

Fernando Vagner Lobo Ladd

Aspectos quantitativos da neurogênese pós-natal no gânglio cervical cranial de Cutias (*Dasyprocta aguti* - Linnaeus, 1766)

Dissertação 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 obtenção do título de Mestre em Ciências



Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro



São Paulo
2007

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1910
FMVZ

Ladd, Fernando Vagner Lobo
Aspectos quantitativos da neurogênese pós-natal no gânglio cervical cranial de Cutias (*Dasyprocta aguti*) / Fernando Vagner Lobo Ladd. – São Paulo: F. V. L. Ladd, 2007.
72 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2007.

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 Ribeiro.

1. Gânglio cervical cranial. 2. Estereologia. 3. Maturação. 4. Cutia.
I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Capa	2	3	<i>Dasyprocta agouti</i> (Linnaeus, 1766)	(<i>Dasyprocta agouti</i> Linnaeus, 1766)
Ficha catalográfica	2	3	(<i>Dasyprocta agouti</i>)	(<i>Dasyprocta agouti</i> Linnaeus, 1766)



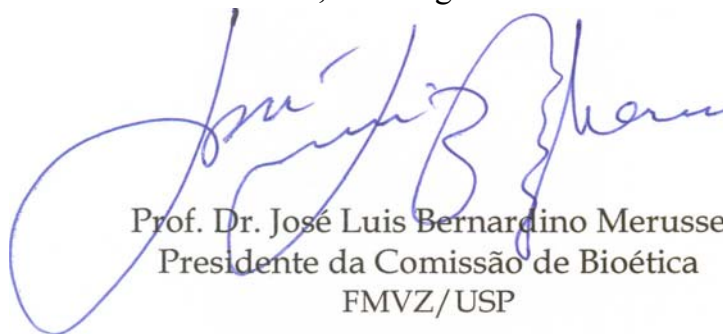
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Aspectos quantitativos da neurogênese pós-natal no gânglio cervical cranial de *Cutias *Dasyprocta aguti**", protocolado sob o n0936/2006, utilizando 12 (doze) *Cutias*, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/08/06".

(We certify that the Research "Quantitative aspects of the pos-natal neurogenesis in cranial cervical ganglion in *Cutias (Dasyprocta aguti)*" , protocol number 936/2006, utilizing 12 (twelve) *Cutias*, under the responsibility of Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 08/16/2006).

São Paulo, 17 de agosto de 2006



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LADD, Fernando Vagner Lobo

Título: Aspectos quantitativos da neurogênese pós-natal no gânglio cervical cranial de *Cutias (Dasyprocta aguti - Linnaeus, 1766)*

Dissertação 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 obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família de sangue, meu pai **Adão Ladd** e minha mãe **Maria Celina Lobo de Souza**, cujo apoio financeiro foi necessário mas de nada valeria se não fosse o incentivo moral, apoio incondicional á todas as minhas escolhas, pelo exemplo de simplicidade, paciência pela minha ausência e pelo fato de proporcionarem a mim a única coisa que levarei por toda a eternidade, o esclarecimento. Dedico Também ao meu irmão **Frederico Jorge Lobo Ladd** que é a melhor fonte de ligação com meu passado*

*Dedico este trabalho também à minha família de escolha, minha menina, irmã, amiga, companheira, cúmplice, mulher e até colega de trabalho, **Aliny Antunes Barbosa Lobo Ladd**, você é essencial em minha vida, não por cumprir todos estes papéis citados, mas por me apoiar e fazer de mim uma pessoa melhor a cada dia sendo quem você é.*

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMENTO

Os desafios da vida são muitos, mas com coragem e ajuda de pessoas que nos estendam a mão, eles não se tornam barreiras, mas o combustível da conquista. Por isso agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

Deus, Alá, Tupã, Natureza, Amor. A energia cósmica que rege o universo pode ter vários nomes, não importa. O que importa é a tradução de seu mais nobre fim em autoconhecimento. E a isso eu agradeço, pois com a conclusão dessa etapa de minha vida, além de tudo, subi mais um degrau rumo ao meu autoconhecimento.

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro que ajudou na realização desta pesquisa.

Agradeço à Universidade de São Paulo por ter feito parte de seu quadro estudantil

Agradeço ao Prof. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, meu orientador, pela oportunidade em vivenciar ciência de qualidade e mostrar o exemplo de como persistência e dedicação são essenciais à vitória.

Agradeço ao Prof. Moacir Franco de Oliveira pela doação dos animais que foram objeto desta pesquisa, além do que, agradeço-o juntamente com sua esposa Raimundinha pela acolhedora e inesquecível oportunidade de estar em sua casa durante os dias de coleta.

Agradeço ao funcionário do CEMAS Antonio Almeida do Santos o “Almeidão” pela ajuda no manejo e coleta dos animais.

Agradeço aos meus colegas de laboratório: Aliny, Luciana, Silvio, Andréa Almeida, Tais, Regina, Lynda, Valquiria, Felipe, Horácio e Bruno Mesquita, e a colegas de outros laboratórios como a, Thais Costa, pela convivência diária e oportunidade de ensinar e aprender sempre.

Deixo um abraço a Silvio Pires Gomes e Luciana Bigaram Abrahão pelos momentos de descontração e diversão, que são também necessários no dia-a-dia.

Agradeço a memória de Wanderley Lima Guidi que não se encontra mais entre nós, mas que me ajudou muito quando cheguei a São Paulo.

Deixo um abraço especial aos meus amigos de Anápolis – GO pelo incentivo e momentos de alegria.

“Amizade é uma igualdade harmoniosa”

Pitágoras

Agradeço a minha primeira professora de Anatomia Rosimeire Alves da Silva, pelos ensinamentos éticos, pela amizade, e por ter despertado em mim o gosto pela ciência.

Agradeço a professora Jussara Rocha Ferreira por ter me ajudado a trilhar os caminhos rumo a pós-graduação.

Ao meu irmão Frederico Jorge Lobo Ladd pela ajuda na parte gráfica e visual deste trabalho.

Aos meus amigos de Goiânia-GO Adelson, Ilma, Alisson e Alym pela amizade, apoio, incentivo e momentos de descontração.

Aos funcionários e demais colegas de pós-graduação, que não vou nomear para não ser indelicado deixando de citar algum, o meu obrigado pela contribuição seja de que forma for.

Degraus

**Subir, galgar, ascender
Atingir a meta desejada
Estar enfim, no alto da escada**

**Olhar pra trás, e ver a longa estrada
À frente muito além...
Outras escadas, mais degraus
Nova jornada**

**Mais adiante,... Lá distante
Entre rios e vales tão bonitos
Novas estradas, outros degraus
E tantos montes**

**A fundir-se na linha do horizonte
Beirando já ao céu,... No infinito
Talvez,... Quem sabe?**

**No topo de uma escada
No fim da estrada
Em outra esfera
Esteja a nossa espera
Uma porta escancarada**

Adão Ladd (1998)

**Aventurar-se
causa ansiedade
porém não aventurar-se
é perder-se;
e aventurar-se
no mais alto sentido
é precisamente
tomar consciência de si mesmo**

Sören Kierkegaard

RESUMO

LADD, F. V. L. **Aspectos quantitativos da neurogênese pós-natal no gânglio cervical cranial de cutias (*Dasyprocta aguti* - Linnaeus, 1766)**. [Quantitative aspects of the post- natal in the cutia's cranial cervical ganglion (*Dasyprocta aguti* - Linnaeus, 1766)]. 2007. 72 f Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

O presente estudo analisou nove gânglios cervicais craniais esquerdos (GCC) de Cutias (*Dasyprocta aguti*) machos oriundos do criatório da Universidade Federal Rural do Semi Árido Nordeste de Mossoró- RN. Nestes animais foi estimado o número total dos neurônios (mono e binucleados), bem como seus volumes, volume do gânglio, a densidade neuronal e densidade de volume neuronal durante o desenvolvimento pós-natal (maturação): animais neonatos, jovens e adultos. Os GCCs foram fixados com solução de formoldeído (4%) em PBS, embebidos em solução de ágar e seccionados sistemática, uniforme e aleatoriamente para a aplicação dos métodos estereológicos entre os quais disector e rotator ópticos. para a estimativa da densidade e do volume neuronal, respectivamente. Houve diferença significativa entre os grupos etários para os parâmetros: volume ganglionar, número total de neurônios binucleados, volume neuronal médio de neuronios mono e binucleados e densidade de volume neuronal. A conclusão é de que a idade influencia quantitativamente a dinamica neuronal do GCC de cutias e futuramente estes dados servirão como base para a investigação da ocorrência de divisão celular durante o período pós-natal em roedores.

Palavras-chave: Gânglio cervical cranial, estereologia, maturação, cutias, roedores

ABSTRACT

LADD, F. V. L. **Quantitative aspects of the post- natal neurogenesis in the cutia's cranial cervical ganglion (*Dasyprocta aguti* - Linnaeus, 1766).** [Aspectos quantitativos da neurogênese pós-natal no gânglio cervical cranial de cutias (*Dasyprocta aguti* - (Linnaeus, 1766)]. 2007. 72 f (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

The present study was pursued in nine left cranial cervical ganglia (CCG) of male cutias (*Dasyprocta aguti*) obtained from the animal house of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido Nordeste em Mossoró- RN. The number of CCG neurons as well as their volume, ganglion volume, numerical density and neuronal volume density were estimated during the post-natal development (maturation), in neonates, young and adult animals, by using 3-D design-based stereological methods, e.g., optical disector and optical rotator. Briefly, CCGs were fixed with a 4% formaldehyde solution in PBS, embedded in a 10% agar solution and exhaustively vibrosectioned (SURS) in order to accordingly perform the relevant stereological estimations. There were significant difference between age groups for the follow parameters: ganglion volume, total number of binucleated neurons, mean neuronal volume of mono and binucleated neurons and volume density of neurons. The conclusion is of that the age quantitative influences the dinamic of neuronal cells of the GCC of agoutis. In the future these data will serve as basis for the inquiry of the occurrence of cellular division during the post-natal period in rodents

Key words: Superior cervical ganglia, SCG, stereology, post-natal development, cutias, rodents

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Região cervical ventro-lateral e proximal esquerda de cutia evidenciando o gânglio cervical cranial esquerdo (GCC), gânglio distal esquerdo do nervo vago (GDV), artéria carótida comum esquerda (Seta).-----45
- Figura 2 Fotomicrografia do GCC de cutia mostrando dois planos ópticos subseqüentes (I e II) nos quais se observa neurônios mononucleados (**M**) e binucleados (**B**) que surgem à medida que se aprofunda no eixo Z da secção óptica e os mesmos são amostrados utilizando-se uma “unbiased counting frame”. Técnica de coloração: azul de toluidina. Escala de barra: 20µm.-----48
- Figura 3 Densidade numérica de neurônios mono e binucleados. em cutias neonatas, jovens e adultas. Não houve diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$). As barras horizontais indicam as médias dos grupos-----52
- Figura 4 Volume ganglionar e Número total de neurônios em cutias neonatas jovens e adultas. Houve diferença significativa entre os grupos(*) ($p<0,05$) para volume ganglionar e não significativa ($p>0,05$) para número total de neurônios. As barras horizontais indicam as médias por grupo-----53
- Figura 5 Número total de neurônios mono e binucleados em cutias neonatas jovens e adultas. Houve diferença significativa entre os grupos (*) ($p<0,05$) para número total de neurônios binucleados e não significativa ($p>0,05$) para número total de neurônios mononucleados. As barras horizontais indicam as médias por grupo-----54
- Figura 6 – Volume neuronal médio de neurônios mono e binucleados em cutias neonatas, jovens e adultas. Houve diferença significativa entre os grupos (*) ($p<0,05$) para ambos os parâmetros. As barras horizontais indicam as médias por grupo -----55

Figura 7 – Densidade de volume neuronal em cutias neonatas, jovens e adultas. Houve diferença significativa entre os grupos (*) ($p < 0,05$). As barras horizontais indicam as médias por grupo -----56

