ALESSANDRA ESTEVES

**ANÁLISE COMPARATIVA DO NÚMERO DE CORPOS DE NEURÔNIOS
EM ÁREAS DO CÓRTEX CEREBRAL DE DIFERENTES RAÇAS DE CÃES**

São Paulo
2006

ALESSANDRA ESTEVES

**ANÁLISE COMPARATIVA DO NÚMERO DE CORPOS DE NEURÔNIOS
EM ÁREAS DO CÓRTEX CEREBRAL DE DIFERENTES RAÇAS DE CÃES**

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 obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Irvênia Luiza de Santis Prada

São Paulo
2006

ERRATA

ESTEVEES, A. Análise comparativa do número de corpos de neurônios em áreas do córtex cerebral de diferentes raças de cães. [Analysis comparative of bodies neurons number in areas of brain cortex of the dogs breeds]. 2006. 56 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006.

Folhas	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3	1	149f.	56f.
Resumo	1	3	Doutorado em Medicina Veterinária	Doutorado em Ciências
Abstract	1	3	Doutorado em Medicina Veterinária	Doutorado em Ciências

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1797
FMVZ

Esteves, Alessandra

Análise comparativa do número de corpos de neurônios em áreas do córtex cerebral de diferentes raças de cães / Alessandra Esteves. – São Paulo: A. Esteves, 2006.
149 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.

Orientadora: Profa. Dra. Irvênia Luiza de Santis Prada.

1. Cães. 2. Raças. 3. Córtex cerebral. 4. Neurônios. 5. Contagem de corpos de neurônios. I. Título.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Comparação do número de corpos de neurônios de áreas do córtex cerebral em diferentes raças de cães", protocolo nº539/2004, utilizando cadáveres caninos, sob a responsabilidade da Profª Drª Irvênia Luiza de Santis Prada, 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 "ad referendun".

(We certify that the Research "Comparison of the number bodies of neurons of the cerebral cortex area in the different races of the dogs", protocol number 539/2004, utilizing 16 canines corpses, under the responsibility of Profª Drª Irvênia Luiza de Santis Prada, 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 "ad referendun", meeting.

São Paulo, 21 de setembro de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Esteves, Alessandra

Título: Análise comparativa do número de corpos de neurônios em áreas do córtex cerebral de diferentes raças de cães

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 obtenção do título de Doutor em Ciências

Data:_____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

“Dar o exemplo não é a melhor maneira de influenciar os outros.
É a única.”
(Albert Schweitzer)

Esta tese será dedicada especialmente a minha mãe **Maria Lazara Serra Esteves**, que sempre esteve a minha frente me guiando e iluminando meu caminho.

Ao meu avô **Francisco Esteves Rubinho** pelo auxílio financeiro e por sempre acreditar em mim.

“Para avaliar a importância real de uma pessoa, devemos pensar nos efeitos que sua morte produziria.”
(François Gaston de Levis)

In memoriam, ao meu pai **Antônio Francisco Esteves** e minha avó **Iracema Longui Serra** pelo exemplo de vida e persistência. Amo vocês!!!!

“O amor é paciente, é bondoso; a amor não é invejoso, não é arrogante, não se ensoberbece, não é ambicioso, não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não guarda ressentimento pelo mal sofrido, não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade; tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.”

(Carta de S. Paulo aos Coríntios)

Ao meu marido **Marcelo Ap. Madruga** pela paciência e carinho.

“Os amigos verdadeiros são aqueles que vêm compartilhar a nossa felicidade quando os chamamos, e a nossa desgraça sem serem chamados.”

(Demetrio de Falera)

As minhas orientadoras e principalmente amigas
**Profa. Dra. Irvênia Luiza de Santis Prada e Profa.
Dra. Ana Flávia de Carvalho.** Valeu por tudo!!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e Nossa Senhora Aparecida pela minha vida!

A minha família meu obrigada pela paciência nos momentos difíceis e pela felicidade nos bons momentos.

A CAPES pelo financiamento deste trabalho.

A minha Orientadora Profa. Dra. Irvênia Luiza de Santis Prada pela paciência na dissertação, correção da tese e principalmente pela confiança em mim depositada.

A Profa. Dra. Maria Angélica Miglino pelo respeito e confiança.

A Unifeob pela colaboração e apoio durante todas as etapas desta pesquisa.

A todos os meus amigos que fizeram parte deste projeto e pelo apoio para que eu chegasse até aqui:

- A Profa. Dra. Ana Flávia de Carvalho e ao Prof. Marcos Roqueto por liberarem o laboratório de pesquisas da Unifeob para que eu realizasse os experimentos na Instituição;
- Ao Centro de Zoonoses, Clínicas Veterinárias e proprietários de alguns animais utilizados nesta pesquisa, obrigada pela colaboração e confiança;
- A Profa. Celina Furlanetto Mançanares e minha amiga pelo companherismo e por simplesmente.....tudo!!!!
- Ao Ricardo, técnico do laboratório da Unifeob pelo auxílio na coleta do material;

Ao grupo Unifeob MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS A TODOS.

A todos os colegas da Pós-graduação sem exceções, um abraço a todos.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Anatomia e da FMVZ/USP, pelo crescimento intelectual e espiritual MEU OBRIGADA!

Aos amigos, professores e técnicos da Unifal em especial a Profa. Dra. Andéa Mollica do Amarante Paffaro, Prof. Dr. Wandemar Paffaro Júnior e Prof. Dr. Thomaz Henrique Araújo pelo carinho em que me receberam na Instituição.

RESUMO

ESTEVEES, A. **Análise comparativa do número de corpos de neurônios em áreas do córtex cerebral de diferentes raças de cães.** [Analysis comparative of bodies neurons number in areas of brain cortex of the dogs breeds]. 2006. 56 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006.

Foram enfocadas neste presente estudo, 3 raças de cães, ou seja, Boxer, Dobermann e Rottweiler, com tipos constitucionais e aptidões funcionais característicos e distintos entre si, sendo coletados 4 encéfalos de cada raça. Dos encéfalos foram retirados fragmentos das diferentes áreas do córtex cerebral, que foram preparados segundo técnica histológica convencional e corados por violeta cresil modificada. Através de contagem visual-manual, foram buscados dados comparativos, entre áreas cerebrais *versus* raça associando tipos constitucionais *versus* aptidão funcional. As lâminas foram analisadas com auxílio do Axióscopio Zeiss ®, acoplado ao programa de análise de imagens KS-400 versão 2.0 Kontron – Zeiss®. Os fatores raças, áreas e hemisférios cerebrais podem ser variáveis dependentes entre si, pois foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em valores correspondentes à média de corpos de neurônios das áreas estudadas nas diferentes raças, bem como entre os hemisférios cerebrais.

Palavras-Chave: Cães. Raças. Córtex cerebral. Neurônios. Contagem de corpos de neurônios.

ABSTRACT

ESTEVEES, A. **Analysis comparative of bodies neurons number in areas of brain cortex of the dogs breeds.** [Análise comparativa do número de corpos de neurônios em áreas do córtex cerebral de diferentes raças de cães]. 2006. 56 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006.

