo operado; uma perda significativa de peso e volume do gânglio devido à diminuição no número de células não neuronais, enquanto nenhuma mudança significativa aconteceu no gânglio intacto direito. A ganglionectomia unilateral esquerda causou aumento significativo no peso, no número e densidade das células não neuronais no gânglio contralateral, porém o número e a densidade das células de neurônios principais e as células intensamente fluorescentes não eram afetadas pela operação. Os achados sugeriram que o desenvolvimento normal das células satélites ganglionares requer a presença normal da inervação. Além disso, a ganglionectomia unilateral induziu maior proliferação de células satélite contralateralmente, possivelmente causando aumento na atividade do gânglio contralateral (SOINILA; ERÁNKO, 1983).

Apesar dos numerosos estudos em várias espécies, o papel fisiológico dos nervos simpáticos na acomodação e dinâmica do humor aquoso em primatas permanece obscuro. A ganglionectomia unilateral do gânglio cervical cranial no macaco induziu parcial, mas não

completa denervação simpática ocular avaliada por meio de microscopia eletrônica, imunohistoquímica (tirosina hidroxilase) e reações de fluorescência a catecolamina. Com base em critérios clínicos, farmacológicos, e morfológicos a ganglionectomia diminuiu, mas não eliminou uniformemente a inervação pós-ganglionar simpática do olho. Provavelmente alguns neurônios do GCC permaneceram no coto proximal do tronco simpático, ou o olho de macaco "cynomolgus" recebe inervação simpática adicional do contralateral, ou a porção anterior do olho do macaco "cynomolgus" recebe inervação simpática adicional de fontes diferentes do gânglio cervical superior (HUBBARD et al., 1999; ROBINSON; KAUFMAN, 1992; TAMM et al., 1997).

Estudos prévios indicaram que a simpatectomia regional do GCC conduziu à alterações qualitativas relacionadas à absorção óssea. Após a ganglionectomia unilateral, o peso da mandíbula ipsilateral aumentou, e sua densidade mineral diminuiu. Este efeito foi presumivelmente dependente da privação crônica de neurotransmissores adrenérgicos em nível local. Resumindo, a modelação e remodelação óssea são processos altamente regulados no esqueleto de mamíferos. A perda do controle deste processo pode conduzir a várias doenças ósseas (por exemplo, osteogênese imperfeita). Um possível mecanismo para tal controle delicado estaria relacionado à inervação simpática presente em todo periósteo (LADZIESKY et al., 2000).

O homotransplante do gânglio pélvico para a parede da bexiga foi realizado em ratos adultos a fim de investigar a capacidade regenerativa dos neurônios autônomos periféricos numa eventual perda neuronal buscando testar a habilidade de crescimento dos axônios em nervos diferentes ou de formar novas sinapses com neurônios diferentes. O gânglio pélvico direito transplantado para a bexiga foi avaliado com dois dias, uma semana, cinco semanas, sete semanas, dois meses e quatro meses após a cirurgia. Observou-se que o homotransplante dos neurônios pélvicos para a bexiga obteve alta taxa de sucesso, em termos de sobrevivência manutenção da estrutura, crescimento, re-conexão, transmissão neural além de exibirem

habilidades regenerativas (GABELLA; UVELLIUS, 1998).

Paresia óculo-simpática ou síndrome de Horner é o resultado de qualquer lesão que interrompa a neurotransmissão do hipotálamo para o olho. A síndrome consiste em miose, ptose, enoftalmia aparente, anidrose, e dilatação vascular ipsilateral à lesão. A inervação simpática do olho consiste num sistema tri-ordenado. O neurônio de primeira-ordem originado nos núcleos póstero-lateral do hipotálamo. As fibras de segunda-ordem saem da coluna pelas raízes ventrais de C8, T1, e T2 e ascendem no tronco simpático. O curso das fibras segue pelos primeiro gânglio torácico e cervical inferior que freqüentemente apresentam-se fundidos formando o gânglio estrelado. Os neurônios de segunda-ordem continuam pela alça subclávia, e terminam no GCC. Os neurônios de terceira-ordem saem do GCC e ascendem ao longo do curso das artérias carótida interna e externa. Ramos oftálmicos entram na fissura orbital superior e inervam o músculo elevador da pálpebra superior e o músculo dilatador da pupila (GHAFIR, Y.; ART, T.; LEKEUX, P. 1996; KISCH, 1951).

Entre as possíveis etiologias de síndrome de Horner em pacientes humanos estão os tumores malignos (câncer broncogênico, linfoma de Hodkin, câncer de tiróide, sarcoma, metástases); tumores benignos (Schwannoma, tumor de corpo carotídeo, adenoma de tiróide); vascular (cefaléia, enxaqueca, arterite, dissecação da artéria carótida); infeccioso (Doença de Lyme, herpes); traumático (danos por objetos penetrantes no pescoço, deslocamento da coluna cervical, trauma ao nascimento); iatrogênico (tubo de toracotomia, acesso venoso central, tireoidectomia e angiografia da artéria carótida). Com a exceção de "bypass" da artéria coronária e procedimentos que envolvam o rompimento intencional do gânglio estrelado, a síndrome de Homer é uma complicação rara secundária ao tratamento cirúrgico. A diversidade de resultados físicos, embora patognomônicos, pode estar clinicamente oculto e a persistência da paresia óculo-simpática poderia ser variável, não obstante, declarou-se que se faz necessário à observação de danos de inervação simpática seguidos de disfunções do pescoço (BELL et al., 2001).

3.4 ESTUDOS MORFOMÉTRICO E ESTEREOLÓGICO

A estimativa do número de neurônios no GCC de ratos foi calculada e processada pelos métodos de correção de Abercrombie (1946) indicando estabilidade da população neuronal no primeiro mês (neonatal) em cerca de 35000 neurônios e de correção de Hendry (1976) demonstrando aumentos de menos de 20000 à 45000 neurônios na primeira semana mantidos até o fim do estudo. Prévios estudos histoquímicos indicaram que havia pequena ou nenhuma degeneração celular durante o 1º mês de vida (DAVIES, 1978).

Neurônios e células da glia do GCC de ovinos foram estudados morfometricamente à microscopia de luz e eletrônica. Foram utilizados dois carneiros com cerca de 40 kg e constatou-se que a área do corpo celular variava entre 165 a 2500 μm^2 com diâmetro correspondente de 14-56 μm e volume celular de 1600 a 93000 μm^3 . A distribuição do tamanho das células apresentou-se de modo uniforme com predominância de células pequenas, não havendo variações nas diferentes porções do gânglio (GABELLA et al., 1988).

O número total de neurônios e células da glia em pacientes esquizofrênicos e controle foram estimados com o emprego de técnicas estereológicas aleatórias e não seletivas ("unbiased"): "disector" e "fractionator". Neste estudo, os autores demonstram que as técnicas estereológicas empregadas podem estimar de maneira correta o número de partículas de interesse rapidamente e de forma mais acurada em contradição às técnicas seletivas ("biased") aplicadas até àquele momento e descritas na literatura (PAKKENBERG; GUNDERSEN, 1988).

O uso de contagem por meio da técnica estereológica do "fractionator" foi efetuado para a estimativa do número de células de Purkinje a partir do peso cerebelar. Reportou-se que para a obtenção da estimativa do número total de células de Purkinje ou qualquer outra

célula dever-se-ia empregar uma amostragem tridimensional, ou seja, pela verificação volumétrica. A literatura define que não é possível efetivar-se uma amostragem apenas no plano bidimensional sem haver a interferência ou seletividade ("bias") de alguns parâmetros como tamanho da partícula, forma, orientação no espaço, efeitos do corte e distorções de processamento (CRUZ-ORIVE, 1987; GUNDERSEN, 1986; MAYHEW, 1991b). A maior eficiência nos métodos de pares paralelos de cortes ("disector", "fractionator") já havia sido previamente discutida, pois são métodos independentes de qualquer tipo de seletividade de parâmetros ("bias") quanto a forma, tamanho e, ou distribuição das partículas (STERIO, 1984; GUNDERSEN, 1986; MAYHEW, 1991b). A relação do número total de neurônios em função do peso cerebelar fora obtido por meio aplicação da fórmula de regressão linear determinada pela equação $N = 68600W^{0,695}$, pela qual pode-se determinar o número total de células de Purkinje em outras espécies conhecendo-se o peso cerebelar, entretanto o autor afirma a necessidade de reaplicação do método em outras espécies (MAYHEW, 1991a).

A hipertrofia neuronal no gânglio pélvico de ratos foi estudada quantitativamente com base em 250 a 400 secções consecutivas com 1 μ m de espessura. As secções foram fotografadas e o perfil neuronal foi mensurado. O volume neuronal aumentou em média 83%, os neurônios menores diminuíram e os maiores aumentaram (GABELLA et al., 1992).

Estudos morfométricos avaliaram os efeitos da descentralização ou da ganglionectomia contralateral na hipertrofia do gânglio pélvico induzida por obstrução da bexiga urinária de ratos. O volume dos neurônios foi estimado presumindo-se que os neurônios apresentavam forma esférica. Os resultados revelaram que a ganglionectomia em si não induziu hipertrofia na bexiga, com havia sido reportado por Gabella et al. (1992). A ganglionectomia do gânglio pélvico foi seguida de redução da inervação da bexiga de aproximadamente de 75% ipsilateral e 25% contralateral. Não foram observadas evidências de células nervosas em divisão ou degeneração e observou-se mitose de células da glia (GABELLA; UVELLIUS, 1993).

No estudo do homotransplante do gânglio pélvico para a parede da bexiga em ratos adultos, analisaram-se os resultados no segundo dia, uma semana, três semanas, cinco semanas e quatro meses de pós-operatório. Em dois dias havia presença de neurônios distendidos com perfil nuclear medindo em tomo de $466 \mu\text{m}^2$ e em três semanas perfis de $327 \mu\text{m}^2$. Ultraestruturalmente, os neurônios apresentavam-se idênticos ao grupo controle. Uma semana após a cirurgia, os neurônios não estavam mais distendidos e a maioria tinha similaridade em tamanho ao grupo controle, porém um pequeno grupo de neurônios demonstrava sinais avançados de degeneração. Em geral, a arquitetura original do gânglio manteve-se preservada com dois a quatro meses após a cirurgia e o neurópilo foi composto por inúmeros axônios pequenos com aproximadamente $0,3$ a $0,9 \mu\text{m}$ de diâmetro. Alterações de regressão de alguns neurônios na porção mais profunda do gânglio foram observadas nos primeiros dias, entretanto, estes mesmos sinais de degeneração tomavam-se raros ao longo do desenvolvimento. O experimento demonstrou sucesso quanto à sobrevivência neuronal, a revascularização do gânglio e a manutenção da estrutura neuronal (GABELLA; UVELLIUS, 1998).

Em extenso trabalho de revisão sobre as técnicas estereológicas uniformemente aleatórias aplicadas à quantificação de neurônios do gânglio da raiz dorsal e estudo de tamanho e sobrevivência celular definiram que a estimativa do número de células baseia-se centralmente no princípio do "disector" (STERIO, 1984) sendo óptico ou físico e para a amostragem do material pode-se utilizar o método "fractionator". O autor afirma que até o momento, nenhum estudo foi capaz de demonstrar diferenças antiméricas quanto à quantificação do número de neurônios do gânglio dorsal. A escolha de um antímero como controle de seu contralateral é possível, visto ser a variação antimérica menor que a variação entre animais (TANDRUP, 2004).

A estimativa do número total de neurônios do GCS foi reportada em três espécies: o rato, a capivara e o cavalo. Os resultados obtidos usando o princípio do "disector" físico

associado ao método de Cavalieri, demonstrou 18.800, 1.520.000 e 3.390.000 neurônios no GCS de ratos, capivaras e eqüinos, respectivamente (RIBEIRO et al., 2004).

Materiais e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado e os métodos empregados nesta investigação são descritos neste capítulo.

4.1 MATERIAIS

Nove ovinos, machos com 4 meses de idade e peso médio de 15 kg da raça Santa Inês e obtidos junto ao plantel particular em associação ao Departamento de Cirurgia e Anestesiologia da Univesidade Estadual Paulista, *campus* Botucatu, foram utilizados neste estudo.

Estes animais foram divididos em três grupos distintos em relação ao tempo de avaliação: Grupo I - 3 animais - duas semanas após o procedimento cirúrgico; Grupo II - 3 animais - sete semanas após o procedimento cirúrgico e Grupo III - 3 animais - doze semanas após o procedimento cirúrgico.

4.2 MÉTODOS

Os métodos empregados nesta investigação são descritos em itens separados para melhor compreensão das etapas efetuadas em cada fase pertinente da pesquisa.

4.2.1. Anatomia Macroscópica

O estudo macroscópico está descrito em itens separados visando um melhor entendimento da pesquisa.

4.2.1.1 Estudo piloto

O estudo piloto foi realizado empregando-se 4 animais, 4 meses de idade, com peso variando de 14 kg a 17 kg (peso médio 15,5 kg) visando a padronização da técnica cirúrgica, anestésica e pós-operatória. Uma vez determinada a melhor abordagem cirúrgica e as terapias adotou-se como padrão em todos os grupos subseqüentes.

4.2.1.2 Técnica Operatória

Em um primeiro momento, os animais foram submetidos a procedimento anestésico para a coleta do gânglio cervical cranial (GCC) esquerdo (ganglionectomia unilateral) que serviu como controle. Depois de duas (grupo I), sete (grupo II) ou doze semanas (grupo III) após este primeiro procedimento, os animais foram eutanasiados para a coleta do gânglio contralateral remanescente que foi identificado nos resultados como gânglio operado.

Como medicação pré-anestésica utilizou-se associação de Acepromazina 0,2% (0,1 mg/kg) e Tartarato de butorfanol 1% (0,3 mg/kg) aplicados via intramuscular. Aguardado o tempo de relaxamento do animal procedemos à administração intravenosa de Hidrocloridrato de ketamina 10% e diazepam 0,5% associadas na proporção 1:1 perfazendo dose 0,15 ml/kg como medicação de indução anestésica. O animal foi entubado, com sonda endotraqueal e a manutenção anestésica promovida com a utilização de Halotano e ventilação assistida.

A abordagem da região cervical foi promovida por cuidadosa dissecação cirúrgica. Para o estudo macroscópico, optou-se pelo acesso ventro-lateral, sendo a incisão realizada na pele desde o 1/3 proximal do ramo da mandíbula até a base da orelha externa.

Depois da incisão da pele, seguiu-se a divulsão do tecido subcutâneo, expondo o músculo platisma. Em um plano médio de dissecação identificou-se a veia jugular externa, tecido adiposo e glândula parótida. No plano profundo de dissecação, após o afastamento da veia jugular externa, foi possível identificar a bainha carotídea. Acompanhando-se a bainha carotídea em direção a porção proximal do pescoço, próximo à base da orelha, identificou-se o músculo júbulo-hióide e porção final do osso epihióide que recobriam a bainha carotídea. Promoveu-se então a incisão do músculo e afastamento do osso epihióide, revelando-se o gânglio cervical cranial (GCC). Após a coleta, os gânglios foram medidos com base em seu

eixo longo (comprimento), eixo curto (largura) e eixo de profundidade (espessura) usando-se um paquímetro eletrônico digital (Digimess®).