Figura 8- Microestrutura do gânglio cervical cranial de cutia jovem com destaque para a imunorreatividade de seus neurônios mono (cabeça de seta branca) e binucleados (cabeças de seta pretas) ao Brd-U. Note que a imunomarcção (cor marrom) ocorre predominantemente no pericário e não no núcleo neuronal. Reação de imunohistoquímica enzimática desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride" (DAB). Escala de barra= 20 μm -----57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Peso corpóreo e peso do GCC dado em gramas (g), comprimento, Largura e espessura do gânglio cervical cranial esquerdo dado em milímetros (mm) de cutia durante a maturação, observa-se também as médias, desvio padrão (DP) e coeficiente de Variação (CV) - São Paulo – 2007.-----46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	25
3 REVISÃO DE LITERATURA	27
3.1 Macroestrutura e importância funcional	27
3.2 Microestrutura e aspectos quantitativos	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Materiais	34
4.2 Métodos	34
4.2.1 Administração da bromodeoxyuridina (Brd-U)	34
4.2.2 Dissecção e individualização do GCC	35
4.2.3 Reação imunohistoquímica	36
4.2.4 Estudo Estereológico	37
4.2.4.1- Densidade neuronal (densidade numérica) (N_v)	37
4.2.4.2- Volume do Gânglio (V_{GCC})	38
4.2.4.3- Número total dos neurônios do GCC	39
4.2.4.4 Volume neuronal médio (\bar{v}_N)	40
4.2.4.5 Densidade de volume neuronal (V_v)	41
4.2.5 Análise Estatística	41
5 RESULTADOS	44
5.1 Macroestrutura	44
5.2 Microestrutura	46
5.3 Estudo estereológico	47
5.3.1 Densidade numérica neuronal (N_v)	48
5.3.1 Densidade numérica neuronal (N_v)	49
5.3.2 Volume Ganglionar (V_{GCC})	49
5.3.3 Número total de neurônios (N)	49
5.3.4 Volume neuronal médio (\bar{v}_N)	50
5.3.5 Densidade de volume (V_v)	50
5.4 Código neuronal químico	50
6 DISCUSSÃO	59
6.1 Macroestrutura	59
6.2 Microestrutura	59
6.3 Estudo Quantitativo	60
6.3.1 Densidade numérica Neuronal (NV)	60
6.3.2 Volume ganlgionar (V_g)	61
6.3.3 Número total de Neurônios (N)	62
6.3.4 Volume médio neuronal (\bar{v}_N)	63
6.1.5 Densidade de Volume (V_v)	64
7 CONCLUSÃO	67
8 REFERÊNCIAS	69

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nesta pesquisa o gânglio cervical cranial (GCC) da cutia serviu como modelo experimental para a uma primeira fase de investigação da dinâmica neuronal pós-natal que servirá de base, futuramente, para um estudo específico sobre a neurogênese pós-natal nesta espécie. A cutia é um roedor da família Dasyproctidae e está amplamente difundida nos biomas nacionais sendo o terceiro roedor brasileiro em massa corporal, vindo logo após a capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e a paca (*Agouti paca*). O estudo morfoquantitativo funcional deste animal de massa corpórea intermediária poderá proporcionar futuras correlações entre grandes roedores selvagens e roedores de laboratório muito bem conhecidos como o rato que é a espécie de referência para muitos estudos.

O sistema nervoso autônomo consiste em um extenso arranjo de nervos e gânglios, conectados ao sistema nervoso central por um lado e às vísceras por outro. Muitos gânglios autônomos podem ser reconhecidos a olho nu como sendo espessamentos ou protrusões ao longo dos troncos nervosos ou como a confluência de vários nervos, sendo classificados topograficamente em paravertebrais, pré-vertebrais, paraviscerais e intramurais. Estes gânglios não são apenas simples estações de retransmissão, mas locais de convergência, divergência, facilitação e inibição de impulsos nervosos (MATTHEWS, 1983; KRENLEN, 1984; BAKEWELL, 1995; GABELLA, 2004).

O GCC (um gânglio paravertebral) situa-se dorsalmente ao nervo vago e próximo à bifurcação da artéria carótida comum, innervando estruturas cefálicas e cervicais tais como: íris, glândula pineal, membrana nictitante, músculo de Müller, glândula submandibular, tireóide, língua, mucosa oral, região cutânea da face,

orelha e do pescoço (FLEET; BELL, 1991). Ainda é responsável pelo suprimento simpático de toda a região da cabeça, emitindo fibras pós-ganglionares para alguns nervos cranianos, bem como para a túnica adventícia de todas as artérias cranianas (KÖNIG et al., 1999).

As pesquisas sobre estrutura e função dos gânglios autonômos, predominantemente utilizam o GCC devido ao seu fácil acesso e tamanho o que permite a sua precisa localização. Injúrias na região cervical podem desencadear disfunções simpáticas, sendo que a principal delas é a síndrome de Horner representada por um grupo de sinais clínicos que incluem anisocoria, enoftalmia, protrusão da terceira pálpebra, ptose e aumento da temperatura da face como resultado da vasodilatação periférica. Esta síndrome pode acometer tanto animais (principalmente gatos, cães e eqüinos) quanto humanos (BOYDELL, 1995; BELL et al. 2001; OZEL, 2004).

Neurônios de mamíferos são geralmente mononucleados. Em gânglios simpáticos de médios e grandes roedores: paca (*Agouti paca*), capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), cobaia (*Cavia porcelus*) e lagomorfos: coelhos (*Oryctolagus cuniculus*); têm sido descritos neurônios binucleados (FORSMAN et al, 1989; SASAHARA et al., 2003; RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004; RIBEIRO, 2006) contudo não sabemos se este é um padrão presente em todos os roedores, visto que ratos raramente apresentam neurônios binucleados.

Nesta primeira fase do estudo, o gânglio cervical cranial de cutias foi analisado, principalmente, sob o aspecto morfoquantitativo (estereológico) e etário. O estudo foi conduzido em três períodos distintos do desenvolvimento pós-natal: neonatos, jovens, adultos, permitindo que se fizesse uma associação entre idade,

número total de neurônios (especialmente os binucleados), volume ganglionar e massa corporal.

Adicionalmente e com o uso de marcadores específicos de ciclo celular, como o bromodeoxyuridina (Brd-U), investigamos, preliminarmente, a resposta dos neurônios do GCC de cutias ao Brd-U.

Futuramente, pretendemos investigar, quimicamente e quantitativamente, a possível ocorrência de divisão celular durante o período pós-natal (maturação e envelhecimento), com o intuito de elucidar os mecanismos que regem a dinâmica e plasticidade neuronal em roedores selvagens.

OBJETIVOS

2 Objetivos

Gerais:

Avaliar por meio de métodos tridimensionais (com delineamento estereológico) possíveis alterações morfoquantitativas dos neurônios do GCC durante o desenvolvimento pós-natal (maturação).

Específicos:

Analisar os seguintes parâmetros do gânglio cervical cranial em cutias de diferentes idades:

- ✓ - Densidade Neuronal (N_V)
- ✓ - Volume Ganglionar (V_{GCC})
- ✓ - Numero total de neurônios mononucleados (N_{mono})
- ✓ - Numero total de neurônios binucleados (N_{bi})
- ✓ - Numero total de neurônios (N)
- ✓ - Volume médio de neurônios mononucleados ($\bar{v}_{N mono}$)
- ✓ - Volume médio de neurônios binucleados ($\bar{v}_{N bi}$)
- ✓ - Densidade de volume de neurônios mono e binucleados (V_V).

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Esta seção dedica-se a descrição da literatura que forneceu suporte científico para a condução desta pesquisa e está subdividida em tópicos como se segue:

3.1 Macroestrutura e importância funcional

Os gânglios paravertebrais são conectados entre si e formam duas cadeias (ou nervos ganglionares), as cadeias simpáticas, que se sustentam na coluna vertebral e são conectados aos nervos espinhais, conseqüentemente conectadas à medula espinhal, separadas por troncos de nervos curtos, os ramos comunicantes “brancos” (GABELLA, 2004). O estudo anatômico do gânglio cervical cranial (GCC) é o mais realizado devido ao seu fácil acesso, tamanho e dimensões de seus territórios alvos. Macroscopicamente, vários estudos tem evidenciado relativa semelhança quanto à localização e posição do GCC. Cui-Sheng et al. (1998) estudando a anatomia deste órgão em camelos (*Camelus bactrianus*) encontram uma estrutura bem desenvolvida com medias de comprimento e largura e espessura variando respectivamente entre 15-20 mm, 4-6 mm, e 3 mm. Sua localização inclui a superfície rostrolateral do músculo largo da cabeça, ventral ao músculo esternocéfálico e coberto pela glândula mandibular e o eixo longo é paralelo ao nervo vago, em cães o GCC foi localizado coberto pelo músculo digástrico, que deve ser removido para visualização, este é situado cranialmente ao gânglio distal do vago, em formato fusiforme apresentou 4-6 mm de comprimento no eixo longo e 2,5 mm no eixo curto, este apresenta ligação com o nervo hipoglosso (FIORETTO et al., 2007). Os objetivos de Bao-ping et al. (2005), foram o de descrever a forma,

localização e arranjo dos ramos do GCC da espécie *Bos grunniens*, bovino comumente encontrado no Tibet. Nesta espécie o GCC tem formato fusiforme apresentando as seguintes medidas 19,72 mm de comprimento, 7,65mm de largura e 4,55 mm de espessura. Em suínos kabak et al. (2005) observaram o GCC posicionado crânio-ventralmente ao gânglio distal do vago, medialmente à extremidade de processo jugular, dorsal a base da cartilagem epiglote, ventral ao Atlas e medial a raiz comum formada pelas artérias carótida interna e artéria occipital. As dimensões do GCC para suínos adultos foram 17,74 mm de comprimento, 3mm de largura e 2,58mm de espessura.

Recentemente Kabak (2007) confirmou a localização do GCC em cobaias (*Cavia porcellus*) caudoventralmente ao gânglio distal do nervo vago, medialmente ao músculo digástrico e hioglosso, ventro-lateral ao músculo longo da cabeça, ventral a bula timpânica apresentou o formato oval comumente observado.

A importância no estudo do GCC pode ser também caracterizada pela sua relação com a Síndrome de Horner, que caracteriza um conjunto de sintomas relacionados com a perda momentânea ou permanente da inervação autonômica simpática, sendo secundária a processos inflamatórios e/ou compressivos do GCC (devido a neoplasias benignas ou malignas). Ainda, destacam-se na morfopatogênese da síndrome de horner os procedimentos de causa hiatrogênica, ou seja, intervenção cirúrgica inacurada na região cervical ocasionando lesão no GCC e/ou em suas fibras.

Ozel (2004) relata um caso incomum, em que uma criança, após toracostomia, um procedimento comum aplicado em varias patologias pulmonares, apresentou sintomas compatíveis com a Síndrome de Horner, miose, ptose e enoftalmia devido a uma interrupção do fluxo de inervação dos neurônios pré-

gaglionares de segunda ordem. Além disso, bloqueios anestésicos loco-regionais na região cefálica e cervical podem ocasionar sintomas clínicos relacionados à esta síndrome (ELIAS, 2000).

3.2 Microestrutura e aspectos quantitativos

No GCC encontram-se vários tipos celulares SIF cells “small intensely fluorescent cells”, células endoteliais, fibroblastos, mastócitos, em acréscimo aos neurônios ganglionares principais (GABELLA, 2004).

Devor (1985) e colaboradores, usando métodos estereológicos para contagem concluíram que ocorreu um aumento de 50% no número de neurônios no do gânglio da raiz dorsal lombar (DRG) em ratos que aumentaram o peso de 250 para 400g.

De outra parte Coggeshall et al. (1994) e Pover et al. (1994), usando o disector físico, não encontraram evidências de aumento do número neuronal em dois estudos feitos separadamente em ratos, se os ratos adultos tivessem mais neurônios, este número de neurônios poderia ter sido devido a neurogênese, diferenciação tardia ou transdiferenciação. Em um ou outro evento, existiria a possibilidade de que os mecanismos responsáveis para a adição do neurônio poderiam ser recrutados para compensar os danos resultantes de ferimento ou de doença, dizem os autores. Estes resultados discrepantes podem ter ocorrido devido a inaccurácias metodológicas, ainda que usando métodos estereológicos.