They had been focused in this present study three dog breeds: Boxer, Dobermann e Rottweiler, with types constitutional and aptitudes functional characteristic and between itself, being collected 4 brains of each race. Of the brains they had been removed slices of the different areas of the brain cortex, that they had been prepared second conventional histological technique and stained by modified violet cresil. Through counting appearance-manual, comparative data were reached, mainly between brain areas *versus* breed associating types constitutional and aptitudes functional. The slices were analyzed with aid of Axióscopio Zeiss ® connected to the program of analysis of images KS-400 version 2.0 Kontron - Zeiss ®. The factors races, areas and brain hemispheres can be changeable dependents between itself, therefore estatisticament significant differences in corresponding values to the average of bodies of neurons of the areas studied in the different races had been found, as well as between the brain hemispheres.

Key words: Dogs. Breeds. Brain Cortex. Neurons. Counts of bodies neurons.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotografia macroscópica de encéfalo de cão da raça boxer, em vista lateral direita Identificando-se as áreas corticais definidas para coleta de material	30
Figura 2 - Fotografia macroscópica da face medial do hemisfério cerebral esquerdo e da superfície do corte sagital mediano das restantes estruturas encefálicas de cão da raça boxer, identificando-se as áreas corticais coletadas	30
Figura 3 - Médias de cada raça avaliada dentro das áreas e nos hemisférios estudados – São Paulo – 2006	37
Figura 4 - Médias de cada hemisfério avaliado dentro das raças e áreas – São Paulo – 2006	40
Figura 5 - Médias de cada área avaliada dentro das raças e hemisférios – São Paulo – 2006	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Números de observações (N), médias (MED), desvios padrão (DP), coeficientes de variação (CV), valores de mínimo (MIN) e máximo (MAX) para os números avaliados por campo e para o número médio de neurônios avaliados (CMED) – São Paulo – 2006.....	34
Tabela 2 -	Resumo da análise da variância para o número médio dos neurônios avaliados – São Paulo – 2006	35
Tabela 3 -	Resumo da análise da variância do desdobramento da interação tripla para avaliar as áreas e os hemisférios dentro de cada raça – São Paulo – 2006	35
Tabela 4 -	Estimativas de médias nas áreas e nos hemisférios dentro de cada raça avaliada – São Paulo – 2006	36
Tabela 5 -	Resumo da análise da variância do desdobramento da interação tripla para avaliar as raças e as áreas dentro de cada hemisfério – São Paulo – 2006	38
Tabela 6 -	Estimativas de médias nas raças e áreas dentro de cada hemisférios avaliado – São Paulo – 2006.....	39
Tabela 7 -	Resumo da análise da variância do desdobramento da interação tripla para avaliar as raças e os hemisférios dentro de cada área – São Paulo – 2006	41
Tabela 8 -	Estimativas de médias nas raças e hemisférios dentro de cada área avaliada – São Paulo – 2006	42

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVO	19
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
4	MATERIAL E MÉTODO	28
4.1	MATERIAL	28
4.2	LABORATÓRIOS	28
4.3	COLHEITA E ANÁLISE MACROSCÓPICA	29
4.4	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	31
4.4.1	Processamento em parafina	31
4.4.2	Coloração	31
4.4.3	Histometria	31
4.5	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	32
5	RESULTADOS	34
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

O relacionamento entre o cão e o homem existe desde os tempos mais remotos, há pelo menos 50.000 anos, sendo estes animais representados em obras de artes primitivas e até mesmo adorados pelos antigos egípcios na forma do seu deus Anúbis (GEARY, 1978).

Talvez o ser humano tenha se apercebido da semelhança de organização entre o seu corpo (soma) e o dos animais, particularmente dos mamíferos, sendo inegável que a vida (anima) também se manifesta da mesma maneira, tanto no homem quanto nos animais (PRADA, 1997).

Assim, observa-se que o cão apresenta mesmo, um comportamento diferenciado para com o homem, o que certamente se deve aos diversos estágios de evolução que ambos vivenciaram juntos. Surge daí a domesticação do cão pelo homem, o que resultou em comportamentos selecionados para guarda, caça, pastoreio e transporte e especialmente para companhia, que muitos seres humanos valorizam.

Sabe-se que existem diferentes raças de cães com características morfológicas próprias, definindo-se os respectivos tipos morfológicos ou tipos constitucionais. Estes tipos são representados pelo esquema arquitetônico ao qual correspondem indivíduos dotados das mesmas aptidões funcionais. Esta íntima associação entre tipo constitucional morfológico e aptidão funcional constitui assunto de grande relevância em Medicina Veterinária. De fato, seja para animais de produção, seja para animais de trabalho ou de companhia, por meio de seleção genética tem-se procurado o aperfeiçoamento de características anatômicas dos diferentes grupos e raças, buscando-se o refinamento das correspondentes aptidões funcionais. Assim, por exemplo, o cão da raça Rottweiler que, é do tipo mediolíneo, caracteriza-se por proporções equilibradas entre os diversos diâmetros corporais e apresenta força e resistência médias, tendo como aptidão funcional, originalmente apontar a caça e recolher após o abate. Já no cão da raça Boxer, que é do tipo morfológico brevílioneo, predominam os diâmetros transversais que são mais expressivos que no tipo mediolíneo. Animais dessa raça são possuidores de grande força e foram selecionados com aptidão funcional de guarda e defesa. E, por último, existem os animais longilíneos, como os da raça Dobermann, nos quais a altura e o

comprimento predominam sobre os diâmetros transversais. São capazes de desenvolver grande velocidade, sendo usados na perseguição de caça viva ou em corridas (PRADA, 1978).

Essas aptidões funcionais (força, velocidade e resistência) estão intimamente ligadas também à evolução que os sistemas orgânicos, especialmente o sistema nervoso central, sofreram nestes milhares de anos. A organização morfofuncional das estruturas neurais do homem e dos animais obedece a um único modelo (PRADA, 1997), sendo essa uma das razões levantadas pelos defensores da utilização de animais em pesquisas, na área de neurociência.

Recentemente, Esteves, Prada e Carvalho (2004) registraram diferenças quantitativas no número de corpos de neurônios em diferentes áreas funcionais do córtex cerebral de cães sem raça definida, comparando-se os dados obtidos em relação aos hemisférios cerebrais direito e esquerdo e aos sexos. Os resultados foram expressos por média de corpos de neurônios contados por área e indicam que os machos apresentam 16,70 corpos de neurônios por área contada e maior quantidade de corpos de neurônios no hemisfério cerebral direito (16,71). Nas fêmeas, as proporções foram inversas, apresentando-se maior quantidade de neurônios no hemisfério cerebral esquerdo (17,46). Concluíram que esses dados podem ser sugestivos de que cães machos expressam mais do que se esperava, estados emocionais, enquanto as fêmeas, o contingente racional. Esteves, Prada e Carvalho (2004) também sugeriram também que este comportamento talvez esteja relacionado com as tarefas que cada sexo desempenha, como exemplo, para as fêmeas, cuidar dos filhotes, caçar para se alimentar e alimentar os filhotes e, para os machos, conquista da parceira para o acasalamento, defesa do seu território e de proteção e defesa da matilha. Quando comparadas diferentes áreas corticais do cérebro, os cães apresentaram maiores quantidades de corpos de neurônios na área visual (19,77) seguindo-se a comportamental ou límbica (18,37) correspondente ao giro do cíngulo. A área comportamental ou límbica mostrou ser a segunda região com maior número de corpos de neurônios, o que sugere a importância dessa área na expressão comportamental. Entre as outras áreas cerebrais (olfatória, auditiva, tátil, motora e gustativa) estudadas não se verificou diferença significativa, concluindo então os autores que as diferenças podem ser apresentadas por várias causas diferenças de idade, parentesco com alguma raça e até mesmo diferenças

individuais que cada animal tem, ou seja, pode-se inferir que cada animal tem sua personalidade e nível de inteligência, ou seja, que os animais não são todos iguais.