A recuperação clínica e o período pós-operatório foram conduzidos por meio de aplicação de medicação antibiótica, Ampicilina Benzatina 500mg - 20mg/kg - IM por 5 dias, antiinflamatória Fluxinin meglumine (Banamine®) - 0,5mg/kg por 3 dias e analgésica utilizando-se de Dipirona sódica (Vetalgin®) - 5ml - IM por 3 dias. Os animais foram mantidos em baias para o acompanhamento da evolução dos sinais clínicos.

4.2.2 Estudo clínico

Os seguintes sinais clínicos foram avaliados, temperatura da face, temperatura de orelha, ocorrência de ptose e miose. Quando algum destes sinais clínicos esteve alterado, foi então avaliada a sua intensidade por meio de "+" (cruzes) e o símbolo "N" foi utilizado para representar o estado normal do animal. A sudorese do plano nasal foi representada por "P" quando presente e pelo sinal "-" (negativo) quando ausente.

A avaliação da ptose foi documentada em um animal por meio da colocação, em programa de computador Photoshop CS®, de duas barras amarelas sobre os olhos direito e esquerdo estendendo-se do ponto mais côncavo da conjuntiva pálpebra inferior para a superior. A miose foi avaliada de modo visual em todos os animais. A documentação fotográfica deste resultado clínico foi realizada em ambiente com baixa luminosidade, uma vez que a diferença torna-se pouco perceptível quando o diâmetro pupilar é avaliado em ambiente com luminosidade normal, devido à interferência do reflexo pupilar em resposta a luz ambiente tornando a diferença no tamanho pupilar quase imperceptível.

Para a padronização da nomenclatura anatômica das estruturas anatômicas descritivas empregou-se, sempre que possível, os termos preconizados pelo International Committee On

Veterinary Gross Anatomical Nomenclature (2005) por meio da Nômina Anatômica,
Histológica e Embriológica Veterinária.

4.2.3 Microscopia de luz de cortes semi-finos

Foram feitos dois procedimentos distintos no que tange à fixação dos gânglios dos animais em função do ato cirúrgico e suas peculiaridades.

Os gânglios coletados no momento cirúrgico (ganglionectomia) foram fixados por meio de imersão em solução de glutaraldeído 5% e formoldeído 1% (solução de Karnovsky modificada) em solução tampão cacodilato de sódio (pH 7,4) (0,125M). Os gânglios coletados após a eutanásia do animal foram submetidos à lavagem dos circuitos arterial e venoso com solução específica de lavagem (solução de tampão fosfato salina e heparina a 1%) e perfundidos com solução de Karnovsky modificado à temperatura de 15°C utilizando-se a artéria carótida comum direita. Depois de retirados do animal, estes gânglios permaneceram imersos na mesma solução fixadora.

Para o processamento histológico, o material foi lavado em solução tampão cacodilato de sódio. Os segmentos foram acondicionados em frascos escuros, protegidos da luz e pós-fixados com solução de tetróxido de ósmio 2% (Sigma®) por 90 minutos à temperatura ambiente. O material sofreu segunda lavagem em tampão cacodilato de sódio e água destilada por três vezes durante um tempo máximo de trinta minutos e foi contrastado com solução aquosa saturada de acetato de uranila (Reagen®) por 90 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

A desidratação do material foi realizada em série crescente de etanóis (50%, 70%, 80%, 90%, 95% durante dez minutos cada) e duas trocas em álcool absoluto durante 10 minutos cada. Na etapa final da desidratação, os espécimes foram imersos em óxido de propileno (Aldrich®) (duas etapas de cinco minutos cada) e então embebidos em solução de óxido de propileno e Resina Araldite 502 (Polyscience Inc®), na proporção 9:1, e mantido sobre

agitação constante por 10 minutos. O material foi então colocado em óxido de propileno e resina araldite (1:1) por 1 hora sob agitação constante, seguindo-se a troca de concentração de óxido propileno e resina araldite na proporção (1:9) mantidos sob mesma condição por 12 horas e resina araldite pura por 8 horas. A seguir, o material foi colocado em nova solução pura de Araldite por 12 horas e finalmente em nova resina pura por 2 a 3 dias em estufa (60° a 70°C).

Depois da trimagem do bloco, o material foi cortado usando o ultramicrótomo Leica® Ultracut UCT, com navalha de vidro para a microscopia de luz (2 µm) (cortes semi-finos). Os cortes foram secos em placa térmica (Leica®) e corados com solução de azul de toluidina alcoólica 1 %. A montagem das lâminas foi feita com a aplicação de camada fina de resina araldite sob lamínula.

4.2.4 Estudo estereológico

Os métodos quantitativos empregados no estudo estereológico são descritos a seguir.

4.2.4.1 Estimativa do número total de neurônios ganglionares obtida pelo método "Physical Fractionator"

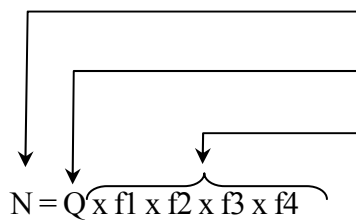
O embasamento teórico no que tange ao método do "Physical Fractionator" pode ser depreendido a partir de Coggeshall e Lekan (1996), Gundersen et al., (1988); Howard e Reed (2004), Mayhew (1988), Mayhew (1991b), e Mayhew e Gundersen (1996).

Para o grupo I, os gânglios foram cortados transversalmente formando uma série de fragmentos que foram considerados sistematicamente, uniforme e aleatoriamente a uma fração ($f_1=1/2$) entre eles. O primeiro fragmento foi seccionado ortogonalmente fornecendo assim um número de fragmentos menores que foram novamente escolhidos sistematicamente examinando-se uma fração determinada ($f_2=1/2$). Os fragmentos selecionados foram seccionados mais uma vez seguindo-se a mesma regra utilizada e novos fragmentos menores foram obtidos e selecionados a uma fração ($f_3=1/3$). Devido ao extenso número de blocos embebidos obtidos, estabeleceu-se um fracionamento f_4 igual a $1/2$ e o primeiro bloco foi escolhido aleatoriamente entre 1 e 2. Posteriormente estabeleceu-se uma quinta fração f_5 igual a $1/150$ selecionada para a contagem via "fractionator".

Para o grupo II aplicou-se os fracionamentos acima descrito, sendo que posteriormente à fração f_5 , numerosas lâminas foram obtidas e uma fração f_6 igual a $1/2$ foi empregada para selecionar as lâminas que participariam da amostragem. Para o grupo III aplicou-se os

fracionamentos f1, f2, f3 e f4 descritos para o grupo I.

O procedimento do "physical fractionator" implica na contagem dos perfis neuronais (Q^+) (transects), o qual foi obtido por meio da aplicação do método do disector físico (STERIO, 1984) A fórmula do "fractionator" empregada foi:

$$N = Q \times f_1 \times f_2 \times f_3 \times f_4$$


N = número total de neurônios ganglionares
Q^+ = número total de perfis neuronais contados
f = fracionamentos considerados no esquema de amostragem (f1, f2, f3 e f4)

4.2.4.2 Estimativa da densidade numérica (N_V) pelo método do "Two way physical Disector"

Para um suporte metodológico vide Howard e Reed (2004), Mayhew e Gundersen (1996), Pakkenberg e Gundersen (1988), Pover e Coggeshall (1991).

Para a quantificação dos perfis neuronais, os blocos de material pré-selecionados foram cortados seriadamente com dois micrômetros e foram coletados um total de 30 (trinta) cortes que foram a seguir montados em lâminas cobertas com lamínula. A seguir, escolheu-se um intervalo $k = 250$ que determina a distância entre as "reference-section" e a escolha da primeira "reference-section" foi determinada sistemática e aleatoriamente entre 1-250.

Duas secções idênticas - "reference" e "look up", separadas $12 \mu\text{m}$ entre si foram analisadas por meio de uma área pré-determinada por um sistema-teste colocado sobre a tela de um computador. O sistema teste adotado para o gânglio controle contava com seis quadros com $4979,68 \mu\text{m}^2$ cada, enquanto, o sistema teste aplicado para o gânglio tratado contava com oito quadros com mesmo tamanho. O sistema teste adotado em ambos os casos era sobreposto a imagem capturada pelo software de análise de imagem Leica QWin (Leica Microsystem Imaging Solution Ltd, Cambridge, UK), na tela de um computador.

Nas duas secções analisadas, foram identificados os mesmos neurônios ganglionares e, considerando-se apenas uma das secções, no caso a "reference section" foram contados os neurônios (Q) que estavam presentes na mesma e não apareciam na outra secção analisada (Q-). Para um exemplo numérico, determinou-se aleatoriamente, segundo tabela de números aleatórios, que a secção de número 17 seria considerada como a primeira "reference-section" do primeiro "disector", sendo a sua "look up" a secção 23 (destaca-se que a distância entre a "reference-section" e a sua "look-up section" era de $12 \mu\text{m}$). Como incremento empregou-se

o método "two-way disector", sendo agora a secção 23 considerada como a "reference section" e a 17 como a "look-up". O próximo "disector" a ser considerado foi o 267-273, aplicando-se o intervalo k de maneira sistemática e uniforme até o término do bloco. O número de "disectors" aplicados nos gânglios controle e operados e seus respectivos números de perfis neuronais (Q̄) encontrados para cada animal são descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Representação do número de "disectors" e numero total de perfis neuronais encontrados em cada animal de cada grupo – São Paulo, 2006

Animais		Grupo								
		I			II			III		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Gânglio Controle	Disectors	272	240	304	224	144	128	132	252	216
	Q̄	126	115	109	68	37	37	50	72	100
Gânglio Operado	Disectors	252	240	168	132	96	96	320	384	320
	Q̄	161	149	110	70	41	43	49	71	82

O método do "disector" forneceu a densidade numérica que é a razão entre o número total de partículas, em nosso caso, neurônios do GCC, e o volume referencia total e foi determinada pela fórmula:

$$N_v = \frac{\sum Q̄}{\sum t \times a}$$

←

←

←

Q̄ - quantidade de perfis (transects)
t – altura do "disector"
a – área teste utilizada
t x a – volume de cada "disector"

O coeficiente de erro empregado para o número total de neurônios foi estimado pela seguinte fórmula: $CE = 1/\sqrt{\sum Q̄}$ e o coeficiente de variação intra-grupo foi expresso pela fórmula $CV = \text{Desvio padrão} / \text{média}$. A precisão das estimativas em cada animal é indicada pelo coeficiente do erro (CE).

4.2.4.3 Estimativa global do volume neuronal

A estimativa global do volume de cada neurônio foi obtida pelo n Princípio de Cavalieri (RIBEIRO, et al., 2004). A somatória das áreas seccionas do perfil neuronal foi multiplicado pela espessura média do corte histológico, ou seja, 2 μ m empregando-se a fórmula $V = T \times \sum A$, onde V = volume, T = distancia entre as secções e $\sum A$ = somatória das áreas seccionais. O coeficiente de erro (CE) para a estimativa do volume neuronal, foi obtido empregando-se a seguinte fórmula: $\{(1 / \sum A) \times [1/12 \times (3A - 4B + C)]\}$ e o coeficiente de variação intra-grupo foi expresso pela fórmula $CV = \text{Desvio padrão} / \text{média}$. A precisão de estimativas individuais é indicada pelo coeficiente do erro (CE).

4.2.5 Estudo Morfométrico (Tamanho dos neurônios ganglionares)

O estudo morfométrico está apresentado em itens como se segue.

4.2.5.1 Área Seccional do corpo celular e núcleo neuronal

As secções seriadas, cada uma com espessura de 2 μm (micrômetros) obtidas para a aplicação dos métodos estereológicos foram igualmente consideradas para a morfometria. Adotou-se como início a mesma secção de referência utilizada para o disector, ou seja, a secção 17, assim aplicou-se um plano de exclusão tridimensional superior de 2 cortes, no intuito de aumentar a eficiência da amostragem. Deste modo considerou-se o corte 19 para o início dos trabalhos morfométricos. A mesma área teste aplicada anteriormente no método do "two-way disector" em cada gânglio foi reaplicada neste nível a fim de se obter os perfis neuronais que seriam considerados e outros que seriam descartados, respeitando-se as regras de inclusão e exclusão.

Os seguintes parâmetros foram analisados em cada neurônio ganglionar: áreas seccional neuronal e nuclear. Para esta finalidade utilizamos o software de processamento e análise de imagem Leica[®] QWin (Leica Microsystem Imaging Solution Ltd, Cambridge, UK).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros morfoquantitativos, morfométricos (área seccional do corpo celular e do núcleo) e estereológicos (volume neuronal, densidade neuronal e número total de neurônios) foram analisados por meio do teste de F (ANOVA “two way cross-classification”). No caso de valores significativos estes foram submetidos ao teste t de Student (SAS, 2005).

Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados encontrados nesta pesquisa são discorridos em tópicos.

5.1. ANATOMIA MACROSCÓPICA E TECNICA CIRÚRGICA

Nos nove animais submetidos à ganglionectomia unilateral do gânglio cervical cranial (FIGURA 1), este localizava-se na região mais proximal do pescoço, ventralmente ao nervo vago e a artéria carótida interna. Dados referentes à macromorfometria do GCC controle e operado são descritos na Tabela 2.