Em outro estudo, relacionando possíveis relações alométricas entre número total de neurônios e de axônios do GCC, revelou uma correlação entre neurônios pré

e pós-ganglionares que parece aumentar em função do tamanho do animal. Não obstante, foi observado também que o número de fibras não aumenta de acordo com o tamanho do animal, mas varia muito dentro de uma mesma espécie. (EBESSON, 1968a).

Trabalho semelhante foi desenvolvido por Ribeiro, Davis e Gabella (2004), estudando a associação entre volume ganglionar, tamanho e número total de neurônios no GCC de espécies adultas cujo peso corporal varia em quase 1000 vezes (ratos, capivaras e eqüinos). A principal conclusão foi de que número total de neurônios é dependente da massa corporal do animal, entretanto isto não é necessariamente verdadeiro em relação ao tamanho neuronal.

A binuclearidade neuronal foi recentemente investigada no GCC de capivaras jovens, tendo sido reportado um diminuição de 13% na freqüência de neurônios binucleados e uma diminuição de 23% no número total de seus neurônios em relação ao mesmo gânglio de capivaras adultas (RIBEIRO, 2006).

Em outro estudo, foi encontrada uma diferença significativa entre ambas as regiões (dorsal e ventral) do Núcleo Geniculado Lateral (NGL) de ratos albinos, no que diz respeito à distribuição dos neurônios binucleados. A distribuição destas células é de cerca de 3% do total neuronal na região dorsal, contra 5% na região ventral. Ainda, neurônios menores eram os que apresentavam menores freqüências de células binucleadas (GUADIX et al., 1979). Efetivamente, é fundamental conhecer se a existência desses neurônios binucleados é aleatória ou se realmente existem mecanismos reguladores da dinâmica celular.

Na tentativa de entender como grandes mamíferos conseguiam manter o controle da inervação de estruturas tão mais extensas e massivas que as homólogas de pequenos animais, o gânglio cervical superior ou GCC de quatro roedores (rato,

hamster, camundongo e cobaia) e um lagomorfo (coelho) foi escolhido para análises quantitativas, buscando correlacionar o número de neurônios pré e pós-sinápticos, número de axônios inervando cada célula ganglionar (convergência), e o número de células ganglionares inervando cada axônio (divergência) com o tamanho do animal. A média de variação de peso entre animais foi de 60 vezes, aproximadamente. Entretanto, o número total de neurônios aumentou cerca de 4 vezes entre o menor (camundongos de 25g) e o maior (coelhos de cerca de 1700g); e o número de neurônios pré-ganglionares aumentou em duas vezes. Concluiu-se, que o número de células neuronais no sistema simpático não aumenta proporcionalmente com o tamanho do animal, mas o faz alometricamente (PURVES et al., 1986).

Gânglios celíaco-mesentéricos de cobaias e coelhos são conhecidos por apresentarem inúmeros neurônios binucleados. A proporção relativa desses neurônios, sua ultra-estrutura e conteúdo de DNA foram analisados no gânglio celíaco-mesentérico de cobaias, mostrando que cerca de 60% das células nervosas de animais adultos eram mononucleadas e as 40% restantes binucleadas. Em contrapartida, em animais com 60 dias de vida, a proporção foi de 50% para cada tipo de neurônio. Após estudo, observou-se que neurônios binucleados contêm o dobro de DNA comparados aos mononucleados, quantificação esta realizada por métodos densitométricos e colorímetros. Segundo os autores, a gênese de neurônios binucleados ocorreria pela interrupção das mitoses durante o processo de diferenciação, embora não há explicações conclusivas sobre o fato ainda. Os autores concluíram que são necessários novos estudos caracterizando esses neurônios por meio de métodos mais modernos da biologia molecular. (FORSMAN et al., 1989).

A presença de neurônios binucleados tem sido também reportada no gânglio celíaco-mesentérico de lagomorfos (coelhos). Aspectos microestruturais qualitativos deste gânglio foi descrita usando-se a microscopia de luz de secções semi-finas. Embora, este estudo tenha reportado a existência de tais células, porém não descreveu os aspectos funcionais destes neurônios binucleados. (SASAHARA, et al. 2003).

A relação do gânglio cervical cranial com a Síndrome de Horner está bem descrita em um estudo de 2002, onde uma fêmea canina Airedale Terrier de 9 anos de idade foi eutanasiada e sofreu necropsia após um progressivo caso clínico que incluía a Síndrome de Horner (caracterizada clinicamente como uma doença inflamatória restrita a nervos periféricos, raízes nervosas e gânglios específicos), ptose palpebral unilateral e atrofia unilateral dos músculos mastigatórios. Esta síndrome é comumente diagnosticada em cães e gatos, sendo a sua classificação, e sua morfopatogênese ainda desconhecidos (PANCIERA et al. 2002).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Nove gânglios cervicais craniais esquerdos (GCC) foram utilizados nesta pesquisa, obtidos de nove cutias machos (*Dasyprocta aguti*) oriundas, do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres-(CEMAS) entidade credenciada e registrada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) como criadouro científico sob o registro nº 12.492-000404 e pertencente à Universidade Federal Rural do Semi-Árido Nordestino (UFERSA) em Mossoró –Rio Grande do Norte (RN).

Os animais foram separados em três grupos, de acordo com a fase do desenvolvimento pós-natal:

Grupo I: Três animais neonatos (dois ou três dias de idade e com pesos entre 148 e 155 g).

Grupo II: Três animais jovens (um ou dois meses de idade e com pesos entre de 225g e 266g)

Grupo III: Três animais adultos (três anos de idade e com pesos entre 1,6 e 2,6 kg).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Administração da bromodeoxyuridina (Brd-U)

Tendo como base o protocolo de VALERO et al. (2005) para a administração de bromodeoxyuridina (Brd-U), um marcador de ciclo celular, síntese de DNA e, portanto sugestivo de atividade mitótica (FAREL, 2003; TAUPIN, 2007) os animais foram injetados intraperitonealmente com doses de 50 $\mu\text{m/g}$ de Brd-U numa concentração de 25mg/ml, diluídas em tampão fosfato salino (PBS) (0,1 M e pH de 7,4), nos períodos de 24 e de 2h antes de serem ortoeutanasiados.

O procedimento de ortoeutanasia incluiu a tranquilização ou mediação pré-anestésica (MPA) dos animais com azaperone (4mg/kg) via intramuscular seguida da aplicação de sulfato de atropina (0,06mg/kg) pela mesma via e da associação de cloridrato de quetamina (20mg/kg) e cloridrato de xilazina (1,5mg/kg) todos por via intramuscular, ambos na mesma seringa, para indução da anestesia. Logo em seguida os animais foram ortoeutanasiados com aplicação de uma overdose de pentobarbital sódico (1g) (80mg / Kg i. p.).

4.2.2 Dissecção e individualização do GCC

Com uma incisão na região cervical ventro-lateral esquerda expôs-se o feixe vásculo-nervoso esquerdo constituído pelas seguintes estruturas: a artéria carótida comum esquerda, a veia jugular interna esquerda e o tronco vago-simpático esquerdo. Uma cânula bulbada foi introduzida no ventrículo cardíaco esquerdo e cerca de 10% do peso do animal em volume de solução de lavagem (PBS, nitrito de sódio e heparina) foram perfundidos pela aorta ascendente e o mesmo volume de solução fixadora de formoldeído (4%) em PBS (0,1 M e pH = 7,4) foi também perfundido pela aorta ascendente.

O tronco simpático cervical esquerdo foi isolado do nervo vago homolateral e seguido ao longo da artéria carótida comum ipsilateral em direção ao GCC esquerdo. A seguir o GCC foi dissecado, seccionado, pesado (peso molhado) e finalmente medido para os seus três eixos: comprimento, largura e espessura, usando o paquímetro digital Digimess®.

O GCC esquerdo foi imerso na mesma solução fixadora perfusora por uma a duas semanas sendo depois verticalizado (BADDELEY, 1986), embebido em solução de Ágar (10%) e seccionados, sistemática, uniforme e aleatoriamente com 40 µm de espessura, por meio de micrótomo de lâmina vibratória (vibrótomo). Finalmente os cortes histológicos foram corados com solução de azul de toluidina e analisados com o auxílio de um software estereológico (CAST®).

4.2.3 Reação imunohistoquímica

O estudo neuroquímico teve, até o momento, um caráter qualitativo e descritivo. Futuramente, será realizado o estudo quantitativo do código químico dos neurônios do GCC.

Brevemente, o protocolo da reação consistiu do bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se peróxido de hidrogênio (0,5% em etanol 50%) durante 30 minutos seguido de bloqueio com soro normal de cabra (10% em PBS, pH 7.4, 0,1M) durante 30 minutos, outra lavagem em PBS (15 minutos) e incubação em anticorpo primário monoclonal “anti-mouse” bromodeoxyuridina (Brd-U) (1:100) durante 48 horas. À seguir procedeu-se à lavagem em PBS (15 minutos) seguido de incubação em anticorpo secundário “goat anti-mouse” conjugado com “horseradish

peroxidase” (HRP) (1:200) durante uma hora. Os cortes foram então novamente lavados e a reação foi desenvolvida utilizando-se a “3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride” (DAB, Sigma®) por 45 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS (15 minutos), desidratados em séries crescentes de etanóis e xilóis e montados sob lamínula com DPX (FLUKA®) e à seguir visualizados por meio da estação de microscopia de luz e epifluorescência Leica DM 6000®.

4.2.4 Estudo Estereológico

Os parâmetros estereológicos investigados foram:

4.2.4.1- Densidade neuronal (densidade numérica) (Nv)

A densidade numérica (Nv) é a relação entre o número total de objetos discretos contados (neste caso, os neurônios do GCC) e o volume total dos disectors utilizados para contá-los (STERIO, 1984; MAYHEW e GUNDERSEN, 1996; HOWARD e REED, 2005;)

Para obter estes dados, foi usada esta fórmula:

$Nv: \sum Q^- / \sum t \times a$, onde:

t = altura de cada disector;

a = área teste bidimensional imparcial usada para a amostragem das partículas a serem contadas;

txa = volume de cada disector;

Q^- = o número das partículas contadas em cada disector utilizado.

O número de dissectores utilizados para cada grupo foi de: 27 para neonatos, 30 para jovens e 45 para adultos onde contou-se respectivamente em média, 269, 174 e 213 neurônios mononucleados e 101, 82 e 122 neurônios binucleados. E foram estimados separadamente o Nv para neurônios mononucleados (Nv_{mono}) e o Nv para neurônios binucleados (Nv_{bi}) em cada GCC.

4.2.4.2- Volume do Gânglio (V_{GCC})

Para estimar o volume do gânglio, foi usado o Princípio de Cavalieri aplicado aos cortes histológicos do GCC. (MAYHEW e OLSEN, 1991; HOWARD e REED, 2005).

Antes, porém, cada GCC foi verticalizado, embebido em solução de Ágar (10%) e seccionado exaustivamente (40 μ m de espessura) por meio de um micrótomo de lâmina vibratória Leica® VT100S. Este procedimento gerou um conjunto de secções com espessura média T.

Assim como Ribeiro, Davis e Gabella. (2004) para o GCC de cavalos e capivaras e por Mayhew e Olsen (1991) para o encéfalo humano, a seguinte fórmula foi usada para estimar o volume do gânglio:

$$Vg = T \times \sum A, \text{ onde:}$$

T = espessura média das secções ganglionares;

A = área das secções ganglionares.

O coeficiente de erro (CE) para a estimativa de volume pelo Princípio de Cavalieri $CE(V_{GCC})$ foi estimado de acordo com a fórmula modificada por Gundersen et al. (1999).

A formula utilizada foi:

Variância “noise” da contagem de pontos:

$$\text{Var [noise]} = c. \alpha \cdot \sqrt{(n. \Sigma P)}$$

Onde **c** é uma constante ($c = 0,0724$)

α é um coeficiente determinado pela forma básica do órgão

a= área média das secções, **b**= perímetro médio das secções $\alpha = b / \sqrt{a}$

n é o número de secções utilizadas

ΣP é o número total de pontos utilizados para estimar a área das secções.

Variância devido a amostragem sistemática e uniformemente aleatória (surs)

$$\text{Var [srs]} = (3(A-\text{var}[\text{noise}])-4B+C)/240$$

$$\text{CE} = \sqrt{\text{var}[\text{total}]}$$

Os valores médios para CE (V_{GCC}) nos grupos etários estudados: neonatos, jovens e adultos, foram, respectivamente 2,76%, 7,83% e 2,17%.