Uma vez detectado, Esteves, Prada e Carvalho (2004), dimorfismo cerebral entre os sexos, surgiu-nos interesse em analisar as quantidades de corpos de neurônios em áreas do córtex cerebral de cães com tipos constitucionais e aptidões funcionais diferentes.

2 OBJETIVO

Este estudo propõe quantificar os neurônios de várias áreas cerebrais em três diferentes raças de cães, ou seja, boxer, dobermann e rottweiler, que apresentam tipos morfológicos e aptidões funcionais diferentes, visando obter informações quantitativas específicas sobre áreas corticais do encéfalo, correspondentes ao sistema límbico, visual, auditiva, locomotor, paladar, olfato e à área da sensibilidade geral (somestésica), que está relacionada a dor, temperatura (frio e calor), tato, pressão e propriocepção, e comparar a quantidade de neurônios de cada uma dessas áreas entre si, entre os hemisférios cerebrais e entre as raças.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- conhecer a distribuição quantitativa de neurônios nas áreas corticais definidas;
- obter elementos que nos permitam inferir se eventuais diferenças estruturais na distribuição quantitativa de corpos de neurônios nas áreas corticais são acompanhadas das diferentes aptidões funcionais das raças estudadas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura estará abordando trabalhos relacionados à metodologia empregada pelos autores e/ou aos resultados obtidos.

Diferentes estudos morfométricos têm sido efetuados no decorrer dos últimos anos, com o propósito de se esclarecer diferentes padrões específicos do Sistema Nervoso Central e das células nervosas, visando obter dados sobre área, volume e número em diferentes espécies animais e no homem. Nesses estudos, o mais utilizado é o método de Cavalieri combinado ou não com o método de secções verticais “fractionator” (HENERY; MAYHEW, 1989; MAYHEM, 1992; MAYHEW; MWAMENGELE; DANTZER, 1990; MICHEL; CRUZ-ORIVE, 1988).

Tower (1954) pesquisou a organização estrutural e funcional do córtex cerebral de mamíferos e a correlação da densidade neuronal com peso encefálico em duas baleias e dois elefantes indianos, dos quais foram retiradas diferentes regiões, ao acaso, do córtex cerebral e coradas com violeta cresil. O número de neurônios foi obtido contando os corpúsculos de Nissl por mm^2 e multiplicando-se o número obtido por 50 para se obter a densidade em mm^3 . Os resultados encontrados foram de 6800 neurônios/ mm^3 na baleia e de 6900 neurônios/ mm^3 no elefante indiano, sendo os pesos encefálicos de 6785gm e 6075gm, respectivamente.

Bubenik e Brown (1972) estudaram as diferenças morfológicas existentes entre os sexos em algumas áreas do córtex cerebral em macacos (amígdala e sistema límbico) envolvidos na regulação da atividade sexual. Foram comparadas cinco fêmeas de primatas normais castradas e tratadas com terapia de estrógeno/progesterona com cinco machos normais. Os encéfalos foram fixados, embebidos em parafina e corados com Hematoxilina Eosina e também pelo método de Szenthagothai modificado, e mensurados os diâmetros nucleares dos neurônios. Nas fêmeas foram encontrados 33 neurônios medindo $8,5\mu\text{m}$ e em machos 37 neurônios medindo $9,75\mu\text{m}$ / área contada. Diferenças significativas entre os sexos foram encontradas. Quanto ao tamanho do núcleo e a quantidade de neurônios, mas não foram observadas diferenças significativas no córtex cerebral nas regiões da amígdala medial.

Ruela et al. (1980) compararam morfometricamente os neurônios cerebelares de quatro homens, quatro gatos e quatro ratos segundo as variáveis de tamanho celular, densidade volumétrica de núcleos e nucléolos, superfície sináptica e número de sinapses por unidade de volume e por unidade de comprimento celular. Os resultados mostram que o tamanho do pericário, bem como o número de sinapses e a dimensão da superfície sináptica das células de Purkinje é bem mais significativo no homem do que no gato e no rato, não sendo encontradas diferenças significativas na densidade volumétrica de núcleos e nucléolos entre as espécies estudadas. O comprimento de média dos contatos sinápticos foi menor no homem (0,143 μm) que no gato (0,150 μm) e no rato (0,136 μm).

Avrushchenko (1981) fez análise morfométrica dos neurônios de Purkinje no córtex cerebelar de cães, sendo e a distribuição dos diferentes tipos de neurônios de Purkinje, nomeados de neurônios de Purkinje claros, escuros e intermediários, em três áreas sagitais do cerebelo. Os resultados encontrados revelam que uma maior concentração de neurônios de Purkinje foi encontrada na parte superior do cerebelo (5,3 a 7,5 neurônios de Purkinje por área contada).

West et al. (1991) estimaram o número total de neurônios em subdivisões do hipocampo de ratos usando o método estereológico de fractionator. Foram utilizados cinco ratos com 30 dias de vida, tendo sido as amostras processadas e cortadas com 20 μm e coradas com Giemsa. Os resultados mostraram que os ratos apresentam em média 150 núcleos neuronais totais por cada subdivisão do hipocampo (camada granular, hilus, região inferior, região superior e subiculum) e a média de quantidade de neurônios totais nas diferentes subdivisões do hipocampo do rato foi de 0,44 milhões.

Taga e Stipp (1994) em outros estudos em diferentes tecidos e órgãos, redigiram um manual prático de morfometria ao microscópio óptico para determinação da densidade, volume e contagem de células da glândula mandibular pela técnica de casualização dos campos histológicos de 30 camundongos com cerca de 120 dias de idade. Neste trabalho, as lâminas foram coradas por tricrômio de Masson modificado e para a quantificação foram obtidas 10 lâminas contendo 10 cortes semi – seriados cada uma. Através de sorteio 5 lâminas. Foram utilizadas e de cada lâmina selecionaram 1 corte. Para a escolha dos 10 campos por corte. Foi adotado um esquema de casualização sistemática.

Moryama, Schimada e Goto (1995) analisaram morfometricamente os neurônios dos gânglios geniculado, submandibular, espinhal cervical e cervical superior de humanos. Os fragmentos foram fixados primariamente em 3,7% de formaldeído e então misturados a 5% de dicromato de potássio com 5% de cromato de potássio no volume de 1:4. O material foi desidratado com etanol a 50, 70, 90, 95% e absoluto e embebido em celóide, sendo que os blocos foram cortados com espessura de 30µm analisados.