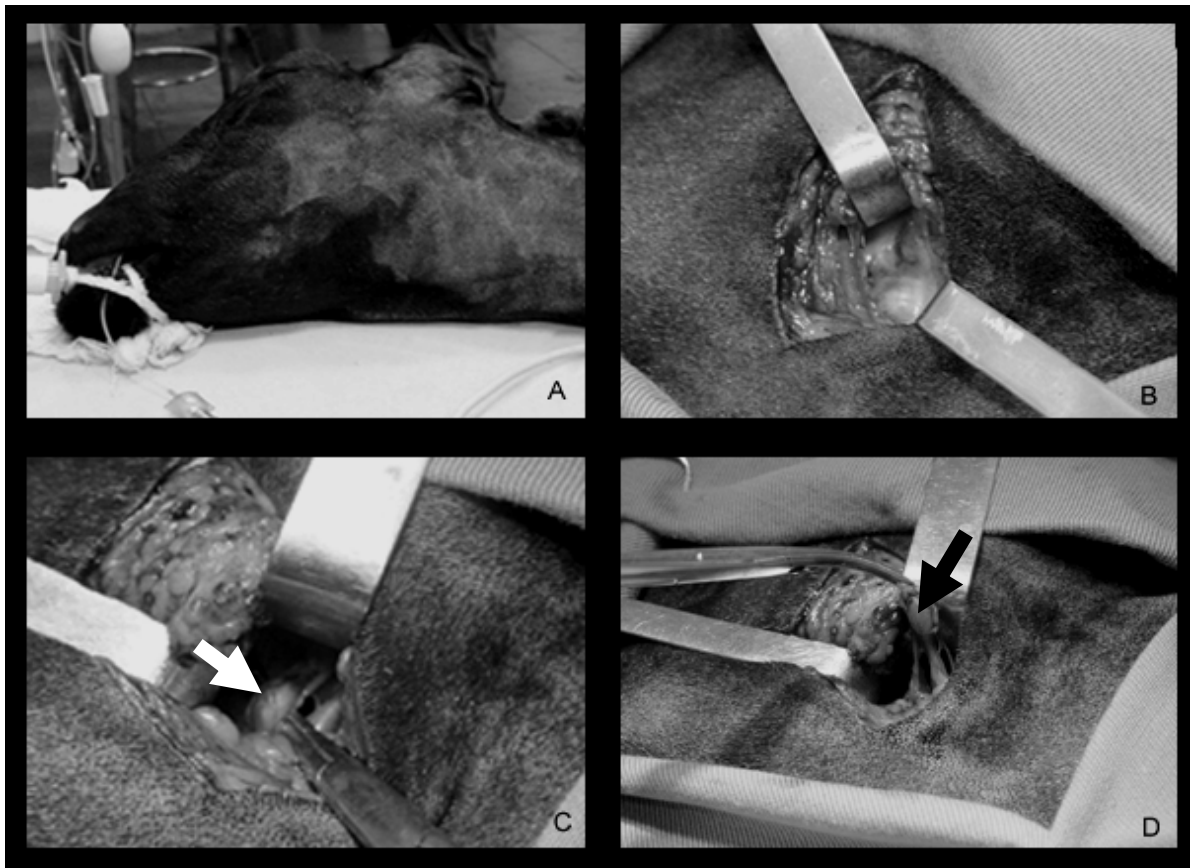


Figura 1 – Fotomacrografias seqüenciais representando as etapas da ganglionectomia unilateral esquerda do GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino. Em A observa-se o posicionamento da cabeça do animal. Em B visualiza-se a incisão ventrolateral. Em C observamos o osso epihióide (seta branca). Em D representa-se o momento de extração do GCC (seta cheia)

Tabela 2 – Representação dos dados macromorfolométricos do GCC obtidos durante o ato cirúrgico e eutanásia, São Paulo – 2006

Grupo	Animal	Gânglio Esquerdo (Controle)			Gânglio Direito (Tratado)		
		Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)
GI	1	5,57	3,20	2,60	8,58	4,34	2,92
	2	6,10	4,21	2,69	7,69	4,22	2,92
	3	7,07	4,48	2,39	7,32	3,53	2,42
GII	4	7,11	4,42	3,42	7,41	4,51	3,52
	5	7,02	4,27	3,12	7,35	4,73	3,44
	6	7,08	4,36	3,36	7,41	4,48	3,48
GIII	7	7,94	5,71	3,85	8,60	6,08	4,09
	8	7,13	4,11	3,09	7,67	4,40	3,58
	9	7,09	4,36	2,86	7,87	4,23	3,28

5.2. ANÁLISE CLÍNICA

Promoveu-se a análise da evolução do quadro clínico de cada animal de cada grupo durante o período pós-cirúrgico conforme previamente descrito em material e métodos. A análise clínica foi feita durante o período pós-cirúrgico de cada grupo: o grupo I por duas semanas, o grupo II por 7 semanas e finalmente doze semanas de avaliação para o grupo III. Os sinais clínicos secundários à ganglionectomia esperados e analisados foram temperaturas da face e da orelha, sudorese do muflo, presença de ptose, presença de miose.

Durante o período trans-operatório foi possível observar o aumento na temperatura da orelha esquerda em todos os animais. O aumento da temperatura foi um sinal clínico persistente por todas as semanas avaliadas nos animais dos grupos I e II, duas e sete semanas respectivamente, nos animais do grupo III (doze semanas) o sinal clínico persistiu até a 8ª semana.

O aumento de temperatura da face dos nove ovinos operados demonstrou-se discreta e persistente por apenas duas semanas, retornando aos patamares normais após este período. Além da discreta hipertermia da face, não se observou aumento da sudorese na face dos ovinos. O efeito da ganglionectomia unilateral do GCC sobre o controle simpático da sudorese foi avaliado através da observação de gotículas sob o plano naso-labial dos animais. A ausência de sudorese (Figura 2) no plano naso-labial persistiu até a segunda semana nos animais dos grupos I e III, diferindo dos animais do grupo II, no qual, observou-se a persistência por quatro semanas.

Os sintomas da cirurgia experimental incluíram a presença de miose do lado esquerdo em todos os animais por 2 semanas. A ptose da pálpebra superior (Figura 3) foi observada em todas as semanas do grupo I, grupo II e dois animais do grupo III. Apenas em um animal do

grupo III observou-se normalidade na posição da pálpebra superior a partir da 8ª semana.

Assim sendo, os resultados da avaliação clínica por grupo são representados nas tabelas 2, 3 e 4 sendo grupo I, II e III respectivamente. Ainda foram registrados anisocoria presente (Figura 2), ausência de sudorese do nariz (Figura 3).

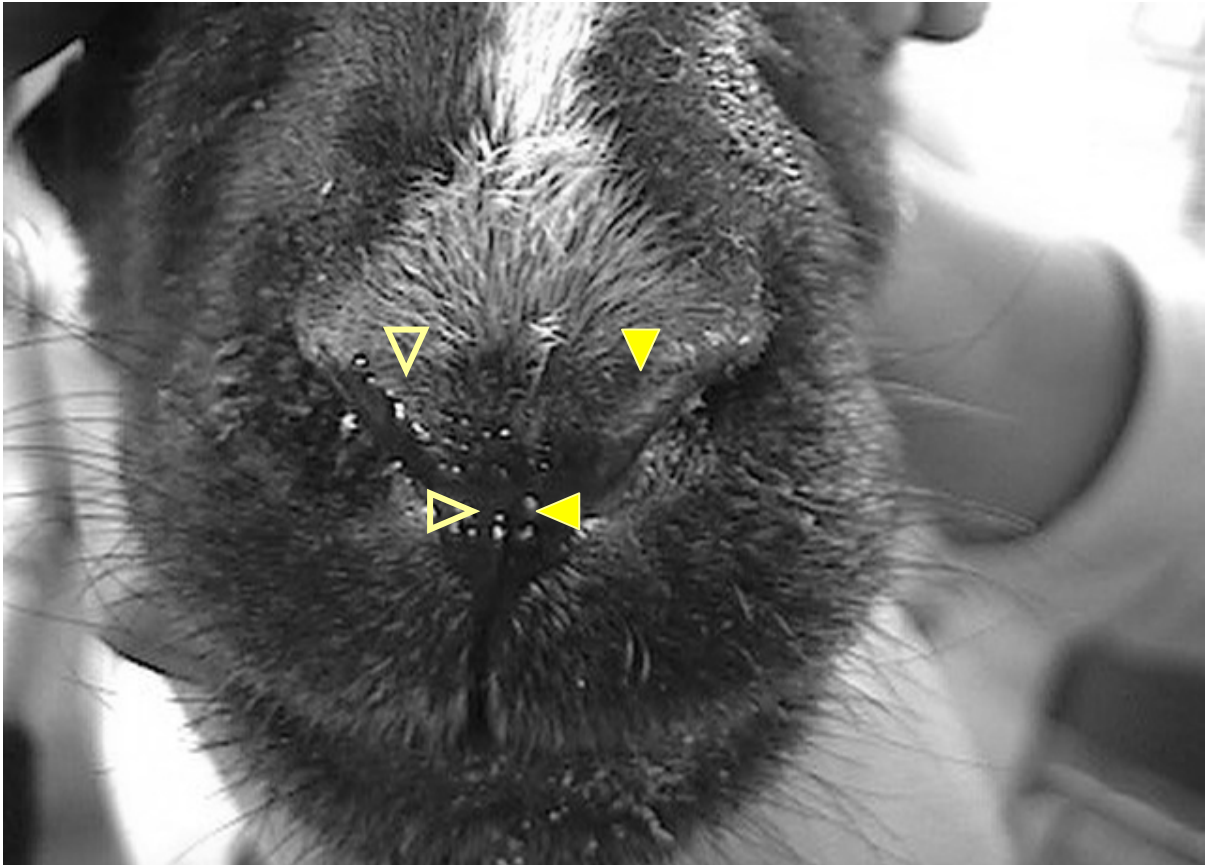


Figura 2 – Fotografia do plano nasal de um ovino ilustrando a ausência da sudorese no hemi-plano nasal esquerdo (cabeças de setas cheias) após a ganglionectomia unilateral do GCC (gânglio cervical cranial) enquanto no hemi-plano nasal direito observa-se o aspecto brilhante da sudorese (cabeças de setas vazias).

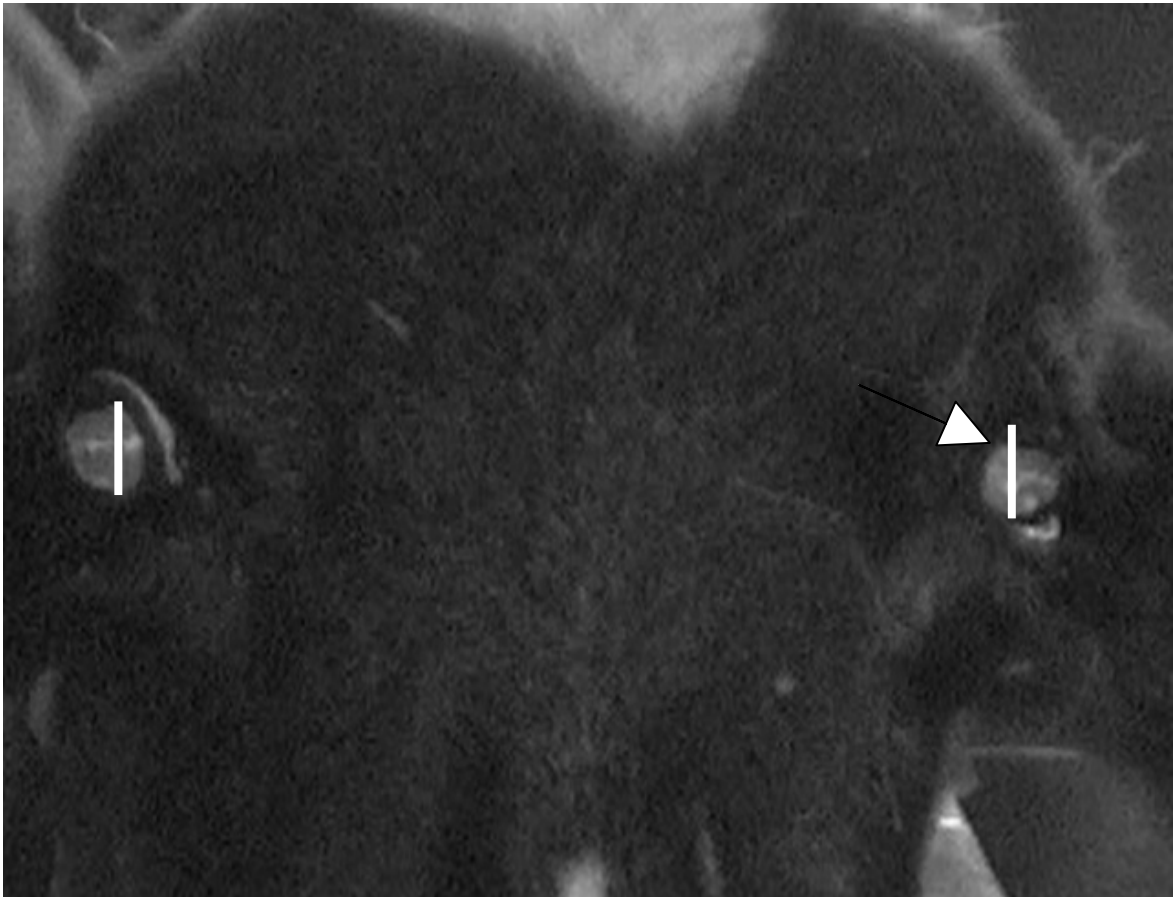


Figura 3 – Fotografia da face de um ovino demonstrando a ptose da pálpebra superior (traço) presente após a ganglionectomia unilateral do GCC (gânglio cervical cranial). Posicionaram-se dois traços (dois centímetros) idênticos entre os pontos mais côncavos da mucosa palpebral superior e inferior em ambos os olhos. Observa-se a diferença de altura da pálpebra superior esquerda para o traço (cabeça de seta) em comparação à direita, caracterizando a ptose no olho esquerdo.

Tabela 3 – Representação dos dados obtidos de observação clínica para a grupo I durante o período pós cirúrgico, São Paulo, 2006

Grupo I (2 semanas)	
Sinal Clínico /Gânglio	Controle / Operado
Animal 1	
T°C face	+ / N + / N N / N N / N N / N N / N N / N
T°C orelha	+ / N + / N + / N N / N N / N N / N N / N
Sudorese muflo	- / P - / P - / P P / P - + / P - + / P
Ptose palpebral	+ / N + / N + / N N / N + / N + / N + / - + / N
Miose	P / N P / N N / N N / N N / N N / N N / N
Sinal Clínico /Gânglio	Controle / Operado
Animal 2	
T°C face	+ / N + / N N / N N / N N / N N / N N / N
T°C orelha	+ / N + / N + / N N / N N / N N / N N / N
Sudorese muflo	- / P - / P - / P - / P - / P - / P
Ptose palpebral	+ / N + / N + / N + / N + / N + / N + / - + / N
Miose	P / N P / N P / N P / N - + / N - + / N
Sinal Clínico /Gânglio	Controle / Operado
Animal 3	
T°C face	+ / N + / N N / N N / N N / N N / N N / N
T°C orelha	+ / N + / N + / N N / N N / N N / N N / N
Sudorese muflo	- / P - / P - / P - / P - + / P - + / P
Ptose palpebral	+ / N + / N + / N + / N + / N + / N + / - + / N
Miose	P / N P / N N / N N / N - + / N N / N N / N

5.3. MICROESTRUTURA

A análise qualitativa da microestrutura do GCS direito (controle) e esquerdo (pós ganglionectomia) revelaram arranjos estruturais distintos entre os antímeros. Assim, observouse que enquanto no gânglio controle os neurônios apresentavam uma distribuição homogênea, o gânglio tratado (direito) apresentou uma distribuição mais heterogênea, sendo possível identificar agrupamentos de neurônios delimitados e separados por tecido conjuntivo notoriamente mais desenvolvido que do gânglio controle (Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9).