4.2.4.3- Número total dos neurônios do GCC

O número total de neurônios do GCC foi estimado usando-se a combinação do disector óptico (STERIO, 1984; POVER; COGGESHALL, 1991; WEST et al. 1991; MAYHEW e GUNDERSEN, 1996; HOWARD e REED, 2005) e do Princípio de Cavalieri. O disector óptico consiste em contar o número de partículas, neste caso os neurônios do GCC (Q⁻) conforme os mesmos são amostrados ao longo de planos focais sucessivos no eixo Z (MAYHEW e GUNDERSEN, 1996; WEST et al. 1991; LADEKARL et al, 1997). O disector óptico estima a densidade numérica (densidade

neuronal) (N_v) dos neurônios dentro de um volume conhecido, neste caso o volume do GCC.

Multiplicando-se a densidade neuronal pelo volume ganglionar temos o número total de neurônios do GCC (N) que foi estimado separadamente para neurônios mononucleados (N_{mono}) e para neurônios binucleados (N_{bi}). Desta forma, o número total de neurônios (N_{total}) por GCC foi obtido a partir da somatória de N_{mono} e N_{bi} .

Uma estimativa rápida da variância associada a estimativa de (N) ($CE(N)$) pode ser obtida utilizando-se a seguinte fórmula proposta por Gundersen et al. (1999):

$$CE(N): 1/\sqrt{\Sigma Q}$$

Os valores médios para $CE(N)$ nos grupos etários estudados: neonatos, jovens e adultos, foram, respectivamente, 6,13%; 7,67% e 6,87% para neurônios mononucleados ($CE(N_{mono})$) e 10,0%; 11,54% e 9,03%. para neurônios binucleados ($CE(N_{bi})$)

4.2.4.4 Volume neuronal médio (\bar{v}_N)

O volume neuronal foi estimado pelo método do rotator (VEDEL, JENSEN e GUNDERSEN, 1993). Este método permite estimar o volume médio e a distribuição volumétrica das partículas independentemente da sua forma, distribuição ou orientação.

A seguinte fórmula foi utilizada para a estimativa do volume neuronal:

$\bar{v}_N = 4\pi/3 \cdot \bar{l}_n^3$, onde \bar{l}_n é uma distância medida à partir de um ponto fixo da célula ou fora dela, até uma borda arbitrariamente escolhida na mesma.

As estimativas para \bar{v}_N foram feitas separadamente: volume médio de neurônios mononucleados ($\bar{v}_{N \text{ mono}}$) e volume médio de neurônios binucleados ($\bar{v}_{N \text{ bi}}$).

4.2.4.5 Densidade de volume neuronal (V_V).

A fração de volume que as células neuronais ocupam no volume de GCC foi determinada pela amostragem de campos histológicos que foram escolhidos de modo sistemático uniforme e aleatório utilizando-se um sistema teste quadrático. Foram contados o número total de pontos que atingiam os neurônios do GCC (PN_{GCC}) e o número total de pontos que tocavam o espaço referencia (PV_{GCC}). A razão entre estas somatórias determina a densidade de volume ou volume fracional neuronal do GCC. Esta estimativa varia de 0 a 1 e geralmente é expressa em porcentagem. (HOWARD e REED, 2005; RIBEIRO, 2006; DE LIMA et al. 2007).

. A seguinte fórmula foi utilizada para estimar a densidade de volume neuronal:

$$V_V = \Sigma PN_{GCC} / \Sigma PV_{GCC}$$

4.2.5 Análise Estatística

A análise estatística espacial foi feita com o auxílio do Software estatístico Minitab 15[®] (2007) e levando em conta os princípios de amostragem sistemática e uniformemente aleatória (GUNDERSEN et al. 1999) onde para as variáveis que

apresentaram distribuição simétrica e com igualdade de variância (homocedasticidade), utilizamos o teste one-way ANOVA seguido pelo teste de TUKEY e FISHER como “post-hoc”. No entanto, quando as variáveis em estudo apresentaram uma distribuição não simétrica e/ou não apresentaram igualdade de variância, utilizamos os testes de mediana de MOOD de KRUSKAL–WALLIS e MANN-WHITNEY.

Valores foram considerados como significativos quando a probabilidade ou índice de significância (p) era menor que 0,05 ($p < 0,05$). Não obstante, uma “border line” significância pôde ser reconhecida quando $p = 0,06$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados à seguir são expressos da seguinte forma: média (CV) onde CV é o coeficiente de variação total ou observado, sendo a razão entre o desvio padrão e a média.

5.1 Macroestrutura.

Macroscopicamente e topograficamente, o GCC da cutia (*Dasyprocta aguti*) é facilmente identificado seguindo-se o tronco vago-simpático até a bifurcação da artéria carótida comum, na região proximal do pescoço. Desta forma o GCC encontra-se ventral e medialmente à artéria carótida interna e, ainda, ventralmente ao gânglio distal do nervo vago (Figura 01).

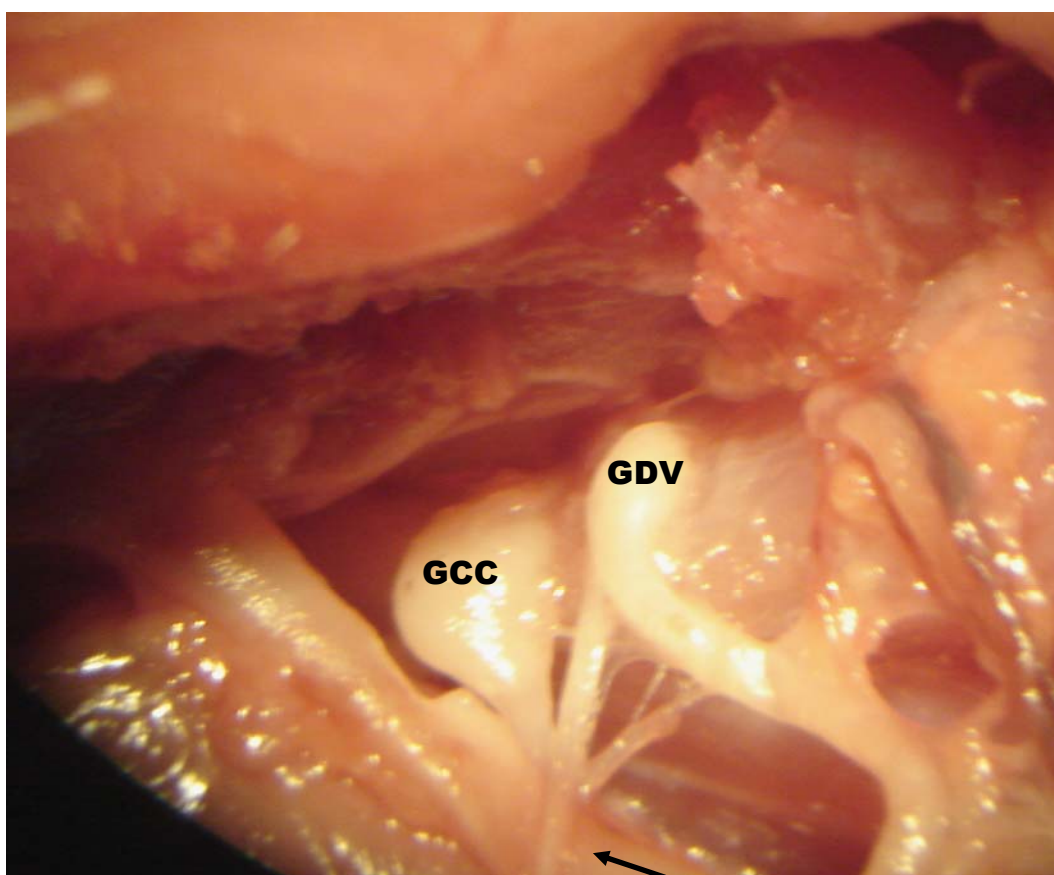


Figura 1 Região cervical ventro-lateral e proximal esquerda de cutia evidenciando o gânglio cervical cranial esquerdo (GCC), gânglio distal esquerdo do nervo vago (GDV), artéria carótida comum esquerda (seta).

Os dados macromorfométricos do GCC estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1- Peso corpóreo e peso do GCC esquerdo de cutias dado em gramas (g), comprimento, largura e espessura do GCC esquerdo dado em milímetros (mm) durante a maturação. Os valores de cada parâmetro são expressos como a sua média por grupo seguida do seu coeficiente de variação (CV).- São Paulo – 2007

Grupo	Peso Corpóreo (g)	Peso GCC (g)	Comprimento GCC (mm)	Largura GCC (mm)	Espessura GCC (mm)
	155	0,0037	2,82	2,37	1,12
	148	0,0031	2,88	2,34	1,08
G1 Neonatos	121	0,0023	2,34	1,78	1,21
Média	141,33 (0,127) ^a	0,0030 (0,231) ^a	2,68 (0,110) ^a	2,16(0,153) ^a	1,14(0,058) ^a
	225	0,0048	3,16	1,88	1,06
	225	0,0042	3,07	2,06	1,11
G2 Jovens	266	0,0052	3,10	1,94	1,26
Média	238,66 (1,69) ^a	0,0047(0,00004) ^a	3,11(0,0033) ^b	1,96 (0,0065) ^a	1,14 (0,0074) ^a
	1682	0,0063	4,67	1,94	1,35
	2051	0,0072	4,26	2,36	1,11
G3 Adultos	2280	0,0087	4,73	2,77	1,40
Média	2004,33 (0,150) ^{b*}	0,0074 (0,163) ^{b**}	4,55(0,056) ^{c***}	2,36 (0,176) ^a	1,28(0,120) ^a

^{a, b, c} assinalam os valores médios de cada parâmetro entre grupos e devem ser lidos na vertical. Portanto médias assinaladas com uma mesma letra não diferem entre si, estatisticamente. Porém medias assinaladas com letras diferentes, apresentam diferenças significativas. As variáveis largura (GCC) e espessura (GCC) não apresentam diferenças significativas entre os diferentes grupos de estudo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

5.2 Microestrutura

No GCC da cutia pudemos observar os seguintes tipos celulares: células da glia, neurônios mononucleados e neurônios binucleados, tecido conjuntivo intraganglionar.

Nos três grupos etários a distribuição dos neurônios foi homogênea, porém observou-se que nos neonatos os neurônios estavam mais próximos uns dos outros apresentando uma distribuição mais densa. Na medida em que progrediu o desenvolvimento pós-natal os neurônios estavam mais esparsos quanto a sua distribuição, havendo invasão pronunciada de tecido conjuntivo intraganglionar.

Nos neurônios mononucleados o núcleo se localizava geralmente no centro da célula ou em posição excêntrica em alguns casos. Nos neurônios binucleados, geralmente os núcleos estavam em dois planos focais distintos que tendiam a coincidir com os pólos da célula. Observou-se ainda, a presença de um ou dois nucléolos por neurônio mono ou binucleados.