Coren (1996) propôs uma classificação das raças de cães quanto a inteligência de obediência e trabalho onde ressalta que é importante ter em mente que a inteligência de que fala não é inteligência instintiva dos cães. O pesquisador faz ainda algumas observações interessantes quanto aos grupos de cães e gradua de 1 à 79, que corresponde, do menor número para o maior, as melhores raças até as com menor grau de inteligência de obediência e trabalho. Nesta escala o Doberman, escolhido para este estudo, apresenta a graduação de número 5 e o cão da raça Rottweiler a de número 9, que corresponde aos melhores cães em termo de inteligência e obediência. Estes cães obedecem à primeira ordem, dada pelo dono/treinador, em cerca de 95% dos casos, e além disso eles costumam responder a estes comandos apenas alguns segundos depois do solicitado. O cão da raça Boxer ocupa a graduação de número 48, demonstrando que são cães de inteligência de obediência e trabalho intermediária. Normalmente eles respondem no primeiro comando, em 50% dos casos, e também de uma forma consideravelmente mais lenta do que as raças classificadas em níveis mais elevados de inteligência.

Everall et al. (1997) compararam dois métodos quantitativos para avaliar a perda substancial de neurônios no córtex frontal na doença de Alzheimer. As amostras foram incluídas em parafina e cortadas com 20µm de espessura, sendo os cortes corados com violeta cresil. Neste estudo foram comparados e correlacionados os resultados das densidades celulares calculadas por unidade de volume, obtidos pela investigação estereológica “selector”, com a “contagem por unidade de área” obtida por análise morfométrica. Os resultados demonstraram que o “selector” e a “contagem neuronal por área” são métodos complementares. Enquanto o “selector” revela graus de densidades celulares enquanto que o método de “contagem por área” demonstra volume expresso por área.

Pakkenberg e Gundersen (1997) compararam o número de neurônios do neocórtex em 62 homens com idades entre 19 – 87 anos e em 32 mulheres com

idades entre 18 – 93 anos. Observaram que há uma perda de 9,5% no número total de células nervosas do neocórtex em indivíduos com idade acima de 70 anos; observaram também diferenças quanto ao número de neurônios entre os sexos, em algumas regiões do neocórtex (frontal, temporal, parietal e occipital) Demonstraram que homens apresentam, comparativamente às mulheres, quantidades maiores de neurônios em todas as regiões do neocórtex.

Stopiglia et al. (1998) efetuaram análises morfométricas de fibras nervosas do nervo ulnar após reparação cirúrgica com auto-enxerto e prótese tubular em cães. As amostras foram incluídos em resina (Epon 812) e contrastados em citrato de chumbo e acetato de uranila e analisados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss – EM9).

Merindano et al. (1998) pesquisaram aspectos morfométricos do epitélio da córnea em alguns mamíferos. O material foi submetido a técnicas de fixação, inclusão e coloração padronizada com o uso de um microscópio óptico, sendo utilizado microscópio Nikon OPTIPHOT – 2 equipado com uma câmera Nikon Microflex UFX-DX e videocâmara colorida Hitachi EVI-1011P e monitor Sony KX-14CPI.

Arias, Pinochet e Disi (2001) estudaram o desenvolvimento do tecido nervoso em embriões de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados com Oxitetraciclina. As amostras foram embebidas em parafina, cortadas com 4µm e coradas com diferentes métodos: hematoxilina e eosina e violeta cresil. A coloração de violeta cresil mostrou distribuição anormal dos grânulos de Nissl com certo grau de degeneração do corpo neuronal nos embriões tratados com oxitetraciclina. Para quantificação dos neurônios foi utilizado o método de contagem manual por campo e não se observou diferenças significativas no total de número de neurônios entre o grupo controle e o grupo tratado.

Dombrowski et al. (2001) pesquisaram quantitativamente o neocórtex pré – frontal no macaco Rhesus. Foram utilizados sete animais para estimar a densidade de neurônios e células gliais, sendo o material coletado e cortado com espessura de 40µm em série de 10 cortes, corados com violeta cresil. Os resultados obtidos variaram em média de 12,59 a 22,63 neurônios em diferentes cortes da área pré – frontal, em valores por densidade de neurônios/mm³. Os resultados na área pré – frontal medial foram de 58.000 neurônios/mm³, na área orbital, de 57.000 neurônios/mm³ e, na área pré – frontal lateral de 61.000 neurônio/mm³.

Rabinowicz et al. (2002) estudaram as estruturas do córtex cerebral de homens e mulheres. Foram utilizados seis encéfalos de homens e cinco de mulheres. Em cada encéfalo foram escolhidos 86 locais para contagem. Foram analisadas em oito campos por lâmina, a quantidade de neurônios, astrócitos e neurópilos (contagem estereológica), bem como o tamanho dos neurônios e astrócitos. Os resultados mostraram que o grupo de mulheres apresentou maior quantidade de neurópilos que o dos homens, enquanto que o tamanho e o volume dos astrócitos não apresentaram diferença significativa. Os dados confirmaram os resultados de Pakkenberg e Gundersen (1997), de que há maior número de neurônios nos homens que nas mulheres. Foi também observado que a quantidade de neurônios no hemisfério cerebral esquerdo no grupo das mulheres é maior e no grupo de homens a quantidade de neurônios é maior no hemisfério cerebral direito, indicativos de que existem diferenças na estrutura do córtex cerebral humano feminino e masculino. De fato, no grupo dos homens os neurônios são menores em tamanho. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa SAS por meio do procedimento PROC MIXED, para comparar os grupos estudados de homens e mulheres.

Allen et al. (2003) estudaram o dimorfismo e assimetria sexual na substância branca e cinzenta do cérebro de humanos. Para este estudo foram obtidas imagens por ressonância magnética de 23 homens e mulheres. Todos os encéfalos foram reconstruídos em 3D com o objetivo de verificar o volume total da substância branca e cinzenta entre os hemisférios cerebrais e regiões frontal, parietal, temporal, occipital, giro do cíngulo, insula e corpo caloso e comparar entre os sexos. Por toda a estrutura o volume dos hemisférios cerebrais foi maior no homem (543 cm^3) que na mulher (480 cm^3), mas entre as substâncias cinzenta e branca a proporção foi maior na mulher ($1,35 \text{ cm}^3$) que no homem ($1,25 \text{ cm}^3$). Dimorfismo sexual foi maior em proporção mulher/homem (M/H) que entre as substâncias cinzenta e branca (C/B). O corpo caloso apesar de maior no homem é menor que na relação M/H ($9,68/ 10,57 \text{ cm}^3$) em relação ao dimorfismo sexual, tanto o giro do cíngulo e a insula exibiram uma assimetria mais forte. O giro do cíngulo esquerdo é significativamente menor ($2,35 \text{ cm}^3$) que o direito ($3,30 \text{ cm}^3$), a insula esquerda é significativamente maior ($17,5 \text{ cm}^3$) que a direita ($8,50 \text{ cm}^3$) na proporção C/B.

Esteves, Prada e Carvalho (2004) procederam análise comparativa principalmente levando-se em conta diferentes áreas cerebrais nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo e entre os sexos, para o conhecimento da distribuição e da quantidade de corpos de neurônios nas diferentes áreas corticais do encéfalo de cães. Os resultados encontrados demonstram que os machos apresentam maior quantidade de corpos de neurônios no hemisfério cerebral direito (16,71) expressos em média. Nas fêmeas as proporções foram inversas, apresentando maior quantidade de neurônios no hemisfério cerebral esquerdo (17,46), quando comparados as diferentes áreas cerebrais. Os cães apresentaram maiores quantidades de corpos de neurônios na área visual (19,77), seguida da comportamental ou límbica (18,37), não havendo entre as outras áreas cerebrais, diferença significativa.