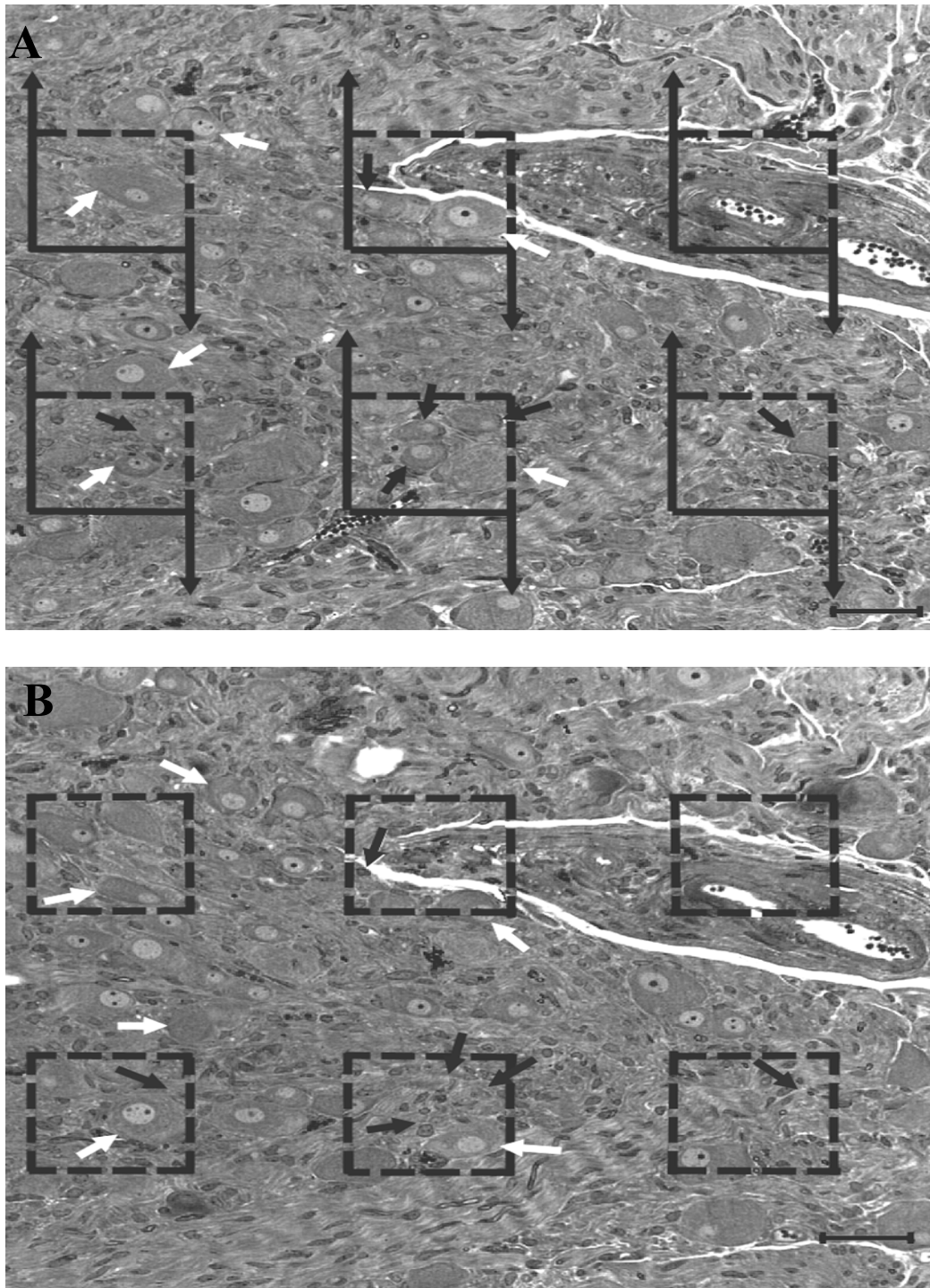
Grupo I - Gânglio Controle

Figura 4 – Fotomicrografias ilustrando um disector aplicado no GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino avaliado após a ganglionectomia unilateral (controle) do grupo I. Nesta montagem observa-se que a secção referencia (A) está sob a look-up (B). Setas pretas indicam neurônios que estavam presentes na secção de referência e desapareceram na look-up, ao passo que setas brancas indicam neurônios presentes nas duas secções. Nota-se que a altura do disector é de 12µm. Observa-se distribuição homogênea dos neurônios no gânglio controle
Técnica de coloração: Azul de Toluidina. Escala de barra: 25 µm

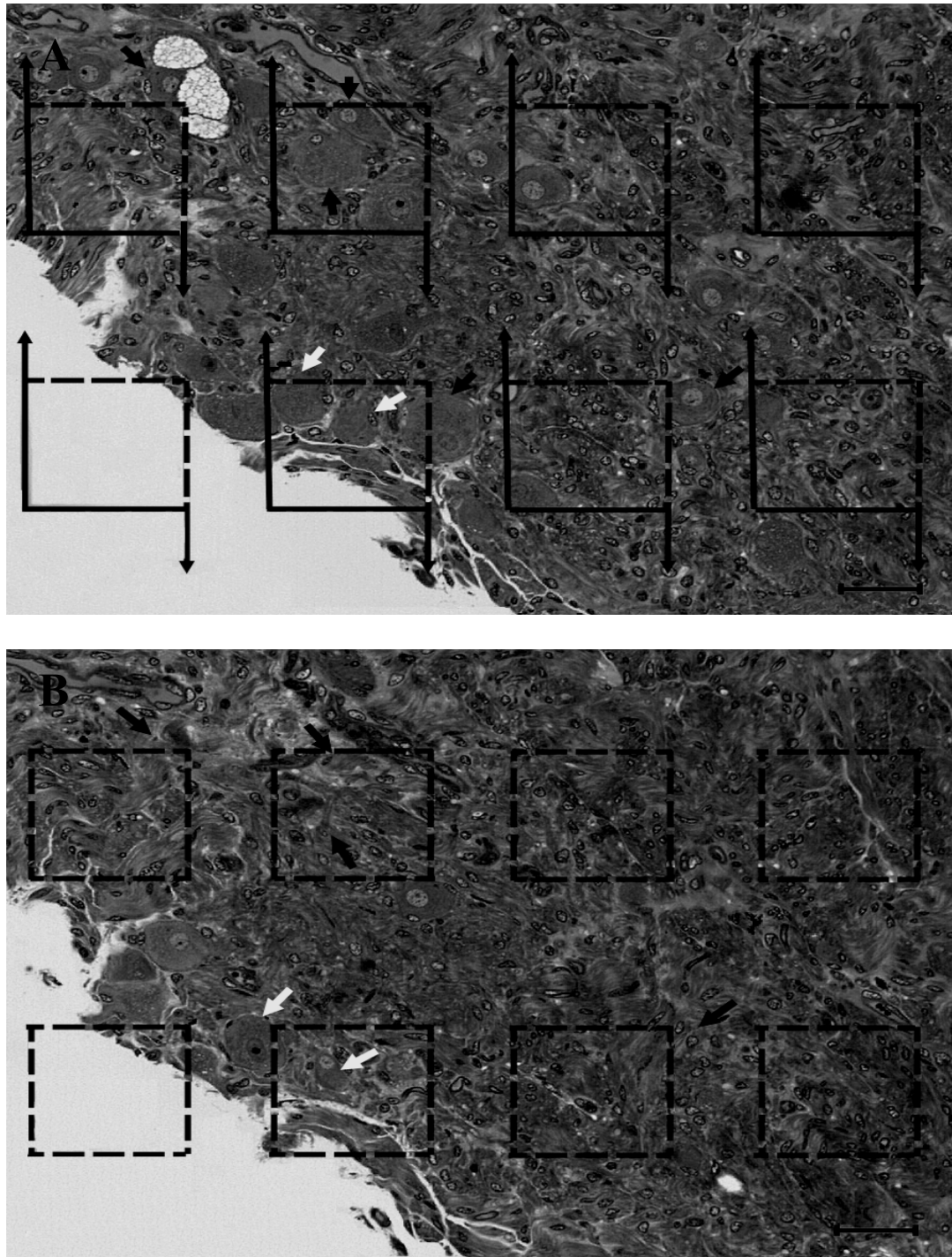
Grupo I - Gânglio Operado

Figura 5 – Fotomicrografias ilustrando um disector aplicado no GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino avaliado duas semanas (grupo I) após ganglionectomia unilateral (operado). Nesta montagem observa-se que a secção referencia (A) está sob a look-up (B). Setas pretas indicam neurônios que estavam presentes na secção de referência e desapareceram na look-up, ao passo que setas brancas indicam neurônios presentes nas duas secções. Nota-se que a altura do disector é de 12 μ m. Observa-se distribuição heterogênea dos neurônios no gânglio operado. Técnica de coloração: Azul de Toluidina. Escala de barra: 25 μ m

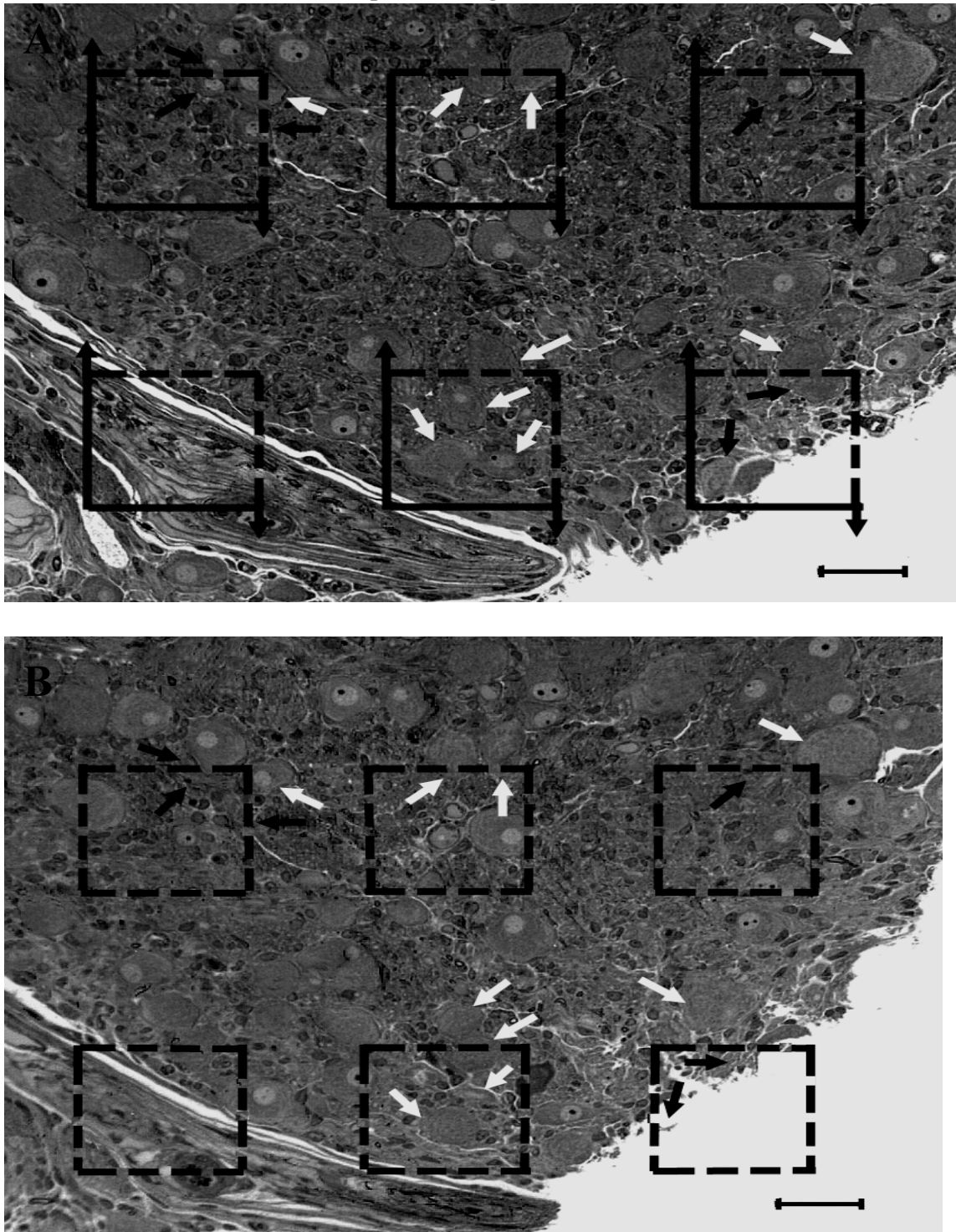
Grupo II - Gânglio Controle

Figura 6 – Fotomicrografias ilustrando um disector aplicado no GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino avaliado após a ganglionectomia unilateral (controle) do grupo II. Nesta montagem observa-se que a secção referencia (A) está sob a look-up (B). Setas pretas indicam neurônios que estavam presentes na secção de referência e desapareceram na look-up, ao passo que setas brancas indicam neurônios presentes nas duas secções. Nota-se que a altura do disector é de 12μm. Observa-se distribuição homogênea dos neurônios no gânglio controle. Técnica de coloração: Azul de Toluidina. Escala de barra: 25 μm

Grupo II - Gânglio Operado

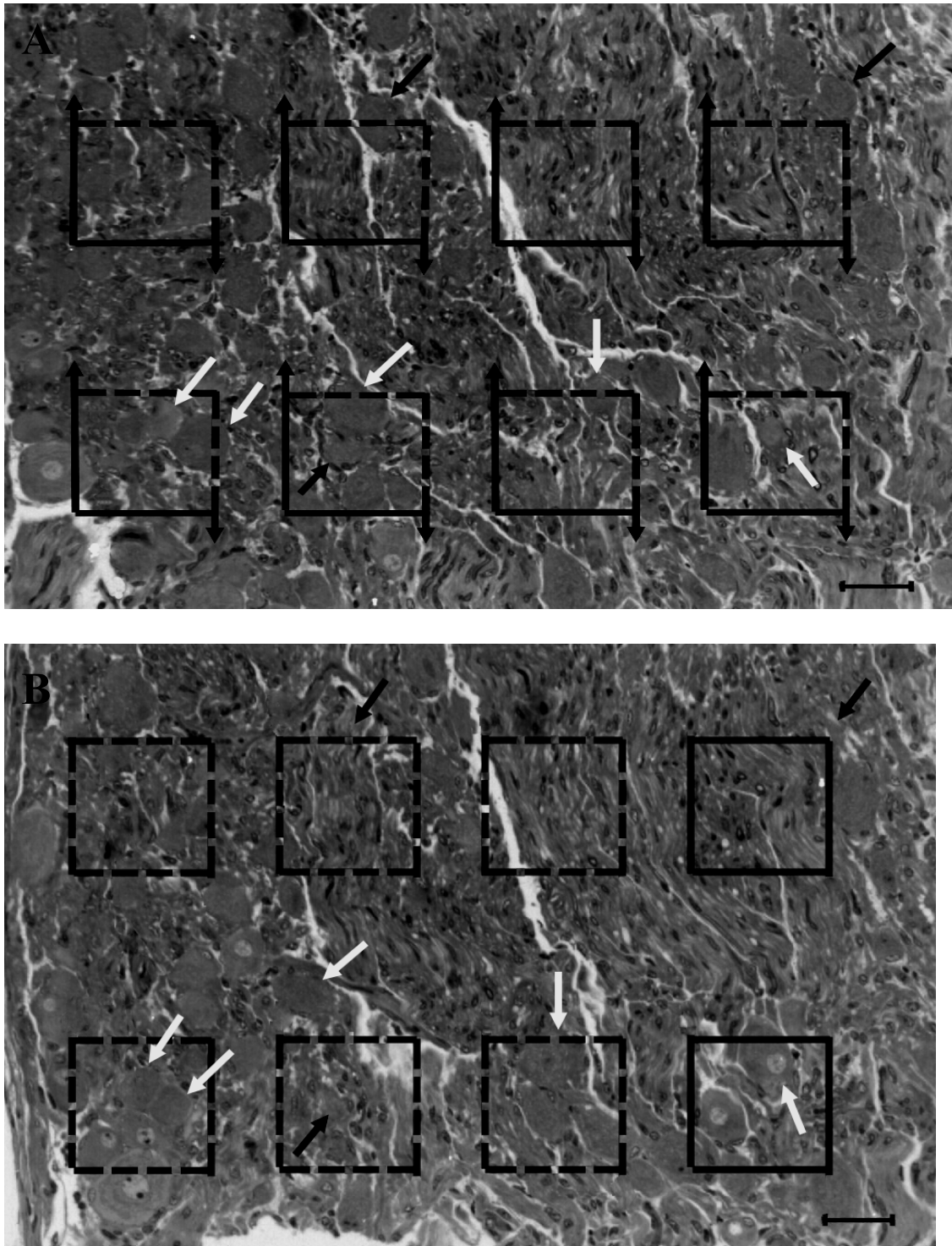


Figura 7 – Fotomicrografias ilustrando um disector aplicado no GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino avaliado sete semanas (grupo II) após ganglionectomia unilateral (operado). Nesta montagem observa-se que a secção referencia (A) está sob a look-up (B). Setas pretas indicam neurônios que estavam presentes na secção de referência e desapareceram na look-up, ao passo que setas brancas indicam neurônios presentes nas duas secções. Nota-se que a altura do disector é de 12 μ m. Observa-se distribuição heterogênea dos neurônios no gânglio operado. Técnica de coloração: Azul de Toluidina. Escala de barra: 25 μ m

