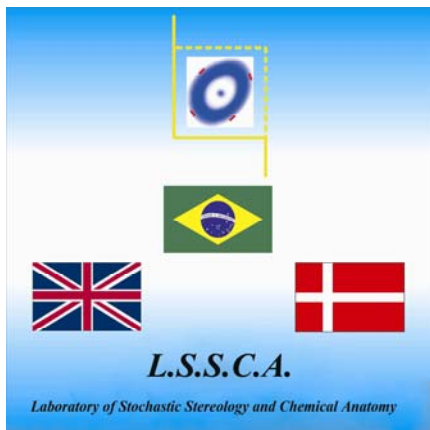


**Fernando Vagner Lobo Ladd**

**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

## 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 Nordestino 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 Nordestina 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.

# 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 autônomos, 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.

## 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.

## 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 adenohypophysis 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 disector 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 polyradiculo 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 humanes: 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 of 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. Unbiased 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.