Anton e Rospars (2004) analisaram a quantidade de receptores neuronais olfatórios no lobo antenal do mosquito *Anopheles gambiae*, transmissor da Malária. Foram coletados nove encéfalos de fêmeas deste mosquito sendo que quatro destes foram processados e corados para contagem de neurônios. O número de amostras estipulado para a contagem foi de 10 campos totais tendo sido a mensuração dos neurônios realizada por contagem em microscópio invertido. Obtiveram-se, em média, 6,0 neurônios por campo.

Gittins e Harrison (2004) realizaram um estudo morfométrico do “córtex cingular anterior” em cinco encéfalos de humanos, mensurando espessura cortical, espessura das camadas, densidade e tamanho neuronal e densidade de células gliais usando o método de “disector” e “nucleator”. O material foi fixado, processado e embocado em parafina, sendo efetuados cortes seriados com espessura de 25µm e corados com violeta cresil. Para a contagem das células foram escolhidos aleatoriamente quatro campos por camada, utilizando-se um microscópio com objetiva de 4x. Os resultados mostraram que a densidade de neurônios foi mais significativa nas camadas V e VI com valores expressos em médias de 5,203. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de ANOVA (RM – ANOVA).

Tsukahara et al. (2004) publicaram uma pesquisa com apoptose pós - natal, desenvolvimento e diferenças sexuais no septo lateral de ratos. O material foi corado com violeta cresil e as imagens foram capturadas por um programa de imagens. O volume total das células nervosas foi estimado usando-se o cálculo de soma da área mensurada (mm^2) x 0,01 (mm, tamanho da secção) x 16 (número de

secções incluídas no intervalo). Os resultados do volume total de células em média de cada grupo variaram de 93,44 a 198,49 por milímetro cúbico nos diferentes sexos estudados.

Binzegger et al. (2004) realizaram um mapeamento quantitativo do circuito primário no córtex visual do cérebro de gatos que foi estimado segundo peso das projeções entre diferentes tipos de neurônios. Foi realizada uma reconstrução tridimensional de 39 neurônios do lobo aferente do tálamo e dados morfométricos da distribuição laminar da árvore dendrítica, sinapses e número de neurônios. Em cada uma das camadas contadas foram observados valores diferentes, constatando em média 7×10^3 neurônios por camada contada.

Raz et al. (2004) utilizaram 200 humanos adultos saudáveis para comparar idade, dimorfismo sexual, assimetrias hemisféricas e volume de 13 regiões do córtex cerebral utilizando a ressonância magnética. Os resultados mostraram que o córtex pré frontal lateral apresenta diferenças grandes quando relacionadas à idade, enquanto que é pouco significativo quando associado a outras áreas como a substância branca pré frontal, senso-motora, visual e regiões associativas. O hipocampo apresentou uma significativa retração em pessoas de meia idade, a região visual primária, cíngulo anterior, parietal inferior não mostrou diferenças relacionadas à idade. Homens apresentaram um volume maior total do encéfalo exceto no lóbulo parietal inferior quanto às diferenças entre sexos o encéfalo é estatisticamente equilibrado em tamanho. Em algumas regiões como o hipocampo e giro fusiforme os homens apresentam uma tendência negativa em relação à mulher quando comparada à idade.

Gagliardo et al. (2005) estudaram o número total de neurônios no gânglio mesentérico caudal de cães domésticos nas diferentes fases do desenvolvimento que teve como objetivo principal qual seria o papel da idade na população total e no tamanho dos neurônios. O envelhecimento é caracterizado por um progressivo declínio na função neuronal envolvendo tanto o sistema nervoso central como o periférico. O aumento da idade é verificado por alterações no número e no tamanho dos neurônios. Contudo, estes dados são controversos e pouco conhecidos nos gânglios periféricos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo estudar o gânglio mesentérico caudal (GMC) de cães em dois períodos distintos do desenvolvimento (maturação e envelhecimento) a procura de alterações microestruturais no gânglio e alterações quantitativas e morfométricas nos neurônios

presentes neste. A importância do GMC está ligada à inervação simpática do intestino grosso, esfíncter anal interno e parcialmente do aparelho urogenital. Para o estudo foram utilizados nove cães domésticos, sem raça definida e machos, divididos em três grupos etários com idades bem definidas (1-2 meses, 1-3 anos e 5-10 anos). Os gânglios foram processados para o estudo da microscopia de luz e as análises morfométrica e estereológica foram, respectivamente, realizadas utilizando o software de análise morfométrica KS 400 ZEISS(R) e o método estereológico do disector físico. O aumento da idade foi caracterizado por uma maior quantidade de tecido não neuronal entre os neurônios e um aumento no volume do gânglio. O tamanho dos neurônios do GMC aumenta com a progressão da idade, se encontrando no interior destes a presença de grânulos de lipofucsina. A relação núcleo-citoplasma diminui com a progressão da idade. Quanto às alterações quantitativas, o número total de neurônios no GMC aumenta com a idade em cães adultos e senis, diferentemente da densidade neuronal (neurônios/mm² POT. 3') que diminui com a progressão da idade.

4 MATERIAL E MÉTODO

Foram enfocadas neste presente estudo, 3 raças de cães, ou seja, Boxer, Dobermann e Rottweiler, com tipos constitucionais e aptidões funcionais característicos e distintos entre si (PRADA, 1978).

4.1 MATERIAL

Os animais, após óbito, foram adquiridos em Hospitais Veterinários, Clínicas Veterinárias particulares com autorização dos seus proprietários e Centro de Controle de Zoonoses, no município de São João da Boa Vista.

Foram coletados 4 encéfalos de cada raça, totalizando no final 12 encéfalos. Os cães foram identificados quanto à idade, raça e *causa mortis*, não sendo considerados para a amostra os animais acometidos por quaisquer afecções neurológicas.

Uma vez isolados, os encéfalos foram pesados, fotografados e depois mensurados com o auxílio de paquímetro, obtendo – se, portanto, a medida dos seguintes eixos: latero – lateral cranial (entre os bulbos olfatórios direito e esquerdo); latero - lateral caudal (entre os giros supra silvianos direito e esquerdo); rostro – caudal (da extremidade rostral do lobo frontal até a fissura transversal) e dorso – ventral (corresponde à distância entre a superfície dorsal do lobo parietal e a ventral do lobo piriforme), expressa em centímetros (cm).

4.2 LABORATÓRIOS

O presente estudo foi realizado no Setor de Anatomia dos Animais Domésticos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – São Paulo e no Laboratório de Pesquisas Morfológicas da Faculdade

de Medicina Veterinária da UNIfvob - Universidade da Fundação de Ensino Octávio Bastos – São João da Boa Vista – SP.