Grupo III - Gânglio Controle

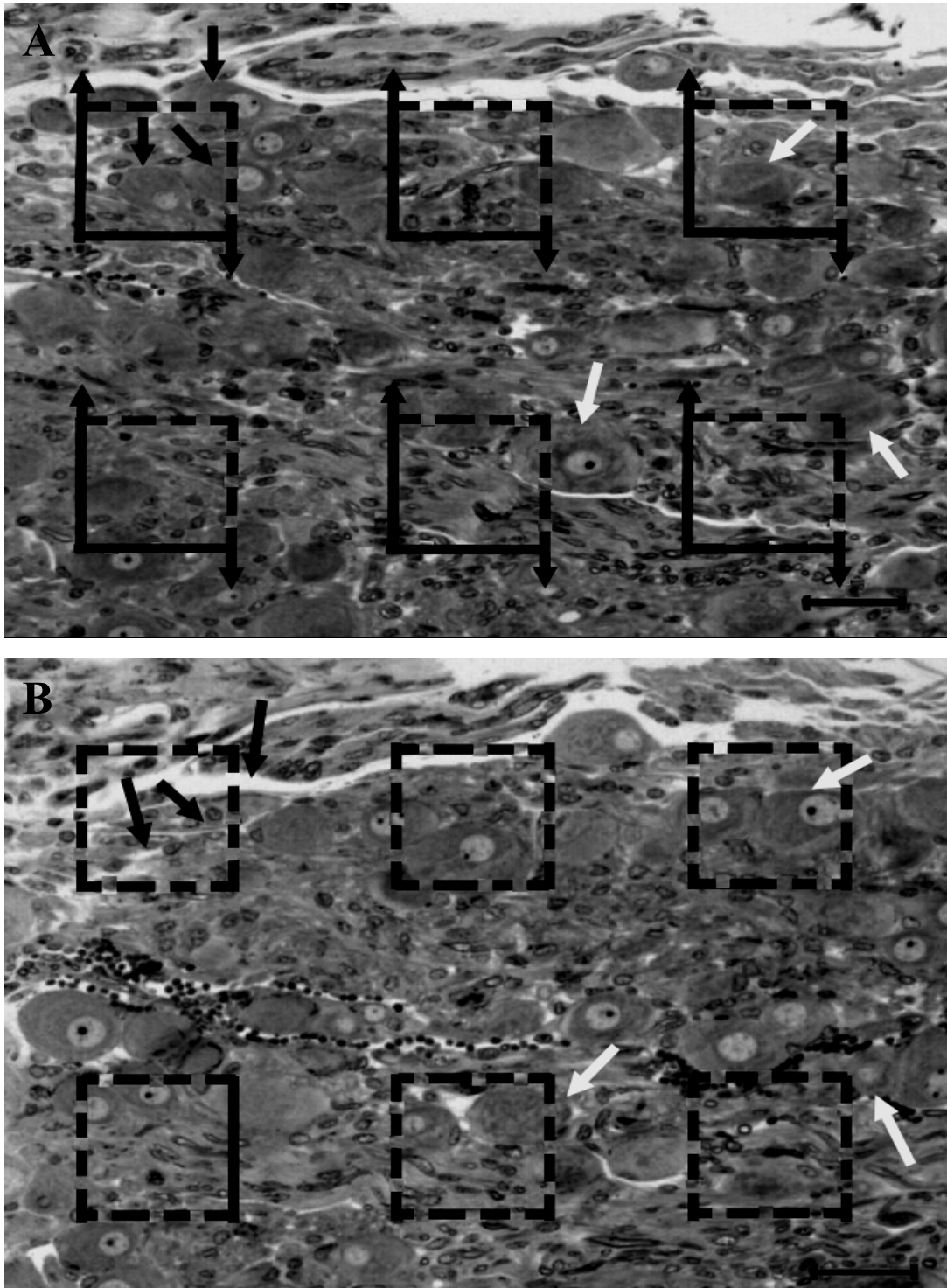


Figura 8 – Fotomicrografias ilustrando um disector aplicado no GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino avaliado após a ganglionectomia unilateral (controle) do grupo III. Nesta montagem observa-se que a secção referência (A) está sob a look-up (B). Setas pretas indicam neurônios que estavam presentes na secção de referência e desapareceram na look-up, ao passo que setas brancas indicam neurônios presentes nas duas secções. Nota-se que a altura do disector é de 12µm. Observa-se distribuição homogênea dos neurônios no gânglio controle. Técnica de coloração: Azul de Toluidina. Escala de barra: 25 µm

Grupo III - Gânglio Operado

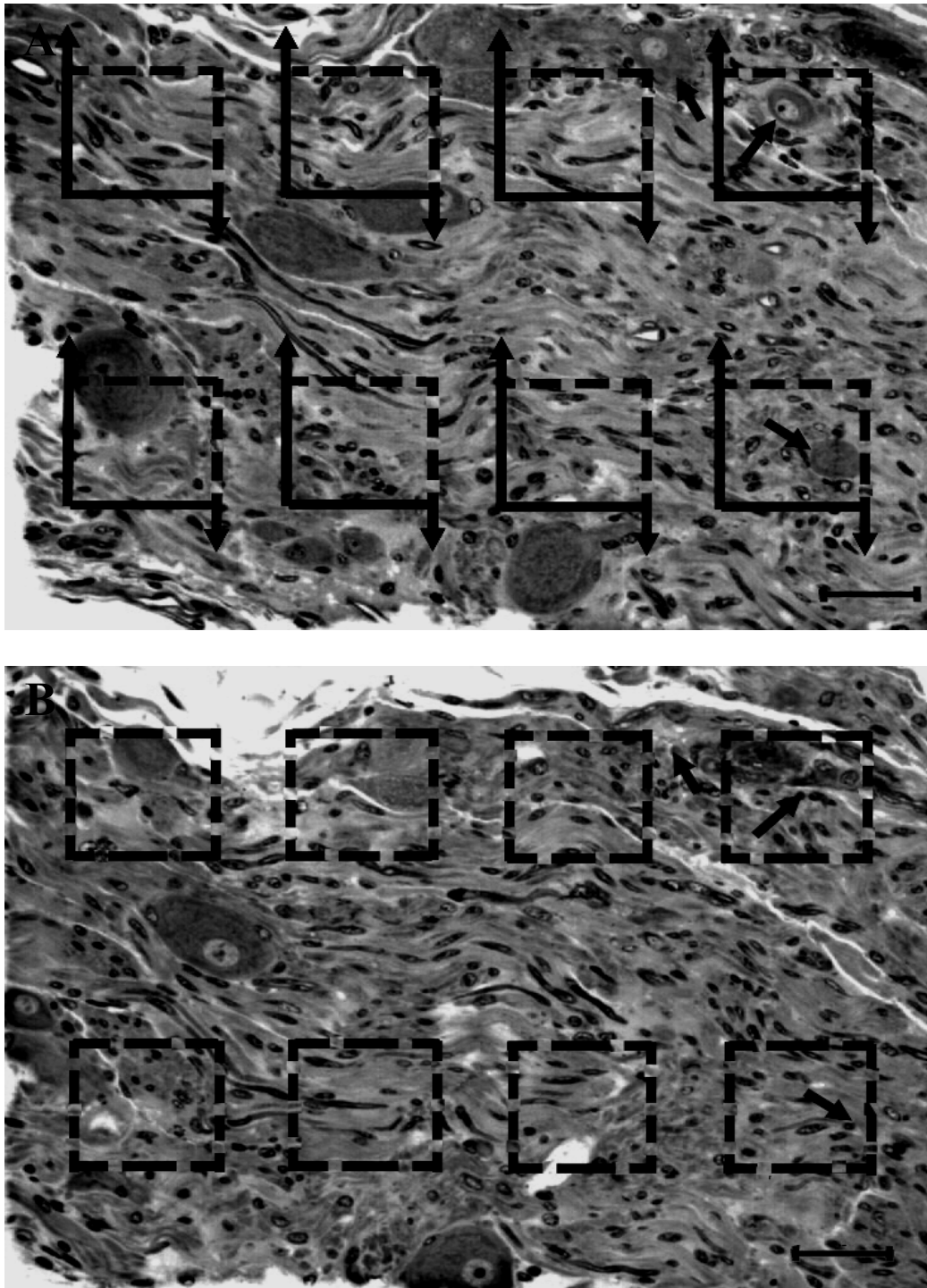


Figura 9 – Fotomicrografias ilustrando um disector aplicado no GCC (gânglio cervical cranial) de um ovino avaliado doze semanas (grupo III) após ganglionectomia unilateral (operado). Nesta montagem observa-se que a secção referencia (A) está sob a look-up (B). Setas pretas indicam neurônios que estavam presentes na secção de referência e desapareceram na look-up, ao passo que setas brancas indicam neurônios presentes nas duas secções. Nota-se que a altura do disector é de $12\mu\text{m}$. Observa-se distribuição heterogênea dos neurônios no gânglio operado. Técnica de coloração: Azul de Toluidina. Escala de barra: $25\mu\text{m}$

5.4 ESTUDO ESTEREOLÓGICO

Os resultados encontrados no estudo estereológico são descritos em itens a seguir.

5.4.1 Densidade neuronal e número total de neurônios

A densidade neuronal (número de neurônios mm^{-3}) apresentou variação entre 4.781 a 7.747 para o gânglio controle do grupo I, enquanto que para o gânglio operado encontramos valores entre 2.562 a 4.288. Para o grupo II, valores entre 7.147 e 8.874 foram encontrados no gânglio controle e entre 4.299 e 5.080 no gânglio operado. O grupo III revelou números de 10.389 a 10.957 e entre 6.000 a 8.018 para gânglios controle e operado, respectivamente.

A análise estatística entre os grupos I, II e III realizada por meio do Teste F (ANOVA “two way cross-classification”) demonstrou haver diferença significativa, ($p = 0,0001$), do efeito do tratamento dentro de cada grupo. A seguir, o Test t de Student revelou efeitos significativos para o grupo I (duas semanas) ($p = 0,0031$). Para o grupo II encontrou-se ($p = 0,0025$) e para o grupo III ($p = 0,0015$). Adicionalmente, o teste F detectou diferença significativa para o efeito semana ($p = 0,0016$) entre os grupos. Mais especificamente, o teste t de Student demonstrou haver diferença significativa ($p = 0,0019$) para este mesmo efeito nos gânglios controle entre a 2ª e a 12ª semana e entre a 7ª e a 12ª semana ($p = 0,0143$). Os gânglios operados sofreram efeitos significativos entre a 2ª e a 12ª semana ($p = 0,0012$) e entre a 7ª e a 12ª semana ($p = 0,0107$).

O número total de neurônios no GCC de ovinos estimado para o grupo I foi de 180.000 a 360.000 no gânglio controle e entre 176.400 a 295.200 no gânglio operado. Para o grupo II,

o gânglio controle continha entre 259.200 a 504.000 neurônios, enquanto que estimativas entre 266.400 a 489.600 foram obtidos para o gânglio operado. O grupo III apresentou valores entre 330.000 a 483.000 para o gânglio controle e entre 327.000 a 378.000 para o gânglio operado. A densidade neuronal (Nv) e o número total de neurônios (N) calculados de cada animal e as médias dos grupos estão representadas na tabela 6 e representados no gráfico 1.

A metanálise entre os grupos I, II e III por meio do Teste F (ANOVA “two way cross-classification”) demonstrou haver efeito significativo ($p = 0,0514$) dentro de cada grupo. Em continuidade o teste t de Student demonstrou que o efeito do tratamento ocorreu mais especificamente no grupo III (12 semanas) ($p = 0,0166$).

Não foram observados efeitos significativos da semana ($p = 0,3835$) bem como da interação semana e tratamento ($p = 0,0995$) nos três grupos de estudo.

Estimativas das médias individuais de densidade neuronal (Nv) e número total de neurônios (N) bem como suas respectivas médias e coeficientes de variação são apresentados na tabela 7 e gráfico 1.

5.4.2 Estimativa global do volume neuronal

A estimativa do volume celular dos neurônios apresentou valores entre $1.546,0 \mu\text{m}^3$ a $19.840,8 \mu\text{m}^3$ e entre $1.631,5 \mu\text{m}^3$ a $32.741,8 \mu\text{m}^3$ para os gânglios controle e operado do grupo I, respectivamente. Para o grupo II foram encontrados valores de $1.506,7 \mu\text{m}^3$ a $25.938,8 \mu\text{m}^3$ para o gânglio controle e entre $1.538,5 \mu\text{m}^3$ a $24.537,1 \mu\text{m}^3$ para o gânglio operado. Valores entre $1.545,6 \mu\text{m}^3$ a $32.462,5 \mu\text{m}^3$ e entre $1.516,6 \mu\text{m}^3$ a $29.923,9 \mu\text{m}^3$ foram calculados para os gânglios controle e tratado do grupo III, respectivamente. Os valores médios do volume celular em cada animal assim como as médias e coeficientes de

variação intra-grupos são descritos na tabela 6 e representados no gráfico 1.

A análise estatística entre os grupos I, II e III conduzida por meio do Teste F (ANOVA “two way cross-classification”) demonstrou diferença significativa ($p < 0,0001$), quanto ao efeito do tratamento, ou seja, diferença entre controle e operado dentro de cada grupo. Em continuidade o Test t de Student revelou significância para o tratamento no grupo I (duas semanas) ($p = 0,0215$). Para o grupo II encontrou-se ($p = 0,0091$) e para o grupo III, ($p = 0,0013$). O teste F não detectou diferença significativa para o efeito semana entre os gânglios controle e operado isoladamente. No entanto, o teste t de Student demonstrou haver diferença significativa ($p = 0,0415$), para este efeito sobre os gânglios operados entre a 7^a e a 12^a semanas.

5.5 ESTUDO MORFOMÉTRICO

A seguir são descritos as estimativas dos parâmetros morfométricos avaliados.