5.3 Estudo estereológico

Para fins didáticos pode-se visualizar o aspecto de secções histológicas ópticas (utilizadas para o método disector) ilustradas na figura 2

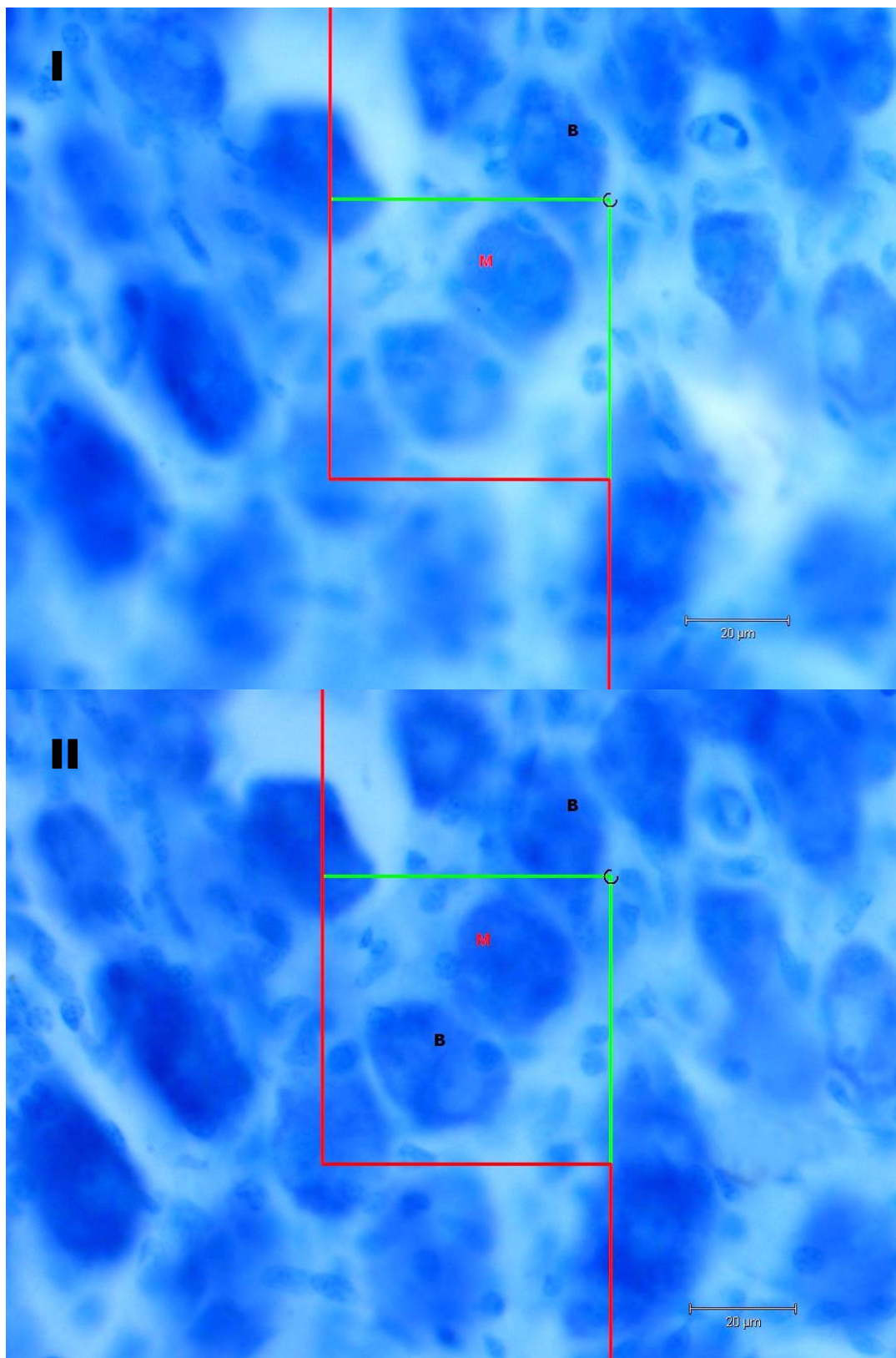


Figura 2 Fotomicrografia do GCC de cutia mostrando dois planos ópticos subsequentes (I e II) nos quais se observa neurônios mononucleados (**M**) e binucleados (**B**) que surgem à medida que se aprofunda no eixo Z da seção óptica e os mesmos são amostrados utilizando-se uma “unbiased counting frame”. Técnica de coloração: azul de toluidina. Escala de barra: 20μm.

5.3.1 Densidade numérica neuronal (Nv)

A densidade numérica de neurônios foi estimada separadamente para os dois tipos neuronais presentes no GCC, neurônios monucleados ($N_{v_{mono}}$) e neurônios binucleados ($N_{v_{bi}}$), e apresentou os seguintes valores G1 $N_{v_{mono}} = 44.737,93 \text{ mm}^{-3}$ (0,08) e $N_{v_{bi}} = 18.603,24 \text{ mm}^{-3}$ (0,08); G2 $N_{v_{mono}} = 232.961,53 \text{ mm}^{-3}$ (0,76) e $N_{v_{bi}} = 17.342,66 \text{ mm}^{-3}$ (0,35); G3 $N_{v_{mono}} = 24.609,37 \text{ mm}^{-3}$ (0,08) e $N_{v_{bi}} = 15.340,32 \text{ mm}^{-3}$ (0,04). (Figura 3). Diferenças entre grupos foram não significantes para $N_{v_{mono}}$ ($p = 0,061$) e para $N_{v_{bi}}$ ($p = 0,571$). Entretanto, pôde-se admitir uma tendência a significância “border line significance” para $N_{v_{mono}}$.

5.3.2 Volume Ganglionar (V_{GCC})

O volume do GCC foi de: G1: $1,35 \text{ mm}^3$ (0,58); G2: $1,95 \text{ mm}^3$ (0,37); G3 $3,35 \text{ mm}^3$ (0,12). Diferenças entre grupos foram significantes ($p = 0,024$) (Figura 4).

5.3.3 Número total de neurônios (N)

A estimativa do número total de neurônios levou em consideração o número total dos dois tipos celulares: neurônios mononucleados (N_{mono}) e neurônios binucleados (N_{bi}). O número total de neurônios mononucleados e binucleados foi: G1 $N_{mono} = 60.696,43$ (0,60) e $N_{bi} = 25.332,15$ (0,61) e $N_{total} = 86.028,59$ (0,61); G2 $N_{mono} = 527.826,21$ (0,96) e $N_{bi} = 31.175,99$ (0,09) e $N_{total} = 559.002,20$ (0,91); G3

$N_{\text{mono}} = 82.199,66 (0,12)$ e $N_{\text{bi}} = 51.512,11 (0,15)$ e $N_{\text{total}} = 133.711,78 (0,12)$. (Figuras 4 e 5). Diferenças entre grupos foram não significantes para N_{mono} ($p = 0,638$) e para N_{total} ($p = 0,638$), porém foram significantes para N_{bi} ($p = 0,043$).

5.3.4 Volume neuronal médio (\bar{v}_N)

O volume médio dos neurônios foi: G1 $Vn_{\text{mono}} = 2.090,99 \mu\text{m}^3 (0,16)$ e $Vn_{\text{bi}} = 4.882,92 \mu\text{m}^3 (0,18)$; G2 $Vn_{\text{mono}} = 2.373,84 \mu\text{m}^3 (0,12)$ e $Vn_{\text{bi}} = 6.298,70 \mu\text{m}^3 (0,05)$ e G3 $Vn_{\text{mono}} = 4.370,50 \mu\text{m}^3 (0,08)$ e $Vn_{\text{bi}} = 12.886,36 \mu\text{m}^3 (0,21)$. Diferenças entre grupos foram significantes para ambos os parâmetros \bar{v}_N_{mono} ($p = 0,000$) e \bar{v}_N_{bi} ($p = 0,043$) (Figura 6).

5.3.5 Densidade de volume (Vv)

A densidade de volume neuronal foi de: G1 $Vv = 0,53 (0,04)$; G2 $Vv = 0,41 (0,06)$; G3 $Vv = 0,35 (0,18)$. Diferenças entre grupos foram significantes ($p = 0,004$) (Figura 7).

5.4 Código neuronal químico

Avaliamos qualitativa e descritivamente o padrão de imunoreatividade dos neurônios do GCC de uma cutia jovens ao Brd-U visando à padronização do

protocolo da reação de imunohistoquímica nesta espécie de roedor selvagem, pois a maioria dos estudos com a bromodeoxyuridina, utiliza roedores de laboratório como ratos e camundongos.

Tanto os neurônios mononucleados quanto aqueles binucleados apresentaram imunorreatividade ao Brd-U, sendo que a mesma foi intensa e ocorreu predominantemente no pericário que se apresentou marrom à observação microscópica.

No momento, a imunomarcção pericarial parece sugerir que estas células estão em intensa atividade de síntese protéica. Em algumas células nervosas, a imunomarcção ocorreu também no seu nucléolo ou nucléolos

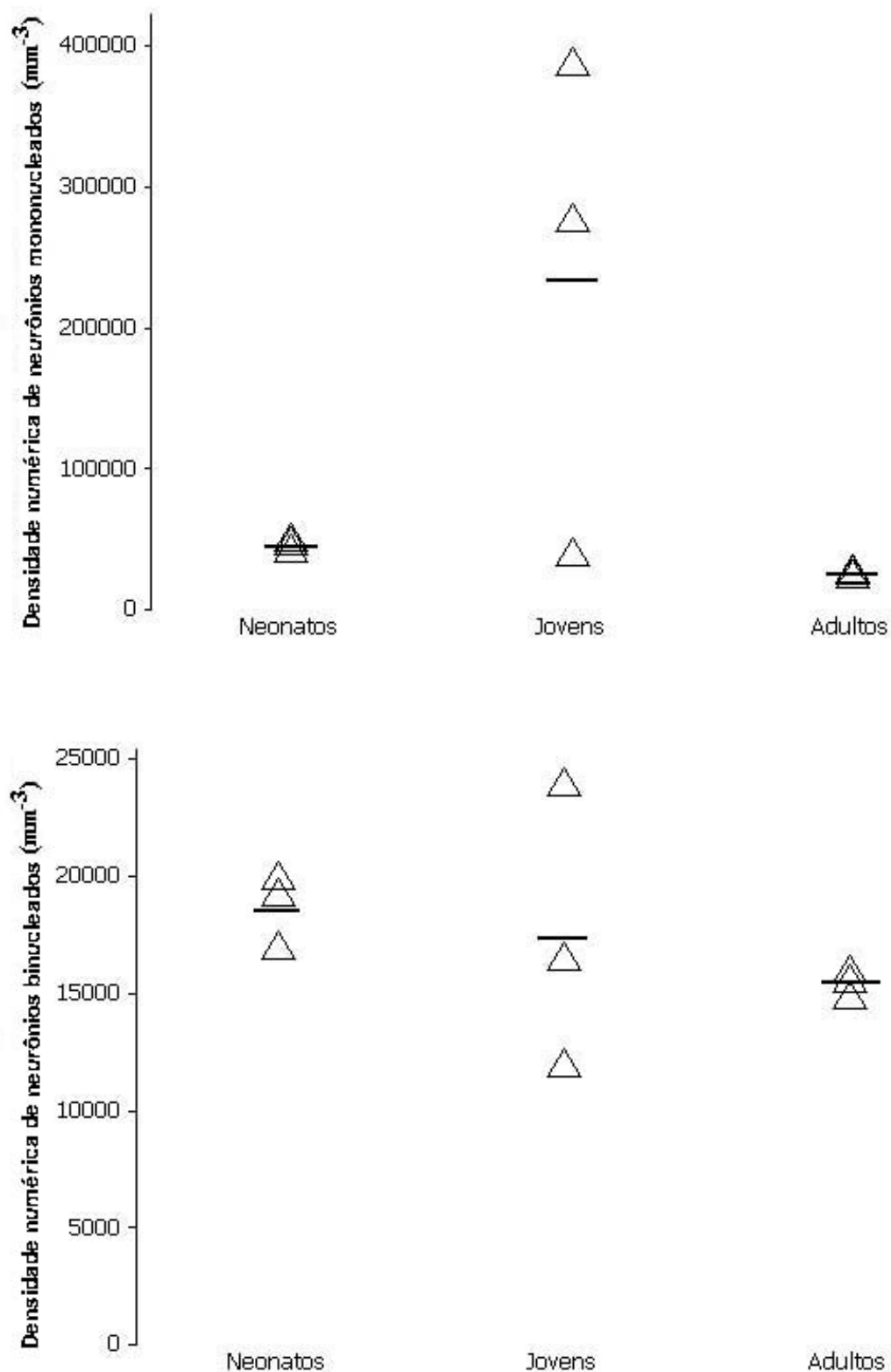


Figura 3 – Densidade numérica de neurônios mono e binucleados, em cutias neonatas, jovens e adultas. Não houve diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$). As barras horizontais indicam as médias dos grupos.