4.3 COLHEITA E ANÁLISE MACROSCÓPICA

Após a identificação de cada animal, iniciávamos então, o seguinte procedimento: A artéria carótida comum era canulada nos dois antímeros, para efetuar-se a perfusão com 4% de paraformaldeído em solução tampão fosfato pH 7,4 (Paraformaldehyde – Sigma Chemical Co. USA). Após fixação de, no mínimo, 2 semanas, as cabeças eram abertas e os encéfalos retirados inteiramente para compilação dos dados, referentes aos pesos e medidas (Tabela 4). Finalmente os encéfalos eram armazenados em recipientes de vidro contendo 4% de paraformaldeído (Paraformaldehyde – Sigma Chemical Co. USA) em solução de tampão fosfato pH 7,4. Os encéfalos permaneceram imersos na solução tampão fixadora por três semanas, seguindo o protocolo utilizado por Rabinowiz et al. (1999). Em cada encéfalo definimos os diferentes sítios do córtex cerebral escolhidos para estudo nos dois hemisférios cerebrais, segundo a classificação de Von Economo e Koskinas (1925). Foram retiradas amostras homotípicas destes locais medindo 2 X 0,5 X 1,0 cm (Figuras 1 e 2).

Área olfatória	Área gustativa
Área somestésica	Área auditiva
Área motora	Área visual

Figura 1 – Fotografia macroscópica de encéfalo de cão da raça Boxer, em vista lateral direita, identificando-se as áreas corticais definidas para coleta de material (Adaptado de Von Economo e Koskinas, 1925)

Giro do cíngulo – sistema límbico.

Figura 2 – Fotografia macroscópica da face medial do hemisfério cerebral esquerdo e da superfície do corte sagital mediano das restantes estruturas encefálicas de cão da raça boxer, identificando-se as áreas corticais coletadas (Adaptado de Von Economo e Koskinas, 1925)

4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram preparadas a fim de se obter a imagem dos corpos de neurônios na microscopia de luz através do processamento em parafina. A coloração utilizada foi o método de violeta cresil modificada por Esteves, Prada e Carvalho (2004) e a análise das lâminas foi realizada com auxílio de microscópio óptico Axióscopio Zeiss[®], acoplado a uma câmera de vídeo e monitor de computador, submetidos ao sistema KS-400 versão 2.0 Kontron – Zeiss[®].

4.4.1 Processamento em Parafina

Os fragmentos foram processados seguindo-se a seqüência padronizada nos procedimentos histológicos convencionais: desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em histosec[®] - Merck (TOLOSA et al., 2003).

Cada região foi emblocada e cortada com espessura de 5µm em micrótomo Leica 2165. De cada região foram feitos cinco cortes em série.

4.4.2 Coloração

Os cortes foram corados pelo método de coloração de violeta cresil modificado, conforme o utilizado por Esteves, Prada e Carvalho (2004), para facilitar a visualização dos Corpúsculos de Nissl dos corpos de neurônios e assim possibilitar marcar fortemente e individualmente cada célula para posterior contagem.

4.4.3 Histometria

As lâminas foram examinadas com objetiva de 20x, em microscópio óptico Axióscopio Zeiss[®] acoplado a uma câmera de vídeo e monitor de computador. Os

cortes foram submetidos ao sistema KS-400 versão 2.0 Kontron – Zeiss®, analisando-se a quantidade de neurônios expressa em números por área escolhida. Com base na literatura consultada, optamos pela escolha do método de contagem “visual” por área, como preconizado para sistema nervoso central por Avrushchenko (1981), Michon et al. (1991) e Rabinowicz et al. (2002).

Para a análise quantitativa, foram selecionados cinco cortes seriados e contínuos por região, seguindo-se então a mensuração manual com o auxílio de um retículo desenhado em lâmina transparente e inserido no monitor do computador para facilitar a contagem dos neurônios de cada área. Em cada corte foram contados cinco campos distintos, obtendo-se deles uma média; das cinco médias obteve-se uma média final para análise estatística. Foram também realizadas fotomicrografias de campos de interesse para documentação.

4.5 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Foram realizadas análises descritivas do número médio de neurônios, visando estabelecer o padrão característico de cada um dos animais, bem como foi efetuada a verificação das pressuposições comumente utilizadas em análises de dados experimentais. As análises descritivas foram realizadas por meio de procedimento PROC MEANS do programa *Statistical Analysis System*, versão 8.0 (SAS, 1995).

Para avaliação dos números médios de neurônios, segundo as diferentes raças, áreas e hemisférios avaliados, utilizou-se o procedimento PROC GLM do programa citado anteriormente. Foram considerados os efeitos principais de raças, áreas e hemisférios, as interações duplas raças *versus* áreas, raça *versus* hemisférios, áreas *versus* hemisférios, bem como a interação tripla raças *versus* área *versus* hemisférios. Nestas análises adotou-se o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ijkl} = \mu + R_i + A_j + H_k + RA_{ij} + RH_{ik} + AH_{jk} + RAH_{ijk} + e_{ijkl}$$

em que,

y_{ijkl} = é o número médio de neurônios do animal $\underline{l}$, no hemisfério $\underline{k}$, na área $\underline{j}$ e de raça $\underline{i}$;

μ = constante inerente a todas as observações;

R_i = efeito da i -ésima raça, sendo $i = 1$ (Boxer), 2 (Doberman) e 3 (Rottweiler);

A_j = efeito da j -ésima área de avaliação, sendo $j = 1$ (auditiva), 2 (comportamental), 3 (gustativa), 4 (motora), 5 (olfativa), 6 (tátil) e 7 (visual);

H_k = efeito do k -ésimo hemisfério de avaliação, sendo $i = 1$ (direito) e 2 (esquerdo);

RA_{ij} = efeito da interação dupla da raça $\underline{i}$ com a área $\underline{j}$;

RH_{ik} = efeito da interação dupla da raça $\underline{i}$ com o hemisfério $\underline{k}$;

AH_{jk} = efeito da interação dupla da área $\underline{j}$ com o hemisfério $\underline{k}$;

RAH_{ijk} = efeito da interação tripla da raça $\underline{i}$ com a área $\underline{j}$ e com o Hemisfério $\underline{k}$;

e_{ijkl} = efeito aleatório residual associado número médio de neurônios do animal $\underline{l}$, no hemisfério $\underline{k}$, na área $\underline{j}$ e de raça $\underline{i}$;

Para este modelo, uma vez que foram verificados resultados significativos ($P < 0,05$) para Interação Tripla (raças *versus* área *versus* hemisférios) procederam-se os desdobramentos de três formas distintas:

- (i) Desdobramentos da Interação área e hemisférios dentro de cada raça avaliada;
- (ii) Desdobramentos da Interação raça e área dentro de cada hemisfério avaliado;
- (iii) Desdobramentos da Interação raça e hemisfério dentro de cada área avaliada.

Para estes desdobramentos, em caso de resultados significativos ($P < 0,05$) para as diferentes fontes de variações avaliadas, adotou-se como procedimento para comparações múltiplas o Teste t de Student.