5.5.1 Área seccional do núcleo neuronal

No grupo I a área seccional do núcleo variou de $40,3\mu\text{m}^2$ a $261,5\mu\text{m}^2$ para o gânglio controle e $23,5\mu\text{m}^2$ a $304,6\mu\text{m}^2$ para o gânglio operado. A área do núcleo neuronal para o grupo II variou de $17,8\mu\text{m}^2$ a $228,5\mu\text{m}^2$ e de $27,0\mu\text{m}^2$ a $235,7\mu\text{m}^2$, respectivamente para os gânglios controle e operados, enquanto que para o grupo III encontraram-se valores entre $24,6\mu\text{m}^2$ e $201,2\mu\text{m}^2$ para o gânglio controle e entre $30,8\mu\text{m}^2$ e $215,8\mu\text{m}^2$ para o gânglio operado. A média dos valores de áreas do núcleo de cada animal e dos grupos são descritos na tabela 5 e representados no gráfico 1.

A comparação entre os grupos I, II e III avaliados pelo método estatístico, Teste F (ANOVA “two way cross-classification”) demonstrou não haver diferença significativa quanto ao efeito do tratamento, ou seja, diferença entre controle e operado dentro de cada grupo; e ainda não houve diferença significativa no efeito das semanas tanto nos gânglios controle como operados, ou seja, não se encontrou variação significativa nos resultados destes gânglios nas diferentes semanas avaliadas. De igual forma, não houve efeito significativo da interação semana e tratamento em todos os grupos de estudo.

5.5.2 Área seccional do corpo celular neuronal

A estimativa da área do corpo celular do gânglio controle do grupo I variou entre 169,5 μm^2 e 1.172,2 μm^2 e entre 116,2 μm^2 e 1.782,5 μm^2 para o gânglio operado. O grupo II apresentou valores de 128,9 μm^2 a 1.478,4 μm^2 e entre 155,3 μm^2 e 1.580,2 μm^2 para os gânglios controle e operado, respectivamente. Já para o grupo III a variação foi de 119,1 μm^2 a 1.715,1 μm^2 para o gânglio controle e entre 185,9 μm^2 e 2.040,5 μm^2 para o gânglio operado. As médias dos valores das áreas seccionais neuronal e nuclear em cada animal, assim como, as médias e os coeficientes de variação intra-grupos são descritos na tabela 5 e representados no gráfico 1.

A comparação entre os grupos I, II e III avaliados pelo método estatístico, Teste F (ANOVA “two way cross-classification”) demonstrou haver diferença significativa ($p = 0,0006$), quanto ao efeito do tratamento para todos os grupos. Posteriormente, o Test t de Student demonstrou valores significativos para o efeito tratamento para o grupo I (duas semanas) ($p = 0,0121$) na comparação entre gânglios controle e operado. Para o grupo II encontrou-se $p = 0,0104$ e para o grupo III, $p = 0,0066$.

Tabela 6 – Representação das estimativas das médias individuais para a área seccional de núcleo e corpo celular (μm^2) e para volume neuronal (μm^3) e seus respectivos coeficientes de erro (CE) no gânglio cervical cranial (GCC) de ovinos avaliados em três diferentes períodos pós-operatórios: 2 semanas (GI); 7 semanas (GII) e 12 semanas (GIII). São apresentadas ainda estimativas de média e coeficiente de variação dentro de cada grupo de estudo, São Paulo, 2006

	GCC*	Área (μm^2)				Volume global (μm^3)				
		Núcleo	CV [†]	Corpo celular	CV [†]	Neurônio	CV [†]	CE [‡]		
GI 02 semanas	Animal 1	Controle	107,7	–	517,5	–	7.508,6	–	0,1	
		Operado	100,2	–	549,4	–	8.437,7	–	0,1	
	Animal 2	Controle	108,9	–	572,5	–	7.456,0	–	0,1	
		Operado	111,6	–	604,1	–	8.453,3	–	0,1	
	Animal 3	Controle	101,3	–	482,7	–	6.768,9	–	0,1	
		Operado	108,3	–	654,5	–	8.971,4	–	0,1	
	Média	Controle	102,4	0,4	535,2	0,3	7.252,1	0,5	–	
		Operado	107,0	0,6	626,5	0,4	8.265,2	0,6	–	
	GII 07 semanas	Animal 1	Controle	105,2	–	442,4	–	6.023,3	–	0,1
			Operado	98,1	–	582,3	–	6.029,6	–	0,1
Animal 2		Controle	95,2	–	519,6	–	6.333,9	–	0,1	
		Operado	110,4	–	612,2	–	8.179,5	–	0,1	
Animal 3		Controle	103,1	–	553,4	–	7.373,2	–	0,1	
		Operado	92,2	–	602,5	–	7.910,9	–	0,1	
Média		Controle	101,1	0,7	534,7	0,4	6.607,6	0,6	–	
		Operado	99,4	0,7	628,2	0,4	8.204,7	0,7	–	
GIII 12 semanas		Animal 1	Controle	95,8	–	499,0	–	6.023,9	–	0,1
			Operado	98,7	–	623,5	–	7.967,4	–	0,1
	Animal 2	Controle	99,0	–	562,9	–	6.973,8	–	0,1	
		Operado	110,0	–	757,0	–	11.181,3	–	0,1	
	Animal 3	Controle	114,1	–	576,1	–	8.779,9	–	0,1	
		Operado	113,4	–	592,5	–	9.005,5	–	0,1	
	Média	Controle	105,9	0,6	570,8	0,4	7.229,5	0,7	–	
		Operado	106,7	0,5	651,3	0,4	9.374,3	0,6	–	

* GCC: Gânglio Cervical Cranial

† Coeficiente de Variação: CV = Desvio padrão/média

‡ Coeficiente de Erro: CE (volume) = $\frac{1}{\sum A} \times [1/12 (3A - 4B + C)]$

Tabela 7 - Representação das estimativas das médias individuais para a estimativa de neurônios.mm⁻³ e para estimativa de número total neurônios (N) e seus respectivos coeficientes de erro (CE) no gânglio cervical cranial (GCC) de ovinos avaliados em três diferentes períodos pós-operatórios: 2 semanas (GI); 7 semanas (GII) e 12 semanas (GIII). São apresentadas ainda estimativas de média e coeficiente de variação dentro de cada grupo de estudo, São Paulo, 2006

		CCG	Nv ¹	CV ²	N ²	CV ²	CE ³	
GI 02 semanas	Animal1	Controle	6.338	–	180.000	–	0,1	
		Operado	2.562	–	176.400	–	0,1	
	Animal2	Controle	4.781	–	259.200	–	0,1	
		Operado	3.094	–	255.600	–	0,1	
	Animal3	Controle	7.747	–	360.000	–	0,1	
		Operado	4.288	–	295.200	–	0,1	
	Média	Controle	6.289	0,24	266.400	0,3	–	
		Operado	3.314	0,27	242.400	0,2	–	
	GII 07 semanas	Animal1	Controle	8.874	–	504.000	–	0,1
			Operado	5.080	–	489.600	–	0,1
Animal2		Controle	7.147	–	295.200	–	0,1	
		Operado	4.299	–	266.400	–	0,1	
Animal3		Controle	7.495	–	309.600	–	0,1	
		Operado	4.837	–	266.400	–	0,1	
Média		Controle	7.839	0,12	369.600	0,3	–	
		Operado	4.739	0,08	340.800	0,3	–	
GIII 12 semanas		Animal1	Controle	10.692	–	483.000	–	0,1
			Operado	7.752	–	378.000	–	0,1
	Animal2	Controle	10.389	–	447.000	–	0,1	
		Operado	8.018	–	345.000	–	0,1	
	Animal3	Controle	10.957	–	330.000	–	0,1	
		Operado	6.000	–	327.000	–	0,1	
	Média	Controle	10.679	0,03	420.000	0,1	–	
		Operado	7.257	0,15	350.000	0,1	–	

¹ Nv: Numero de neurônios mm⁻³

² N: número total de neurônios

♦ Coeficiente de Variação: CV(Nv) e CV (N) = Desvio padrão/média

♣ Coeficiente de Erro: CE(N) = 1/√ΣQ

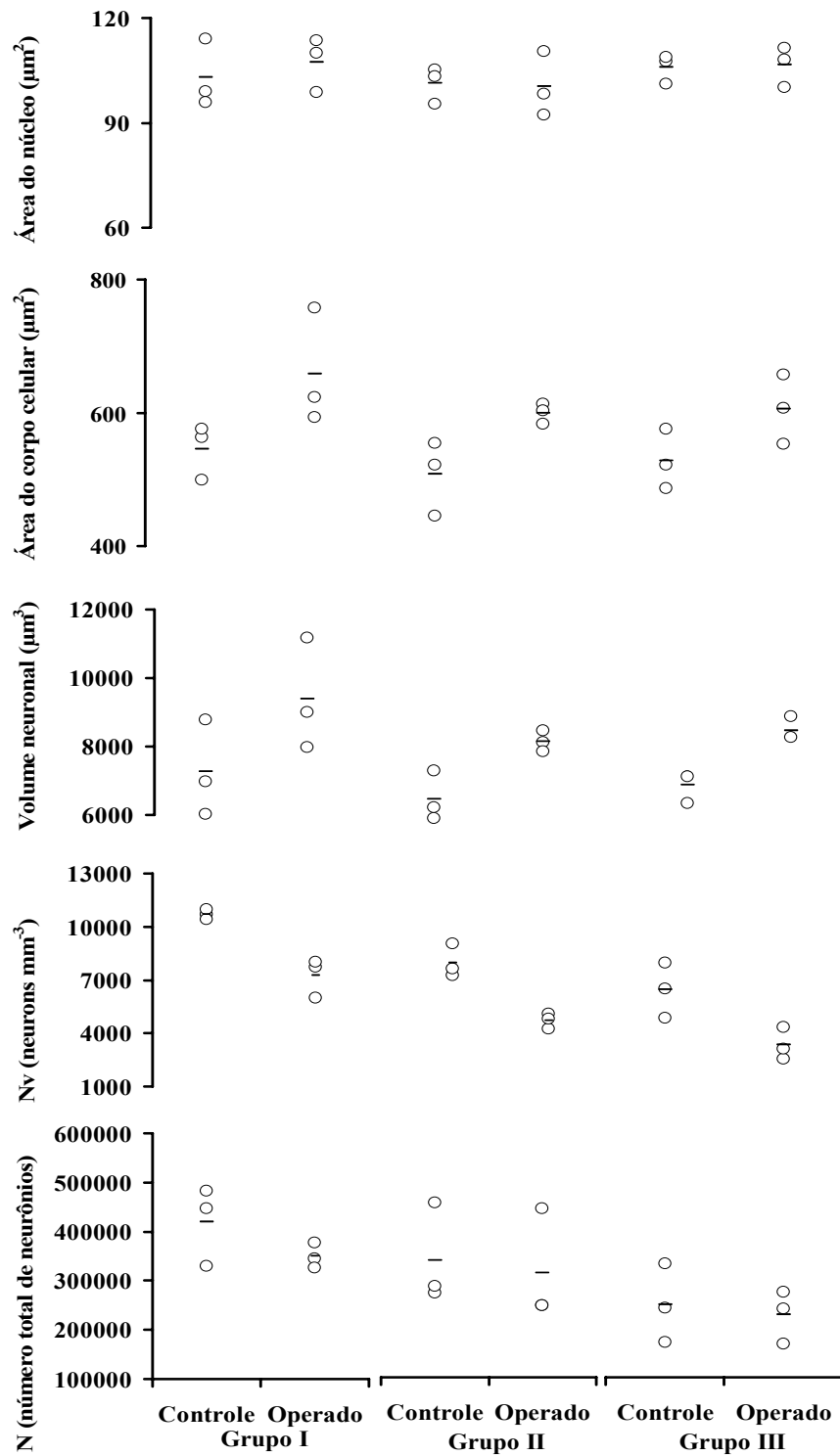


Gráfico 1 – Gráfico descreve as estimativas das médias individuais para a área do núcleo (μm^2), área do corpo celular (μm^2), volume neuronal (μm^3), Nv (neurônios. mm^3) e N (número total de neurônios) no gânglio cervical cranial (GCC) de ovinos avaliados em três diferentes períodos pós-operatórios: 2 semanas (GI); 7 semanas (GII) e 12 semanas (GIII). Círculos (o) representam estimativas individuais e barras horizontais (-) assinalam médias dentro de cada grupo de acordo com o tratamento empregado: controle e operado, São Paulo – 2006

Discussão

6 DISCUSSÃO

A discussão foi apresentada nos seguintes tópicos:

6.1 TÉCNICA OPERATÓRIA

A abordagem cirúrgica descrita por Appleton e Waites (1957) efetuando acesso cirúrgico pelo processo zigomático, no ponto médio entre o ângulo do olho e a base da orelha, continuando paralelamente ao ramo da mandíbula até a altura da cartilagem tireóidea foi considerada muito ampla, uma vez que, em nosso estudo, efetuando-se uma abordagem mínima foi possível identificar o gânglio cervical cranial (GCC) e estruturas próximas. A abordagem cirúrgica cervical ventro-lateral do GCC e estruturas vizinhas em ovinos foi promovida com sucesso e livre de fatalidades nos períodos per, trans e pós-operatório. Como consequência da ganglionectomia unilateral do GCC, foram observados sinais clínicos da síndrome de Horner.

6.2 ANATOMIA MACROSCÓPICA

A literatura consultada reporta que o GCC em diversas espécies encontra-se situado próximo à bulla timpânica, ventralmente ao Atlas e em íntima relação com a artéria carótida interna, conforme Baljet e Drukker (1979); Castro (2001); De Abreu (2002); Fioretto (2002); Hedger e Webber (1976), Williams e Paley (1969). Em nosso estudo não foram encontrados dados de relevância sobre a alteração de posicionamento do GCC em ovinos, sendo sua topografia semelhante à descrita por Appleton e Waites (1957), tanto nos gânglios operados como nos controles. Não obstante, salientamos que a ganglionectomia unilateral promovida no antímero esquerdo aparentemente não desencadeou nova acomodação espacial do gânglio remanescente (GCC direito) devido ao aumento de suas dimensões (comprimento, largura e espessura).

No grupo I observou-se um aumento médio de 8% do gânglio operado em relação ao controle quanto ao comprimento do gânglio, 3% quanto à largura e no que tange à espessura verificaram-se aumentos médios em 11%. Para o grupo II encontrou-se a hipertrofia do gânglio operado em relação ao gânglio controle em média de 4% para comprimento, 4% para largura e 5% em espessura. Quanto ao grupo III foram calculados valores médios de 29% de aumento para comprimento do gânglio, 4% de aumento para largura e em espessura do gânglio aumento médio em 7% para o gânglio operado.

6.3 ESTUDO CLÍNICO

A análise clínica secundária à ganglionectomia unilateral do GCS realizada em ovinos mostrou que este procedimento cirúrgico desencadeou a Síndrome de Horner iatrogênica. Esta síndrome provoca alterações específicas quanto à temperatura da face, sudorese, presença de ptose e miose, conforme reportado por Bell et al., (2001); Boydell, (1995); Kisch, (1951); Skarda et al., (1985). A síndrome de Horner em grandes animais foi relatada por Smith e Mayhew (1977) em um experimento utilizando eqüinos, bovinos, caprinos e ovinos aplicando-se diferentes tipos de simpatectomia na região cervical incluindo-se a ganglionectomia do GCC direito. Após a cirurgia os animais foram observados quanto aos déficits neurológicos e oftálmicos por períodos diferentes.