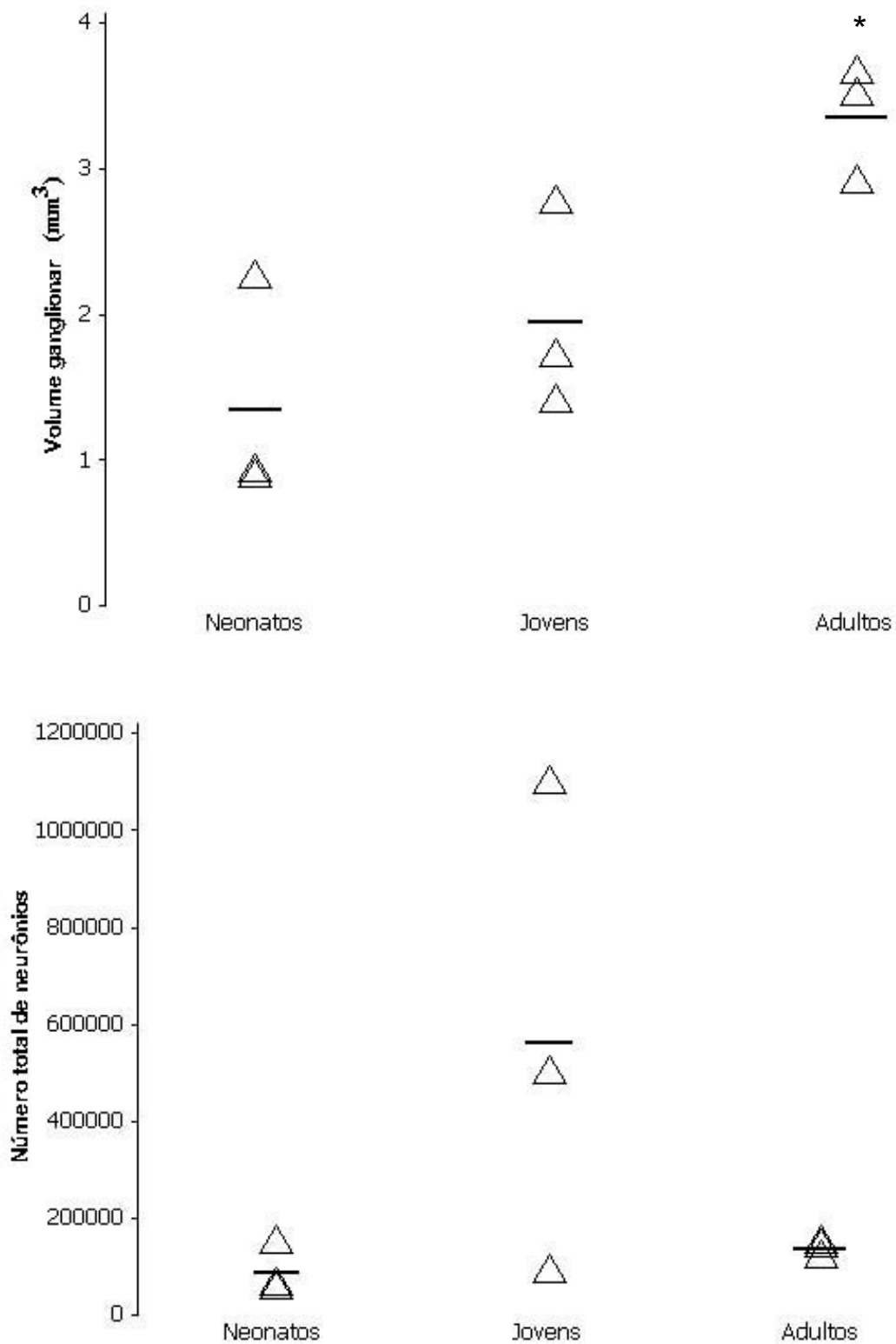


Figura 4 – Volume ganglionar e Número total de neurônios em cutias neonatas jovens e adultas. Houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) para volume ganglionar e não significativa ($p > 0,05$) para número total de neurônios. As barras horizontais indicam as médias por grupo.

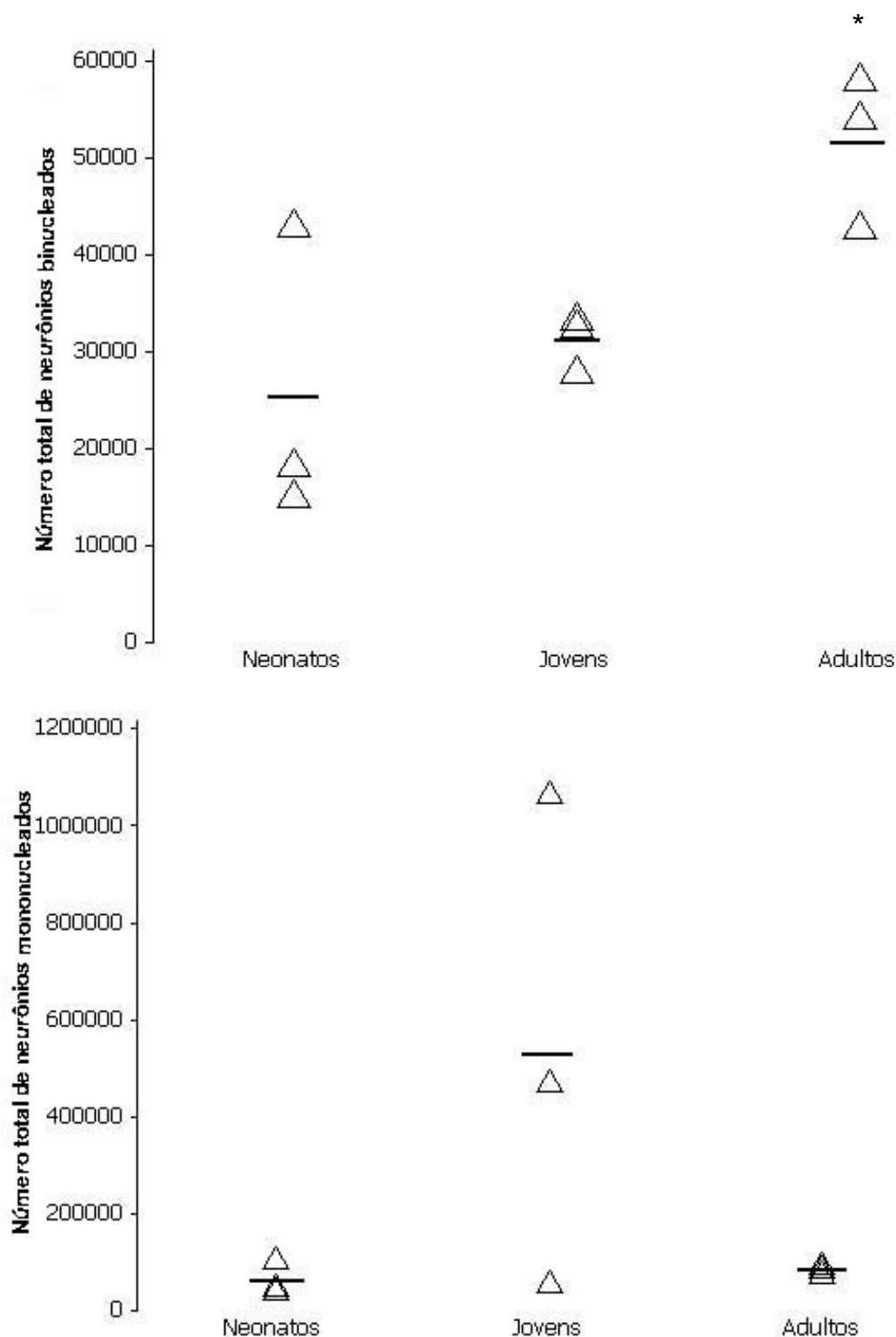


Figura 5 – Número total de neurônios mono e binucleados em cutias neonatas jovens e adultas. Houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) para número total de neurônios binucleados e não significativa ($p > 0,05$) para número total de neurônios mononucleados. As barras horizontais indicam as médias por grupo.

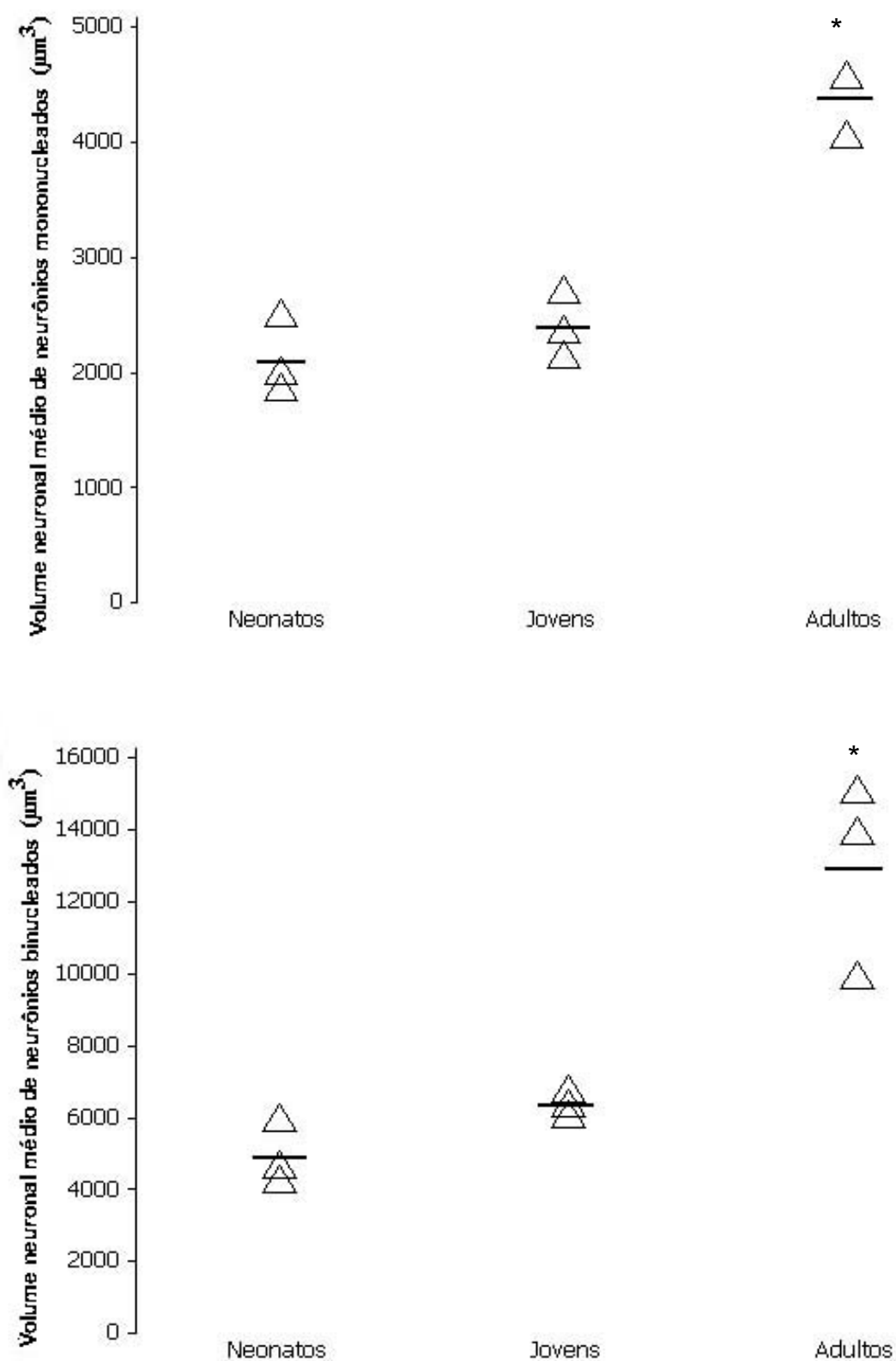


Figura 6 – Volume neuronal médio de neurônios mono e binucleados em cutias neonatas, jovens e adultas. Houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) para ambos os parâmetros. As barras horizontais indicam as médias por grupo.