5 RESULTADOS

Os números de observações e as estimativas de médias, desvios padrão, coeficientes de variação, valores de mínimo e máximo para os números avaliados por campo (C1, C2, C3, C4 e C5), bem como para o número médio de neurônios (CMED), encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Números de observações (N), médias (MED), desvios padrão (DP), coeficientes de variação (CV), valores de mínimo (MIN) e máximo (MAX) para os números avaliados por campo e para o número médio de neurônios avaliados (CMED) – São Paulo – 2006

Campos	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
C1	336	9,592	3,180	33,151	3,200	21,500
C2	336	9,854	3,571	36,232	3,400	26,800
C3	336	9,931	3,771	37,968	0,800	26,300
C4	336	9,952	3,758	37,757	3,500	24,500
C5	336	10,012	3,612	36,073	4,200	23,400
CMED	336	9,849	3,368	34,194	5,600	22,700

C1=campo 1; C2=campo 2; C3=campo 3; C4=campo 4; C5=campo 5; CMED= média dos 5 campos avaliados

Na tabela 1, verificou-se que as estimativas médias dos diferentes campos avaliados foram próximas à estimativa com base no número médio de neurônios. Esta característica também foi observada em relação às medidas de variabilidades (desvios padrão e coeficientes de variação). Dadas essas características de semelhança dos campos avaliados em relação à média dos campos, optou-se por trabalhar com o número médio dos neurônios.

O resumo da análise da variância para o número médio dos neurônios, considerando os efeitos principais de raças, áreas e hemisférios, bem como as interações duplas e a tripla, encontra-se na tabela 2.

Tabela 2 - Resumo da análise da variância para o número médio dos neurônios avaliados – São Paulo – 2006

Fontes de Variação	GL	QM	F	
Raça	2	0,270	0,060	ns
Área	6	131,043	28,520	**
Hemisfério	1	189,300	41,200	**
Interação Raça x Área	12	30,966	6,740	**
Interação Raça x Hemisfério cerebral	2	64,488	14,040	**
Interação Área x Hemisfério cerebral	6	121,792	26,510	**
Interação Raça x Área x Hemisfério cerebral	12	20,103	4,380	**
Resíduo	294	4,594		

ns = $P > 0,05$ (não-significativo); ** = $P < 0,01$ (significativo a 1% de probabilidade).

GL = grau de liberdade

QM = quadrado médio

F = fator de variância

Observa-se, na tabela 2, que a fonte de variação associada à interação tripla foi altamente significativa ($P < 0,01$), indicando que as variáveis raças, áreas e hemisférios são dependentes entre si. Esta dependência entre os fatores raças, áreas e hemisférios impede a avaliação dos efeitos principais em separado, sendo necessária à realização do(s) desdobramento(s) de dois efeitos, considerando-se o terceiro, fixado. Assim, conforme já especificado em material e método, visando o entendimento das relações do número médio de neurônios, realizaram-se três desdobramentos, sendo fixado um efeito enquanto os dois outros variaram.

O desdobramento da interação tripla para avaliar as áreas e os hemisférios dentro de cada raça estudada, foi expresso na tabela 3.

Tabela 3 - Resumo da análise da variância do desdobramento da interação tripla para avaliar as áreas e os hemisférios dentro de cada raça – São Paulo - 2006

Fontes de Variação	GL	QM	F	
Área x Hemisfério cerebral (HC)				
Auditiva x HC direito	2	131,167	28,550	**
Auditiva x HC esquerdo	2	4,630	1,010	ns
Límbica x HC direito	2	2,095	0,460	ns
Límbica x HC esquerdo	2	11,188	2,440	ns
Gustativa x HC direito	2	0,880	0,190	ns
Gustativa x HC esquerdo	2	1,387	0,300	ns
Motora x HC direito	2	8,192	1,780	ns
Motora x HC esquerdo	2	5,892	1,280	ns
Olfatória x HC direito	2	0,761	0,170	ns
Olfatória x HC esquerdo	2	77,712	16,910	**
Somestésica x HC direito	2	11,183	2,430	ns
Somestésica x HC esquerdo	2	11,225	2,440	ns
Visual x HC direto	2	101,993	22,200	**
Visual x HC esquerdo	2	2,869	0,620	ns

ns = $P > 0,05$ (não-significativo); ** = $P < 0,01$ (significativo a 1% de probabilidade)

GL = grau de liberdade

QM = quadrado médio

F = fator de variância

Na tabela 3, verificou-se que diferenças significativas ($P < 0,01$) entre as raças foram observadas somente entre as áreas auditiva e visual do hemisfério cerebral direito e olfatória do hemisfério cerebral esquerdo. Para as demais áreas e hemisférios, dentro de cada raça não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$).

As estimativas de médias nas áreas e nos hemisférios dentro de cada raça avaliada encontram-se na tabela 4 e figura 3.

Para as áreas auditiva e visual do hemisfério cerebral direito, as raças Boxer e Dobermann apresentaram valores médios de neurônios iguais e superiores aos observados para a raça Rottweiler.

Tabela 4 - Estimativas de médias nas áreas e nos hemisférios dentro de cada raça avaliada – São Paulo - 2006

Área – Hemisfério cerebral	BOXER	DOBER	ROTTW
Auditiva – HC direito	18,138 ^A	18,683 ^A	11,413 ^B
Auditiva – HC esquerdo	9,350 ^A	7,868 ^A	8,313 ^A
Límbica – HC direito	9,525 ^A	9,245 ^A	10,238 ^A
Límbica – HC esquerdo	9,263 ^A	10,540 ^A	11,625 ^A
Gustativa – HC direito	8,763 ^A	8,100 ^A	8,463 ^A
Gustativa – HC esquerdo	7,600 ^A	7,915 ^A	8,425 ^A
Motora – HC direito	8,600 ^A	8,570 ^A	10,338 ^A
Motora – HC esquerdo	7,800 ^A	8,445 ^A	9,500 ^A
Olfatória – HC direito	7,900 ^A	8,315 ^A	7,713 ^A
Olfatória – HC esquerdo	8,575 ^B	7,003 ^B	13,013 ^A
Somestésica – HC direito	8,300 ^A	8,208 ^A	10,300 ^A
Somestésica – HC esquerdo	9,788 ^A	7,423 ^A	8,725 ^A
Visual – HC direito	15,438 ^A	16,495 ^A	9,850 ^B
Visual – HC esquerdo	9,275 ^A	10,285 ^A	10,338 ^A

Médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste *t* de Student

Figura 3 - Médias de cada raça avaliada dentro das áreas e nos hemisférios estudados – São Paulo – 2006

Entretanto, para a área olfatória do hemisfério cerebral esquerdo, as raças Boxer e Dobermann apresentaram valores médios de neurônios respectivamente iguais e inferiores aos observados para a raça Rottweiler.

O desdobramento da interação tripla das raças e das áreas dentro de cada hemisfério avaliado foi expresso na tabela 5.