A síndrome de Horner desenvolvida em ovinos, no presente estudo, com o envolvimento do gânglio cervical cranial (GCC) demonstrou-se clinicamente menos severa em comparação com outras espécies como os caninos que apresentam significativa ptose palpebral como descrito por Boydell (1995) e eqüinos que demonstram nítido descontrole da temperatura da face e pescoço conforme os relatos de Smith e Mayhew (1977) e Ghafir, Art e Lekeux (1996).

Em ovinos a hipertermia da face parece ser um sinal impreciso para a avaliação da doença, entretanto, o diagnóstico da síndrome de Horner pode ser determinado através da observação da alteração da orelha, ipsilateral à lesão, persistente por doze semanas.

Outros sintomas relevância clínica foram a ausência de sudorese ipsilateral à lesão persistente por quatro semanas e a presença de ptose palpebral por oito semanas.

Os sintomas clínicos da Síndrome de Horner mais evidentes foram a hipertermia da orelha esquerda e ausência de sudorese no plano hemi-nasal esquerdo.

6.4. MICROESTRUTURA

A análise histológica qualitativa do GCC esquerdo (controle) e direito (operado) revelou arranjos estruturais distintos entre os antímeros. Conforme a literatura, Castro (2001); De Abreu (2002); Fioretto (2002); Matthews; Raisman (1969); Pappas; Waxman, (1972); Williams; Paley (1969) e Yokota (1973), os neurônios do GCC estão distribuídos ao longo de toda a sua extensão formando amplos agrupamentos delimitados por septos de tecido conjuntivo. A descrição clássica da arquitetura do GCC foi observada nos gânglios controle, contudo, o gânglio operado (direito) apresentou alteração quanto à disposição do tecido conjuntivo distribuído em seu interior. Assim, observou-se que no gânglio operado sua distribuição foi heterogênea, sendo possível identificar agrupamentos de neurônios delimitados e separados por septos de tecido conjuntivo, visíveis em relação ao gânglio controle.

6.5 ESTUDO ESTEREOLÓGICO

Previamente ao início da discussão dos parâmetros encontrados nesta investigação, faz-se necessário salientarmos que a literatura não apresenta dados estereológicos na espécie ovina e a maior parte dos resultados encontrados à respeito de animais de laboratório relacionam-se à aplicação de métodos quantitativos morfométricos (não estereológicos) com exceção de Popken e Farel (1997) e Santer (1991) que aplicam métodos estereológicos em seus estudos. Particularmente, encontramos na espécie ovina Gabella et al (1988) relacionado à citoarquitetura do GCC em ovinos, contudo não se relaciona a abordagem estereológica.

A confiabilidade dos dados encontrados sem a utilização de métodos estereológicos deve ser considerada com extrema cautela, uma vez que tais dados, usualmente, envolvem a extrapolação de dados obtidos bidimensionalmente para o plano tridimensional e algumas hipóteses são assumidas a respeito da forma, orientação e distribuição das partículas a serem quantificadas, além da aplicação de vários fatores de correção.

De outra forma os métodos tridimensionais baseados em delineamento estereológico aplicados nesta pesquisa não dependem da orientação, distribuição e forma das partículas a serem quantificadas conforme amplamente difundido na literatura (GUNDERSEN et al., 1999; MAYHEW, 1991b; WEST, 1993).

Esta mesma crítica aos métodos bidimensionais já havia sido aventada por diversos pesquisadores como Hof e Schmitz (2002), Howard e Reed, (2004), Mayhew e Gundersen (1996), Pakkenberg e Gundersen (1988), Pover e Coggeshall (1991), Ribeiro, Davis e Gabella (2004), Schmitz e Hof (2005) e Sterio (1984), que pertencem à tese da Estereologia conhecida como pós-Gundersen ou pós-disector. A discussão estereológica foi dividida em capítulos para a melhor compreensão das inferências encontradas.

6.5.1 Densidade Neuronal (Nv)

Optou-se por melhorar a acurácia da técnica de quantificação por meio da adoção de sistemas testes singulares para cada gânglio considerado de acordo com o padrão de distribuição dos neurônios ganglionares. Desta maneira, considerou-se um sistema teste composto por seis áreas para o gânglio controle (distribuição homogênea) e outro sistema teste com oito áreas para o gânglio operado (distribuição heterogênea). Vale ainda ressaltar que a área de cada "frame" do sistema teste era idêntica. Deste modo, ao avaliarmos os dados referentes à densidade neuronal, número de neurônios em um determinado volume referência, observamos o efeito da ganglionectomia em cada grupo do experimento. Os gânglios operados apresentaram uma redução na densidade numérica (89%, 65% e 47% para os grupos I, II e III, respectivamente). Essa diferença entre controle e operados reflete a distribuição heterogênea dos neurônios descrito no estudo da microscopia de luz de cortes semi-finos. Apesar do tecido conjuntivo não ter sido quantificado, assim como o tecido não neuronal intraganglionar, os dados qualitativos sugerem que o tecido conjuntivo estava mais densamente arranjado ocasionando uma distribuição mais esparsa e heterogênea dos neurônios ganglionares. A relação entre o aumento do tamanho dos neurônios (área do corpo celular, volume) e alterações na densidade numérica e número total de neurônios são discutidos adiante.

6.5.2 Número total de neurônios

A ganglionectomia unilateral ocasionou dois efeitos distintos no GCC; o grupo I (2 semanas) apresentou um aumento de 3% nos gânglios operados podendo estar relacionada a uma proliferação inicial compensatória à falta de inervação contralateral, entretanto a confirmação desta proliferação neuronal depende da utilização de marcadores específicos (mitose) a fim de se confirmar a hipótese deste aumento estar relacionado ao incremento da área do núcleo neuronal observado para o grupo I, como um dos fenômenos pré-mitóticos no ciclo celular. O segundo efeito da ganglionectomia refere-se aos grupos II e III que apresentaram perda neuronal de cerca de 8% e 20%, respectivamente, sendo no grupo III onde se notou o efeito mais significativo desta perda neuronal quando comparado ao grupo I. Neste caso, o uso de marcadores apoptóticos auxiliaria a esclarecer se esta perda neuronal estaria associada a apoptose.

Quando os dois eventos (número e tamanho celular) são avaliados no seu conjunto, duas hipóteses podem estar relacionadas: primariamente pode-se sugerir uma hipertrofia vicariante dos neurônios do gânglio operado como parte do mecanismo compensatório para re-inervação contralateral, ou seja, o neurônio aumentaria devido à sobrecarga funcional imposta pelo aumento do território a ser inervado. Não obstante, a maior exigência funcional destes neurônios pode levá-los à morte celular, e a seguir à hipertrofia do tecido não neuronal cicatricial, situação esta que se reflete na diminuição da densidade neuronal (Nv) nos gânglios operados e na diminuição do número total de neurônios, conforme observado no grupo II (sete semanas) e mais significativamente no grupo III (doze semanas). Como segunda hipótese, sugere-se que a hipertrofia neuronal possa estar relacionada a um mecanismo compensatório à morte celular advindo da maior exigência funcional conforme

proposto por Cabello et al. (2002) para o efeito do envelhecimento no cérebro de humanos, sendo que a investigação da morte celular poderia explicar o aumento do núcleo observado no grupo III, uma vez que em situações de maior exigência funcional encontra-se a hipertrofia nuclear antecedendo os efeitos apoptóticos (cariólise). Vale ressaltar que o grupo III apresentou o maior índice de perda neuronal.

Como propositura para estudos futuros, a investigação de uma possível inervação cruzada seria necessária (empregando-se injeção de neurotraçadores retrógrados no território ganglionar esquerdo e anterógrados no gânglio cervical cranial direito) para testar a hipótese de que a maior sobrecarga funcional e maior produção de fatores de crescimento - NGF “nerve growth factor” imposta ao GCC direito (inervação cruzada) ocasionaria proliferação de três eventos distintos e consecutivos: proliferação celular, hipertrofia neuronal seguida de morte celular.

No presente estágio, podemos apenas sugerir a existência de uma inervação contralateral suportada pela melhora do quadro clínico durante o período pós-operatório em todos os grupos de estudo. Secundariamente, também podemos inferir que as alterações morfoquantitativas celulares secundárias à ganglionectomia unilateral do GCC estabelecem-se a partir da 8ª semana, período em que observamos significativa perda neuronal (grupo III).

6.5.3 Estimativa global do volume neuronal

Soinila e Ęrankö (1983) descreveram não haver diferença significativa em termos de peso, volume, número e densidade entre os gânglios controle e operados em seu experimento desenvolvido no rato. É necessário salientarmos que o método empregado não era estereológico e para o cálculo empregou-se fatores de correção como a fórmula de Floderus e o método de Abercrombie (ABERCROMBIE, 1946) que dependem de hipóteses geométricas o que os tornam não acurados.

Gabella, Trig e McPhail (1988) relataram que os neurônios encontrados no GCC de ratos tinham um volume de $1600 \mu\text{m}^3$ a $93.000 \mu\text{m}^3$ e a distribuição das células era unimodal prevalecendo os neurônios pequenos. Os autores referiram que o amplo espectro na variação do tamanho dos neurônios possa estar relacionado ao território de inervação destes neurônios, ou seja, neurônios maiores estariam inervando maior quantidade de órgãos alvo.

Através da aplicação de um método com delineamento estereológico em nosso estudo, encontramos que os neurônios dos gânglios operados aumentaram em média 13% para o grupo I, 24% no grupo II e 29% para o grupo III. O aumento do volume dos neurônios sugere uma sobrecarga funcional provavelmente relacionada a uma tentativa do organismo em promover a reinervação simpática contralateral cruzada perdida pela ganglionectomia. A relação entre o aumento do tamanho dos neurônios (área do corpo celular, volume) são discutidas em associação às alterações na densidade numérica e número total de neurônios.

6.6 ESTUDO MORFOMETRICO

A discussão referente ao estudo morfométrico será dividida em itens para melhor compreensão

6.6.1 Área seccional do núcleo neuronal

A ganglionectomia unilateral do GCC não causou alterações significativas nas áreas do núcleo neuronal do GCC de ovinos em todos os grupos estudados. Entretanto, vale a pena salientar que, em média, no grupo I (duas semanas) observa-se o aumento da área do núcleo em 4%, o que pode sugerir uma resposta do organismo promovendo uma hipertrofia nuclear que poderia preceder uma mitose celular como mecanismo compensatório para a sobrecarga funcional imposta ao gânglio remanescente..

O grupo III, também, demonstrou aumento da área do núcleo de 7% entre os gânglios operados e controle, entretanto neste grupo, acreditamos no estabelecimento de uma resposta à maior exigência funcional dos neurônios seguida de morte celular sendo necessária investigação de processos apoptóticos para testar esta hipótese. A discussão detalhada deste resultado encontrado será feita em conjunto com o número total de neurônios encontrados para este grupo. A diferença de ponto de vista entre os aumentos apresentados entre o grupo I e o grupo III ainda deve-se ao fato das áreas do núcleo do grupo III terem se apresentado 75% maiores que os do grupo I, o que poderia refletir a maior adaptabilidade dos neurônios do grupo III em relação ao grupo I pelo tempo de análise entre os grupos. Estas hipóteses também são discutidas em associação às alterações no número total de neurônios.

6.6.2 Área do corpo celular neuronal

Moriyama, Shimada e Goto (1995) em um estudo utilizando secções seriadas do gânglio cervical cranial em ratos (empregando-se amostragem semi-aleatória e aplicação de método de correção de Abercrombie, portanto método não estereológico) descreveram a presença de neurônios pequenos no GCC com áreas em torno de $367 \mu\text{m}^2$. Gabella, Trig e McPhail (1988) relataram que os neurônios presentes no GCC de ratos variavam em tamanho entre $165 \mu\text{m}^2$ a $2500 \mu\text{m}^2$. Estes autores sugeriram que os neurônios maiores possam ser responsáveis por inervarem uma maior quantidade de órgãos-alvo.

Em nosso estudo, aplicando-se métodos com delineamento estereológico, encontramos que os neurônios dos gânglios controle tinham para o grupo I em média $535,2 \mu\text{m}^2$ ($169,5 \mu\text{m}^2$ a $1.172 \mu\text{m}^2$), no grupo II, média de $534,7 \mu\text{m}^2$ ($128,9 \mu\text{m}^2$ a $1.478 \mu\text{m}^2$) e no grupo III, média de $570,8 \mu\text{m}^2$ ($119,1 \mu\text{m}^2$ a $1.715,1 \mu\text{m}^2$). No gânglio operado, os neurônios apresentaram-se maiores que os gânglios controle em $0,17x$ em média para os grupos I e II e em média de $0,14x$ para o grupo III.

Este aumento encontrado no gânglio operado em relação ao gânglio controle foi considerado estatisticamente significativo em cada um dos grupos avaliados permitindo-nos sugerir que a hipertrofia dos neurônios do gânglio operado atue de forma compensatória pela falta de inervação contralateral. O maior nível de significância ($0,0066$) fora encontrado no grupo III (12 semanas), onde os animais apresentaram aumentos de $0,14x$ em média dos gânglios operados em relação ao controle. Este aumento mais significativo foi correlacionado então aos resultados obtidos para volume do neurônio e número total de neurônios para este grupo e sua interação discutida no capítulo referente ao número total de neurônios.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base no delineamento estereológico estocástico empregado no presente estudo, julgamos poder concluir:

1) A ganglionectomia unilateral do gânglio cervical cranial em ovinos é uma técnica confiável e realizável para mimetizar os sinais de síndrome de Horner.

2) A hipertermia da orelha foi facilmente diagnosticada em todos os grupos de estudo sendo um sinal importante para o diagnóstico clínico da doença, juntamente com a presença de ptose até a 8ª semana.

3) A ganglionectomia unilateral ocasionaria uma seqüência de eventos morfoquantitativos celulares na seguinte ordem proposta:

3.1) Proliferação celular no gânglio cervical cranial remanescente.

3.2) Hipertrofia neuronal (núcleo e corpo celular).

3.3) Perda neuronal a partir da terceira semana, sendo mais acentuada a partir da oitava semana.

4) Devido aos achados morfoquantitativos expressos em 3, estudos futuros devem abranger dois aspectos:

4.1) Comprovar a possibilidade de maior produção de NGF “nerve growth factor” pelo território denervado.

4.2) Comprovar a probabilidade da inervação cruzada a partir do proposto em 4.1.

Referências

REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections, **Anatomical Records**, n.94, p. 274-329, 1946.

APPENZELLER, O. **The autonomic nervous system**. Amsterdam: Elsevier, 1990.

APPLETON, A. B.; WAITES, G. M. H. A surgical approach to the superior cervical ganglion and related structures in the sheep. **Journal of Physiology**, n. 135, p. 52-57, 1957.