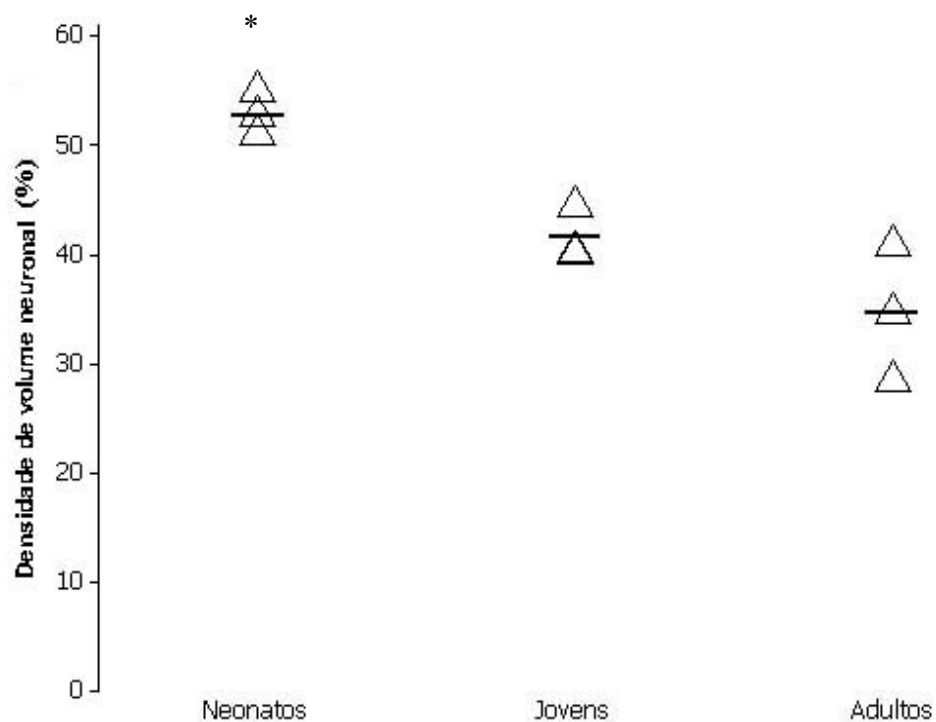


Figura 7 – Densidade de volume neuronal em cutias neonatas, jovens e adultas. Houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). As barras horizontais indicam as médias por grupo

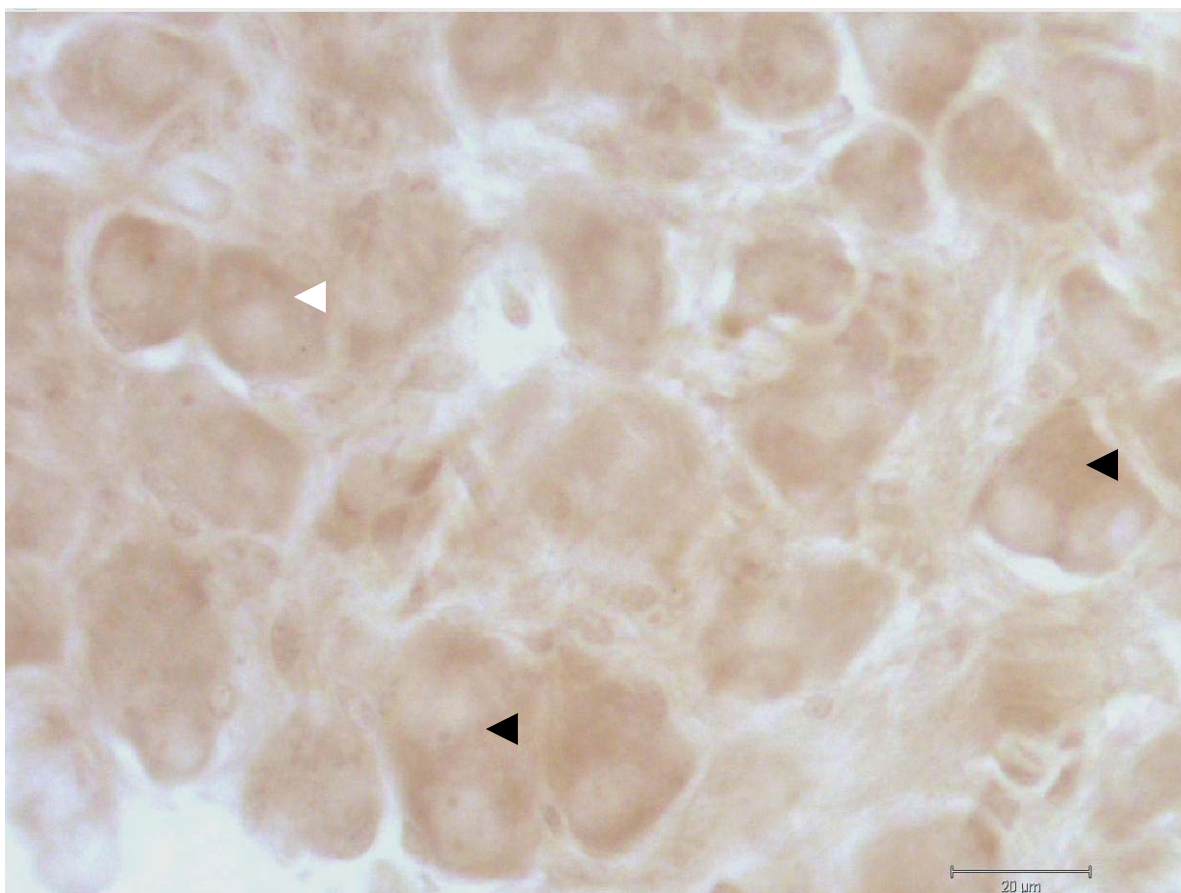


Figura 8 Microestrutura do gânglio cervical cranial de cutia jovem com destaque para a imunorreatividade de seus neurônios mono (cabeça de seta branca) e binucleados (cabeças de seta pretas) ao Brd-U . Note que a imunomarcção (cor marrom) ocorre predominantemente no pericário e não no núcleo neuronal. Reação de imunohistoquímica enzimática desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride" (DAB). Escala de barra= 20 μ m..

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Macroestrutura

Neste estudo não foram encontrados efeitos da maturação na posição ou na arquitetura do gânglio cervical cranial esquerdo de cutias, estando as mesmas em ressonância com descrições realizadas em outras espécies animais como por exemplo: capivaras, ratos, eqüinos, cães, gatos, suínos, bovinos e camelos (CUI-SHENG et al. 1998; RIBEIRO, DAVIS e GABELLA, 2004; BAO-PING, 2005; KABAK et al.,2005; RIBEIRO, 2006; FIORETTO et al. 2007; KABAK, 2007).

6.2 Microestrutura

Quanto à microestrutura do GCC, os adultos apresentaram um maior espaçamento entre os neurônios quando comparados aos animais neonatos e aos jovens. Este espaçamento mais pronunciado em animais adultos foi geralmente preenchido por células não neuronais e tecido conjuntivo e seus septos intraganglionares. Entendido no seu conjunto, estas alterações estruturais refletiram-se diretamente em dois parâmetros estereológicos investigados: densidade numérica neuronal e densidade de volume neuronal (veja mais detalhes no item estudo estereológico).

Quanto aos tipos celulares encontrados, estes corroboram com os estudos publicados previamente no GCC de várias espécies tais como: capivaras, cães,

eqüinos e gatos (RIBEIRO, DAVIS e GABELLA 2004, RIBEIRO, 2006; FIORETTO et al. 2007), assim com aqueles publicados em outros gânglios simpáticos como o celíaco-mesentérico de cães (RIBEIRO et al. 2002) e mesentérico inferior de cães (GAGLIARDO et al. 2005).

6.3 Estudo Quantitativo

A literatura especializada não apresenta estudos morfoquantitativos (estereológicos ou morfométricos) do GCC na espécie considerada neste estudo que é um roedor selvagem e tipicamente sul-americano.

Desta forma, a discussão foi centrada em comparações com o GCC de roedores de laboratório (POPKEN e FAREL, 1997, FAREL, 2002 FAREL, 2003) e com médios e grandes mamíferos (RIBEIRO, DAVIS e GABELLA. 2004; RIBEIRO, 2006, FIORETTO et al., 2007) que estudaram, por meio de métodos tridimensionais acurados, o gânglio cervical cranial esquerdo de capivaras, ratos e eqüinos adultos; capivaras jovens e posteriormente de cães, gatos e eqüinos (jovens e adultos), respectivamente. A principal conclusão destes estudos foi a da comprovação de princípios alométricos e espaciais, bem fundamentados, e que regem as adaptações morfofuncionais do GCC (número de neurônios, tamanho destes e dimensões do GCC) em função do aumento da massa corporal, fato este também corroborado na presente pesquisa.

6.3.1 Densidade numérica neuronal (NV)

O método do disector óptico, derivado do disector físico, garante acurácia e rapidez na estimativa dos parâmetros investigados tornando o experimento cientificamente reproduzível (WEST et al.1991; POVER e COGGESHALL, 1991; MAYHEW; GUNDERSEN, 1996; EVANS et.al 2005; HOWARD e REED, 2005).

O desenvolvimento pós-natal (mais especificamente a maturação) não teve nenhum efeito na aparente diminuição da densidade numérica de neurônios ganglionares mono e binucleados, o que não é corroborado em estudos similares na literatura (FAREL, 2002; RIBEIRO DAVIS e GABELLA, 2004; GAGLIARDO et al. 2005, RIBEIRO, 2006). Para aqueles autores, a diminuição da densidade numérica neuronal durante o desenvolvimento pós-natal estaria relacionada ao aumento do volume ganglionar e também ao aumento do tamanho dos neurônios ganglionares.

Em concordância com os autores supra-citados entendemos que estes três parâmetros (N_V , V_{GCC} e \bar{v}_N) se auto-regulariam o que representaria um mecanismo adaptativo entre estes dois compartimentos ganglionares que são o gânglio propriamente dito (incluindo seus dois sub-compartimentos: tecido neuronal e não neuronal) e ainda a célula neuronal propriamente dita.

Não obstante e levando-se em conta o fato de que cada grupo etário em estudo foi constituído de três unidades experimentais, foi possível constatar uma tendência a uma “border line” significância em relação à densidade numérica de neurônios mononucleados, o que poderá ser confirmado ou não com a inclusão de mais unidades experimentais na finalização deste estudo para sua publicação.

6.3.2 Volume ganglionar (V_{GCC})

Os efeitos do desenvolvimento pós-natal (maturação) puderam ser claramente identificados no volume do GCC (V_{GCC}) onde se observou um aumento significativo de 148% no volume deste gânglio entre animais neonatos (G1) e adultos (G3). Alometricamente, este aumento foi acompanhado de um aumento da ordem de 14 vezes (aproximadamente 1400%) da massa corporal. Desta proporção pôde-se estimar que o coeficiente alométrico ou fator alométrico foi próximo de 10.

A inexistência de uma correlação linear (embora possa existir uma alométrica) entre o volume do órgão de estudo e a massa corporal do animal foi também reportada por Pakkenberg e Gundersen, (1997); Andersen et al. (2003), que observaram em regiões cerebelares e encefálicas, respectivamente, esta falta de correlação.

6.3.3 Número total de Neurônios (N)

O desenvolvimento pós-natal (até a fase de maturação) não alterou o número total de neurônios ganglionares, aqui considerado como a soma do número total de neurônios mono e neurônios binucleados. Fato oposto foi reportado para o GCC de capivaras jovens (RIBEIRO, 2006) quando comparado ao de capivaras adultas (RIBEIRO, DAVIS E GABELLA 2004)

Em capivaras, a maturação ocasionou redução de 16% no número total de neurônios (mono e binucleados) acompanhado de uma redução de 23% no número total de neurônios binucleados.

Fato interessante é que embora a maturação não tenha alterado o número total de neurônios do GCC em cutias, alterou sim o número total de neurônios

binucleados que significativamente aumentaram em 200% , aumento este que não foi suficiente para interferir no numero total de neurônios.

Popken e Farel (1997) observaram um aumento significativo de 30% no número total de neurônios dos gânglios da raiz dorsal (DRGs) L3-L6 de ratos Sprague-Dawley adultos em relação aos neonatos usando o disector físico e Cecchini et. al. (1993) reportaram um aumento de 40% na população neuronal de DRGs em ratos wistar entre 1 e 5 meses, usando métodos quantitativos morfométricos, portanto discutíveis.

Durante o desenvolvimento pós-natal, Gagliardo et al. (2005) reportaram um aumento de 1700% (17 vezes) no número total de neurônios do gânglio mesentérico caudal que é um gânglio simpático pré-vertebral e localizado na cavidade abdominal.

Estes estudos mostram que a definição do número total de neurônios durante a vida pós-natal ainda é um paradoxo em neurociência e tão mais se torna, quanto maior a complexidade das espécies investigadas, principalmente as selvagens.

6.3.4 Volume médio neuronal (\bar{v}_N)

A maturação afetou claramente o tamanho da célula neuronal mono e binucleada que sofreu hipertrofia durante este período. Por exemplo, o neurônio mononucleado do GCC de animais adultos (G3) sofreu uma hipertrofia de 209% em relação aos animais neonatos (G1) e de 84% em relação aos animais jovens (G2).

A célula neuronal binucleada do GCC de animais adultos (G3) foi 264% e 204% maior em relação àquelas do GCC de animais neonatos (G1) e jovens (G2),

respectivamente. Já os neurônios binucleados do GCC de cutias jovens (G2) foram 29% maiores que daqueles do GCC de animais neonatos (G1).

A hipertrofia neuronal durante o desenvolvimento pós-natal parece ser um mecanismo adaptativo geral e bem estabelecido nos gânglios simpáticos de mamíferos (MIOLAN e NIEL, 1996; GAGLIARDO et al., 2005, RIBEIRO 2006, FIORETTO et al. 2007,)

Outro aspecto observado por Ribeiro (2006) no GCC de capivaras, e também corroborado no presente estudo em cutias, é de que o volume dos neurônios binucleados em animais neonatos e jovens aproximou-se numericamente do volume dos neurônios mononucleados nos indivíduos adultos.

6.1.5 Densidade de volume (Vv)

A densidade de volume neuronal ou volume neuronal fracional diminuiu durante parte do desenvolvimento pós-natal (maturação). Por exemplo, foram estimadas reduções da ordem de 29% entre cutias neonatos e jovens e de 51% entre cutias neonatos e adultos.

Observamos que similar tendência (embora não significativa) foi observada no GCC de capivaras durante a maturação (RIBEIRO, 2006) e no gânglio mesentérico caudal de cães, durante a maturação e o envelhecimento (GAGLIARDO et al. 2005)

Apesar de não termos estimado o volume fracional ocupado pelo tecido não-neuronal (células da glia, tecido conjuntivo, vasculatura, fibroblastos, entre outros tipos celulares) acredita-se que com a maturação este tecido invade o parênquima ganglionar contribuindo, desta forma, para o aumento do volume ganglionar.

(MIOLAN e NIEL, 1996, RIBEIRO, DAVIS e GABELLA 2004, GAGLIARDO et al. 2005 e RIBEIRO, 2006).

.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A partir dos materiais coletados, dos métodos de estudo empregados e dos testes de inferência e validação estatística aplicados até o presente momento, esta pesquisa nos permite concluir que:

- A maturação leva ao aumento do número total de neurônios binucleados do GCC de cutias sem alterar, no entanto, o número total de neurônios do GCC.
- O volume neuronal é significativamente influenciado pela maturação.
- .
- A densidade numérica neuronal permanece inalterada com a idade, contudo para a densidade de neurônios mononucleados observamos o efeito de tendência à diminuição significativa ou efeito "border line".
- .
- Constatou-se a presença de neurônios Brd-U positivos (marcação pericarial) no GCC de cutias jovens, sugerindo um aumento na atividade de síntese protéica neuronal.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

ANDERSEN, B.B; GUNDERSEN, H.J.G.; PAKKENBERG, B. Aging of the human cerebellum: A stereological study. *J. Comp. Neurol.* V. 466 p. 356-365 2003

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

BAO-PING S.; YAN-PING.; D; ZHAO-HUI, X.; HONG-XIAN, Y.; BRAND-SABERI; JIAN-LIN, W. The cranial cervical ganglion and its branches in the yak (*Bos-grunniens*). *The veterinary Journal*, v. 173, n. 1 , p. 174-177 , 2007.

BEDDELEY, A. J.; GUNDERSEN, H. J. G.; CRUZ-ORIVE, H. J. G. Estimation of surface area from vertical sections. *Journal of Microscopy*, v. 142, n. 3, p. 259-276, 1986.

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 gold retriever. *Journal of small animal practice* n.36 p.382-384 1995.

CECCHINI, T; CUPPINIR, R; CIARONI, S.;DEL GRANDE, P. increased number of dorsal roots ganglion neurons in vitamin-E- deficient rats. *Somatosens Mot. Res.* V.10.433-443 1993.

COGGESHALL, R. E.; POVER, C. M.; FITZGERALD, M. DRG cell death and surviving cell numbers to the development of sensory innervation in the rat hindlimb. *Developmental Brain Research*, v. 82, p. 193-212, 1994.

CUI-SHENG; JIAN-LING, W.; ZHEN-MINE, X. The gross anatomy of the cranial cervical ganglion and its branches in the Bactrian camel (*camelus bactrianus*). *Veterinary Research Communications*, v. 22, n. 1, p 1-5, 1998.

DE LIMA, A.R.; NYENGAARD, J.R.; JORGE, A.A.L.; BALIEIRO, J.C.C.; PEIXOTO, C.; FIORETO, E.T.; AMBROSIO, C.E.; MIGLINO, M.A.; ZATS, M.; RIBEIRO, A.A.C.M. Muscular dystrophy-related quantitative and chemical changes in adenohipophysis GH-cells in gold retrievers *Growth Hormone & IGF Research* v. 17 p. 480-491. 2007.

DEVOR, M.; GOVRIN-LIPPMANN, R. Neurogenesis in adult rat DRGs. *Neurosci. Lett*, v. 61, p. 189-194, 1985.

EBESSON, S. O. E. Quantitative studies of the superior cervical sympathetic ganglia in a variety of primates including man. **J. Morph.**, n. 124, p. 117-132 1968.

ELIAS, M. D. Cervical sympathetic and stellate ganglion blocks. **Pai Physician**, v. 3, n. 3, p. 294-304, 2000.

EVANS, R. J.; SURPRENANT, A. P2X receptors in autonomic and sensory neurons. **Semin. Neurosci.** 8, 217-223, 2005.

FAREL, P. B. Sensory neuron addition in juvenile rat: time course and specificity. **Journal of comparative neurology**. V 499 p. 158-165 2002.

FAREL, P. B. Late differentiation contributes to the apparent increase in sensory neuron number in juvenile rat. **Developmental Brain Research**. v. 144, p. 91-98, 2003.

FIORETO, E. M.; GUIDI, W. L.; OLIVEIRA, P. C.; RIBEIRO, A. A. C. M. Macrostructure of the cranial cervical ganglionic complex and distal vagal ganglion during post natal development in dogs. **Cells Tissues Organs**, v.186 p. 129-40 2007.

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

FORSMAN, C. A.; LINDH, B.; ELFVIN, L.; HALLAMN, H. Measurements of the DNA amount in mono and binucleate cells in the celiac superior mesenteric ganglion of the guinea pig. **Anat. Embryol.**, n. 179, p. 587-590, 1989.

GABELLA, G. **The rat nervous system** (Autonomic Nervous System). Elsevier, 2004.

GAGLIARDO, K.M; BALIEIRO, J.C.C; SOUZA, R.R; RIBEIRO, A.A.C.M. Post natal related changes in the size and total number of neurons in the caudal mesenteric ganglion of dogs: total number of neurons can be predicted from body weight and ganglion volume **Anatomical records part** v.286 A p.917-929 2005.

GUADIX, AR.; HERREROS, M.A.P.; GARRIDO, M.V.O.; ABADIA-FENOLL F. Quantitative Analysis of binucleate neurons in the lateral geniculate nucleus of the mouse. **Trab. Inst. Cajal. Invest. Biol.**, n. 70, v. 3, p. 247-60, 1979.

GUNDERSEN, H.J.G JENSEN, F.B KIEU,K. NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. **J Microsc.** V.3 n.193 p.199-211 1999.

HOWARD, C. V.; REED, M. G.; **Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 2005.

KARBAK, M. The Gross anatomy of the cranial cervical ganglion in the guinea pig (*Cavia Porcellus*) **Veterinary Research communications**, v. 31, p. 1-7, 2007.

KABAK, M.; ORHAN, I. O.; HAZIROLU, R. M.; Macro anatomical investigations of the cranial cervical ganglion in domestic pig. (*sus serofa domesticus*). **Anat. Histol. Embryol.** v. 34, p. 199-202, 2005.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. Anatomia dos animais domésticos. São Paulo: Artmed, 1999. v. 2.

KRENLEN, D. L. Integration in autonomic ganglia. **Physiologist**, v. 27. n. 1, p. 49-55, 1984.

LADEKARL, M.; JENSEN, V.; NIELSEN, B. Total number of cancer cell nuclei and mitoses in breast tumors estimated by the optical dissector- analytical and quantitative. **Anal Quant Cytol Histol.**, v. 19 n 4. p.329-37, 1997.

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

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

MAYHEW, T. M.; OLSEN, D. R. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. **J. Anat.**, v. 178, p. 133-144, 1991.

MINITAB (v.15) 2007. Minitab reference manual. Florence, Wadsworth

MIOLAN, J. P.; NIEL, J. P. The mammalian sympathetic pre-vertebral ganglia: integrative properties and role in the nervous control of digestive tract motility. **J. Auton. Nerv. Syst.** 58, p. 125-138. 1996.

OZEL, S.K.; KAZEZ, A. Horner's syndrome secondary to tube thoracostomy. **Turk J. Pediatr.** V.46 p. 189-90 2004.

PANCIERA, R.J; RITCHEY, J.W; BAKER, J.E; DIGREGORIO, M. Trigeminal and polyradicular neuritis in a dog presenting with masticatory muscle atrophy and horner's syndrome. **Vet. Pathol.** v. 1 n. 39 p. 146-9 2002.

PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H.J.G. Neocortical neuron number in humans: effect of age and sex. **J. Comp. Neurol.** V.384 p. 312-320 1997.

POVER, C. M.; COGGESHALL, R. E. Verification of the dissector method for counting neurons, with comments on the empirical method. **Anat. Rec.**, v 22, n. 231, p. 573-578, 1991.

POVER, C. M.; COGGESHALL, R. E.; FITZGERALD, M.; Dorsal root ganglion cell death and surviving cell numbers in relation to the development of sensory innervation in the rat hindlimb. **Res Dev Brain**, v. 82, n. 1-2, p. 193-212, 1994

POPKEN, G. J.; FAREL, P. B. Sensory neuron number in neonatal and Adult rats estimated by means of stereologic and profile-based methods. **J. Comp. Neurol.** v.386, p. 8-15, 1997.

PURVES, D.; RUBIN, E.; SNIDER, W. D.; LICHTMAN, J. Relation of animal size to convergence, divergence, and neuronal number in peripheral sympathetic pathways. **The Journal of Neuroscience**, v. 1 n. 6, p. 158-163, 1986.

RIBEIRO, A.A.C.M. Size and number of binucleate and mononucleate superior cervical ganglion neurons in Young capibaras. **Anat embryol** v.211 p. 207-217 2006

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. **Anat. Embryol.**, v.208, n. 208, p. 367-380, 2004.

RIBEIRO, A.A.C.M; ELIAS, C.F.; LIBERTI, E.A.; GUIDI, W.L.; SOUZA,R.R.; Structure and ultrastructure os the celiac mesenteric ganglion complex in the domestic dog. **Anat. Hitol. Embriol.** V.31, p.344-349 2002.

SASAHARA, T. H. C.; DE SOUZA R. R.; MACHADO, M. R. F.; DA SILVA, R. A.; GUIDI, W. L.; RIBEIRO, A. A. C. M. Macro and microstructural organization of the rabbit's celiac-mesenteric ganglion complex. **Ann. Anat.**, v.23, n. 185, p. 441-448, 2003.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the dissector. **J. Microsc.**, n. 134, p. 127-136, 1984.

TAUPIN, P.; GAGE, P. H. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. **J.Neurosci.Res**, v. 69, p. 745-749, 2007.

VALERO,J; WERUAGA,E; MURIAS,A.R; RECIO,J.S.; ALONSO,J.R.- Proliferation markers in the adult rodent brain: bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen **Brain research protocol**, 2005.

VEDEL JENSEN, E.B.; GUNDERSEN, H.J.G. The rotator. **Journal of Microscopy** v.170, p.35-44, 1993

WEST, M. J.; SLOMIANKA, L.; GUNDERSEN, H. J. Umbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **The anatomical record**, v. 231, p. 482-497,1991.