BAKER, D. M.; SANTER, R. M.; BLAGGAN, A. S. Morphometric studies on the microvasculature of pre- and paravertebral sympathetic ganglia in the adult and aged rat by light and electron microscopic. **Journal of Neurocytology**, n. 18, p. 647-660, 1989.

BAKEWELL, S. The autonomic nervous system. **Update in Anesthesia**, n. 5, art. 6, 2 p., 1995.

BALJET, B.; DRUKKER, J. The extrinsic innervation of abdominal organs in the female rat. **Acta Anatomica**, n. 104, p. 243-267, 1979.

BELL, R. L.; ATWEH, N.; IVY, M.; POSSENTI, P. Traumatic and iatrogenic Horner syndrome: case reports and review of the literature. **The Journal of Trauma Injury, Infection and Critical Care**, v. 51, n. 2, p. 400-404, 2001.

BOYDELL, P. Idiopathic Horner's syndrome in the Golden Retriever. **Journal of Small Animal Practice**, n.36, p. 382-384, 1995.

BRAEUCKER, W. Die nerven der schidddruse und der eptelkörperchen. **Anatomischer Anzeiger**, n. 56, p.225-249, 1923.

CABELLO, C. R.; THUNE, J. J.; PAKKENBERG, H.; PAKKENBERG, B. Ageing of substantia nigra in humans: cell loss may be compensated by hypertrophy. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, n. 28, p. 283-291, 2002.

CANNIZZARO, M. A.; FIOCCO, S.; PIAZZA, L.; DE MARIA, A.; LIARDO, G.; TROIANO, L. The superior laryngeal nerve: an anatomical structure at risk during thyroid surgery, **Minerva Chirurgica**, n. 46, p. 435-444, 1991.

CARDINALI, D. P.; STERN, J. E. Peripheral neuroendocrinology of the cervical autonomic nervous system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 27, p. 573-599, 1994.

CASTRO, M. F. S. **Estrutura e ultraestrutura do complexo ganglionar cervical cranial em gatos (*Felis catus* – LINNAEUS 1758)**. 2001. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2001.

CAVALIERI, B. Geometria indivisibilibus continourum. Bononi: Typis Clementis Ferronij: 1635. Reprint from: Geometria degli indivisibili. Torino: Unione Tipografico-Editrice, Torinese, 1966.

CRUZ-ORIVE, L. M. Particle number can be estimated using a disector unknown thickness: the selector. **Journal of Microscopy**, n. 145, p. 141-152, 1987.

CHUNHABUNDIT, P.; THONGPILA, S.; MINGSAKUL, T.; SOMANA, P. Microvascularization of the common Tree Shrew (*Tupaia glis*) superior cervical ganglion studied by vascular corrosion cast with scanning electron microscopy. **Acta Anatomica**, n. 148, p. 48-56, 1993.

COGGESHALL, R. E.; LEKAN, H. A. Methods for determining number of cell and synapses: a case for more uniform standards of review. **The Journal of Comparative Neurology**, n. 364, p. 6-15, 1996.

DAIL, W. G.; BARTON, S. Structure and organization of mammalian sympathetic ganglia. In: ELFIN, G. (Ed.), **Autonomic ganglia**, Chichester: John Wiley, 1983, p. 3-25.

DAVIES, D. C.; Neuronal numbers in the superior cervical ganglion of the neonatal rat. **Journal of Anatomy**, n. 127, p. 43-51, 1978.

DE ABREU, R. N. **Estrutura e ultraestrutura do complexo ganglionar cervical cranial em eqüinos e suas alterações morfológicas**. 2002. 89 f. Dissertação. (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2002.

ECCLES, J. C. The ultrastructure of the superior cervical ganglion of the cat. the structure of the preganglionic and fibres as studied by serial sections. **Journal of Ultrastructure Research**, n. 8, p. 403-404, 1935.

FICK, W. Beitrag zur kenntnis der vagus-symphathikus-verbindungen unterhalb der schädelbasis. **Zeitschrift für Mikroskopisch-Anatomische Forshung**, n. 2, p. 429-457, 1926.

FIORETTO, E. T. Estrutura e ultraestrutura do complexo ganglionar cervical cranial em cães domésticos (*canis familiaris*) e suas alterações macromorfo-métricas durante o desenvolvimento pós natal. 2002. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2002.

FLEET, D.L.; BELL, C. Topography of functional subpopulations of neurons in the superior cervical ganglion of the rat. **Journal of Neurocytology**, n. 21, p. 55-66, 1991.

GABELLA, G. **The rat autonomic nervous system**. London: Academic Press, 2004. p. 77-109.

GABELLA, G.; BERGGREM, T.; UVELLIUS, B. Hyperthrophy and reversal hypertrophy in rat pelvic ganglion neurons. **Journal of Neurocytology**, n. 21, p. 649-662, 1992.

GABELLA, G.; TRIGG, P.; MCPHAIL, H. Quantitative cytology of ganglion neurons and satellite glial cells in the superior cervical of the sheep. Relationship with ganglion neuron size. **Journal of Neurocytology**, n. 17, p. 753-769, 1988.

GABELLA, G.; UVELLIUS, B. Effect of decentralization or contralateral ganglionectomy on obstruction-induced hypertrophy of rat urinary bladder muscle and pelvic ganglion. **Journal of Neurocytology**, n. 22, p. 827-834, 1993.

GABELLA, G.; UVELLIUS, B. Homotransplant of pelvi ganglion into bladder wall in adult rats. **Neuroscience**, n.83, p. 645-653, 1998.

GUNDERSEN, H. J. G. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. **Journal of Microscopy**, n. 143, p. 3-45, 1986.

GUNDERSEN, H. J. G., BAGGER, P.; BENDSTEN, T. F.; EVANS, S. M.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, n. 96, p. 857-881, 1988.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B. V.; KIÊU, K.; NIELSEN, J. The efficiency in stereology – reconsidered. **Journal of Microscopy**, n. 193, pt. 3, p. 119-211, 1999.

HALL, A. K.; LANDIS, S.C. Principal neurons and small intensely fluorescent (SIF) cells in the rat superior cervical ganglion have distinct developmental histories. **The Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 472-484, 1991.

HEDGER, J. H.; WEBBER, R. H. Anatomical study of cervical sympathetic trunk and ganglia in the albino rat (*Mus norvegicus albinos*). **Acta Anatomica**, n.96, p. 206-217, 1976.

HENDRY, I. A. A method to correct adequately for the changes in neuronal size when estimating neuronal numbers after nerve growth factor treatment. **Journal of Neurocytology**, n. 5, p. 337-349, 1976.

HOF, P. R.; SCHIMITZ, C. Current trends in neurostereology – introduction to the special issue “Recent advances in neurostereology”. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, n. 20, p. 2-3, 2000.

HOFFMAN, H. H. An analysis of the sympathetic trunk and rami in the cervical and upper thoracic regions in man. **Annals of Surgery**, v. 145, p. 94-103, 1957

HOWARD C. V.; REED, M. G. Unbiased stereology: three dimensional measurement in microscopy. BIOS Scientific Publishers, 2004.

HUBBARD, W. C.; ROBINSON, J. C.; SCHMIDT, K.; ROHEN, J. W.; TAMM, E. R.; KAUFMAN, P. L. Superior cervical ganglionectomy in monkeys: effects on refraction and intraocular pressure. **Experimental Eye Research**, v. 68, p. 637-639, 1999.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nômina Anatômica Veterinária**. 4.ed. Zurich, 1994 (Together with nomina histological, 2.ed., 1992 and nomina embriologica veterinaria, 1992)

JONES, A. S.; ROLAND, N. J.; PHILLIPS, D. E. the level of the cervical lymph node metastases: their prognostic relevance and relationship with head neck squamous carcinoma primary sites. **Clinical Otolaryngology**, v. 19, p. 63-71, 1994

KENNY, G. C. T. The “nervus coronarii” of the monkey. An experimental study. **J. Neuropathology Experimental Neurology**. v. 20, p. 563-570, 1961

KISCH, B. Horner’s syndrome, an American discovery. **Bulletin of the History of Medicine**, v. 25, p. 284-288, 1991

KONDO, H. Innervation of SIF cells in the superior cervical ganglia: an ultrastructural study with serial section. **Biology of the Cell**, v. 30, p. 253-264, 1977.

LADIZESKY, M.; CUTRERA, R.; BOGGIO, V.; MAUTALEN, C.; CARDINALI, D. Effect of unilateral superior cervical ganglionectomy on bone mineral content and density of rat’s mandible, **Journal of Autonomic Nervous System**, v. 78, p. 113-116, 2000.

LUEBKE, J.I.; WRIGHT, L.L. Characterization of superior cervical ganglion neurons that project to the submandibular glands, the eyes, and the pineal gland in rats. **Brain Research**, v. 589, p. 1-14; 1992.

MATHEWS, M. R. The ultrastructure of the junctions in sympathetic ganglia of mammals. In: ELFVIN, G. (Ed.), **Autonomic ganglia**, Chichester: John Wiley, 1983, p. 27-66.

MATHEWS, M. R.; OSTBERG A. Effects of preganglionic nerve section upon the afferent innervation of the small granule containing cells in the rat superior cervical ganglion, **Acta Physiol. Pot.**, v.26, p. 215-223, 1973.

MATTHEWS, M. R.; RAISMAN, G. The ultrastructure and somatic efferent synapses of small granule-containing cells in the superior cervical ganglion. **Journal of Anatomy**, v. 105, n. 2, p. 255-282, 1969.

MAYHEW, T. M. Accurate prediction of Purkinje cell number from cerebellar weight can be achieved with the fractionator. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 306, p. 162-168, 1991 (a).

MAYHEW, T. M. An efficient sampling scheme for estimating fibre number from nerve cross sections: the fractionator. **Journal of Anatomy**, v. 157, p. 127-134, 1988.

MAYHEW, T. M. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. **Experimental Physiology**, n.76, p. 639-665, 1991 (b).

MAYHEW, T. M.; GUNDERSEN, H. J. G. 'If you assume, you can make an ass out of you and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. **Journal of Anatomy**, v. 188, p. 1-15, 1996.

MOLLER, M.; LIU, W. Innervation of the rat pineal gland by nerve fibres originating in the sphenopalatine, otic and trigeminal ganglia. A retrograde in vivo neuronal tracing study. **Reproduction Nutrition Development**, v. 39, p. 345-353, 1999.

PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H. J. G. Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by disector and fractionator. **Journal of Microscopy**, v.150, p. 1-20, 1988.

PAPPAS, G. D.; WAXMAN, S. G. Synaptic fine structure: morphological correlates of chemical and electronic transmission. In: Pappas, G. D.; Purpura, D. P. (Ed.) **Structures and function of synapses**, New York: Raven Press Publisher, 1972, p.1-43.

POPKEN, G. J.; FAREL, P. B. Sensory neuron number in neonatal and adult rats estimated by means of stereologic and profile-based methods. **Journal of Comparative Neurology**, v. 386, n. 1, p. 8-15, 1997.

POVER, C. M.; COGGESHALL, R. E. Verification of the disector method for counting neurons, with comments on the empirical method. **The Anatomical Record**, v. 231, p. 573-578, 1991.

RIBEIRO, A. A. C. M.; DAVIS, C.; GABELLA, G. Estimate of size and total number of neurons in superior cervical ganglion of rat, capybara and horse. **Anatomy and Embryology**, n. 208, p. 367-380, 2004.

RIKER, W. K.; SZRENIAWSKI, Z. The pharmacological reactivity of presynaptic nerve terminals in a sympathetic ganglion. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 126, p. 233-238, 1959

ROBINSON, J. C.; KAUFMANN, P. L. Superior cervical ganglionectomy in monkeys: surgical technique. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v. 3, p. 247-251, 1992

RUBIN, E. Development of the rat superior cervical ganglion: Ganglion cell maturation. **The Journal of Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 673-684, March. 1985.

SATO, I.; SATO, T. Communication between the superior cervical sympathetic ganglion and the inferior laryngeal nerve. **Journal of Anatomy**, v. 190, p. 147-148, 1997

SCHMITZ, C.; HOF, P. R. Review design based stereology in neuroscience. **Neuroscience**, n. 130, p. 813-831, 2005.

SHENG, C.; LING, W. J.; MING, X. Z. The gross anatomy of the cranial cervical ganglion and its branches in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). **Veterinary Research Communications**, v. 22, p. 1-5, 1998.

SIEGRIST, G.; DOLIVO, M.; DUNANT, Y.; FOROGLU-KERAMEUS, C.; De RIBAUPIERRE, F.; ROUILLER, C. Ultrastructure of the chromaffin cells in the superior cervical ganglion in rat. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 25, p. 381-407, 1968

SAS – STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **User's guide**: basic and statistic. versão 5. Cary: SAS 2005, p. 1686.

SIWE, S.A. The cervical part of the gangliated cord, with special reference to its connections with the spinal nerves and certain cerebral nerves. **American Journal of Anatomy**, v. 48, p. 179-197, 1931

SKARDA, R. T.; MUIR, W. W.; SWANSON, C. R.; HUBBELL, J. A. E. Cervicothoracic (stellate) ganglion block in conscious horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 1, Jan., 1986.

SOINILA, S.; ERÄNKÖ, O. Increase in the number of non-neuronal cells in superior cervical ganglia of developing rats after contralateral ganglionectomy. **Neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 911-915, 1983.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of numbers and sizes of arbitrary particles using the disector. **Journal of Microscopy**, n. 134, pg. 127-36, 1984.

STROMBERG, M. W. The autonomic nervous system. In. EVANS, H.E., **Miller's anatomy of the dog**. 3. ed., Philadelphia: W. B.Saunders Company, 1993, p. 787-789.

SUGENOYA, A.; ASANUMA, K.; SHINGU, K.; ONUMA, H.; SHIMIZU, T. Clinical evaluation of upper mediastinal dissection for differentiated thyroid carcinoma. **Surgery**, v. 113, p. 541-545, 1993

TAMM, E. R.; ROHEN, J. W.; SCHIMIDT, K.; ROBINSON, J. C. WALLOW, I. H. L.; KAUFMAN, P. L. Superior cervical ganglionectomy in monkeys: light and electron microscopy. **Experimental Eye Research**. v. 65, p. 31-43, 1997.

TANDRUP, T. Unbiased estimates of number and size of rat dorsal root ganglion cells in studies of structure and cell survival. **Journal of Neurocytology**, n. 33, p. 173-192, 2004.

VOLLE, R. L.; KOELLE, G. B. The physiological role of the acetylcholine esterase in sympathetic ganglia. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 133, p. 223-240, 1961.

WILLIAMS, T. H.; PALAY, S. L. Ultrastructure of the small neurons in the superior cervical ganglion. **Brain Research**, v. 15, p. 17-34, 1969.

YOKOTA, R. The granule containing cell somata in the superior cervical ganglion of the rat, as studied by a serial sampling method for electron microscopy. **Zeitschrift fuer Zellforschung**, v. 141, p. 331-345, 1973.

ZERILLI, M.; SCARPINI, M.; BISOGNO, M. L.; DI GIORGIO, A.; CHIAVELLATI, L.; FLAMMIA, M. Superior laryngeal nerve in thyroid surgery. **Annali Italiani di Chirurgia**, v. 65, p. 193-200, 1994