Tabela 5 - Resumo da análise da variância do desdobramento da interação tripla para avaliar as raças e as áreas dentro de cada hemisfério cerebral – São Paulo – 2006

Fontes de Variação Raça x Área	GL	QM	F	
Boxer x Auditiva	1	308,881	67,230	**
Boxer x Límbica	1	0,276	0,060	ns
Boxer x Gustativa	1	5,406	1,180	ns
Boxer x Motora	1	2,560	0,560	ns
Boxer x Olfatória	1	1,823	0,400	ns
Boxer x Somestésica	1	8,851	1,930	ns
Boxer x Visual	1	151,906	33,060	**
Dobermann x Auditiva	1	467,857	101,830	**
Dobermann x Límbica	1	6,708	1,460	ns
Dobermann x Gustativa	1	0,137	0,030	ns
Dobermann x Motora	1	0,063	0,010	ns
Dobermann x Olfatória	1	6,891	1,500	ns
Dobermann x Somestésica	1	2,465	0,540	ns
Dobermann x Visual	1	154,256	33,580	**
Rottwiller x Auditiva	1	38,440	8,370	**
Rottwiller x Límbica	1	7,701	1,680	ns
Rottwiller x Gustativa	1	0,006	0,000	ns
Rottwiller x Motora	1	2,806	0,610	ns
Rottwiller x Olfatória	1	112,360	24,460	**
Rottwiller x Somestésica	1	9,923	2,160	ns
Rottwiller x Visual	1	0,951	0,210	ns

ns = $P > 0,05$ (não-significativo); ** = $P < 0,01$ (significativo a 1% de probabilidade)

GL = grau de liberdade

QM = quadrado médio

F = fator de variância

Pela tabela 5, verificou-se que existem diferenças significativas ($P < 0,01$) observadas nos hemisférios para as seguintes combinações raças e áreas: Boxer - auditiva e visual, Dobermann – auditiva e visual e para Rottweiller – auditiva e olfatória. Para as demais raças e áreas, dentro de cada hemisfério, não existem diferenças significativas ($P > 0,05$). As estimativas de médias nas raças e áreas dentro de cada hemisfério, foram expressas na tabela 6 e figura 4.

Tabela 6 - Estimativas de médias nas raças e áreas dentro de cada hemisfério cerebral avaliado – São Paulo - 2006

Raças - Áreas	HC direito	HC esquerdo
Boxer – Auditiva	18,138 ^A	9,350 ^B
Boxer – Límbica	9,525 ^A	9,263 ^A
Boxer – Gustativa	8,763 ^A	7,600 ^A
Boxer – Motora	8,600 ^A	7,800 ^A
Boxer – Olfatória	7,900 ^A	8,575 ^A
Boxer – Somestésica	8,300 ^A	9,788 ^A
Boxer - Visual	15,438 ^A	9,275 ^B
Dobermann - Auditiva	18,683 ^A	7,868 ^B
Dobermann - Límbica	9,245 ^A	10,540 ^A
Dobermann - Gustativa	8,100 ^A	7,915 ^A
Dobermann - Motora	8,570 ^A	8,445 ^A
Dobermann - Olfatória	8,315 ^A	7,003 ^A
Dobermann - Somestésica	8,208 ^A	7,423 ^A
Dobermann - Visual	16,495 ^A	10,285 ^B
Rottweiler - Auditiva	11,413 ^A	8,313 ^B
Rottweiler - Límbica	10,238 ^A	11,625 ^A
Rottweiler - Gustativa	8,463 ^A	8,425 ^A
Rottweiler - Motora	10,338 ^A	9,500 ^A
Rottweiler - Olfatória	7,713 ^B	13,013 ^A
Rottweiler - Somestésica	10,300 ^A	8,725 ^A
Rottweiler - Visual	9,850 ^A	10,338 ^A

Médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si com 1% de probabilidade pelo Teste F

Para as raças e áreas Boxer – auditiva e visual, Dobermann – auditiva e visual e Rottweiler - auditiva, valores médios de neurônios significativamente ($P < 0,01$) superiores foram verificados no hemisfério cerebral direito em relação aos observados no hemisfério cerebral esquerdo.

Figura 4 - Médias de cada hemisfério cerebral avaliado dentro das raças e áreas – São Paulo – 2006

Para os cães da raça Rottweiler, na área olfatória, o hemisfério cerebral esquerdo apresentou valor médio de neurônios significativamente superior ($P<0,01$) ao observado no hemisfério cerebral direito.

O desdobramento da interação tripla das raças e das áreas dentro de cada hemisfério avaliado foi apresentado na tabela 5.

O desdobramento da interação tripla das raças e dos hemisférios dentro de cada área avaliada foi apresentado na tabela 7.

Tabela 7 - Resumo da análise da variância do desdobramento da interação tripla para avaliar as raças e os hemisférios cerebrais dentro de cada área – São Paulo – 2006

Fontes de Variação	GL	QM	F	
Raça – Hemisfério cerebral (HC)				
Boxer – HC direito	6	133,948	29,150	**
Dobermann – HC direito	6	162,085	35,280	**
Rottweiler – HC direito	6	12,624	2,750	*
Boxer – HC esquerdo	6	5,610	1,220	NS
Dobermann – HC esquerdo	6	15,329	3,340	**
Rottweiler – HC esquerdo	6	25,377	5,520	**

ns= $P>0,05$ (não-significativo); *= $P<0,05$ (significativo a 5% de probabilidade); **= $P<0,01$ (significativo a 1% de probabilidade).

GL= grau de liberdade QM= quadrado médio F= fator de variância

Na tabela 7, diferenças significativas foram observadas para todas as combinações de raças e hemisférios, à exceção da raça Boxer, no hemisfério cerebral esquerdo, para o qual não foram encontradas diferenças significativas ($P>0,05$). As estimativas de médias nas raças e hemisférios avaliados dentro de cada área são apresentadas na tabela 8 e figura 5.

Para as raças Boxer e Dobermann, no hemisfério cerebral direito, foram observados maiores valores médios de neurônios na área auditiva e menores valores médios nas áreas límbica, gustativa, motora, olfatória e somestésica.

Contudo, para a raça Rottweiler, no hemisfério cerebral direito, maiores valores médios de neurônios foram verificados nas áreas auditiva, límbica, motora, somestésica e visual. Já para as áreas gustativa e olfatória, foram observados os menores valores médios de neurônios no hemisfério cerebral direito, no hemisfério cerebral esquerdo, as áreas límbica e olfatória apresentaram valores médios de

neurônios superiores às demais áreas, e menores valores médios de neurônios foram verificados nas áreas auditiva, gustativa, motora, somestésica e visual.

Na raça Boxer o hemisfério cerebral esquerdo não apresentou diferenças significativas para as várias áreas estudadas. Para a raça Dobermann o hemisfério cerebral esquerdo apresentou valores médios superiores de neurônios para as áreas límbica, motora e visual e valores inferiores nas áreas auditiva, gustativa, olfatória e somestésica.

Tabela 8 - Estimativas de médias nas raças e hemisférios cerebrais dentro de cada área avaliada – São Paulo – 2006

Raças - Hemisférios	AUDIT	COMP	GUST	MOTOR	OLFAT	TACT	VISU
BOXER-HCD	18,138 ^A	9,525 ^C	8,763 ^C	8,600 ^C	7,900 ^C	8,300 ^C	15,438 ^B
DOBER-HCD	18,683 ^A	9,245 ^C	8,100 ^C	8,570 ^C	8,315 ^C	8,208 ^C	16,495 ^B
ROTT-HCD	11,413 ^A	10,238 ^{A,B}	8,463 ^{B,C}	10,338 ^{A,B}	7,713 ^C	10,300 ^{A,B}	9,850 ^{A,B}
BOXER-HCE	9,350 ^A	9,263 ^A	7,600 ^A	7,800 ^A	8,575 ^A	9,788 ^A	9,275 ^A
DOBER-HCE	7,868 ^B	10,540 ^A	7,915 ^B	8,445 ^{A,B}	7,003 ^B	7,423 ^B	10,285 ^A
ROTT-HCE	8,313 ^C	11,625 ^{A,B}	8,425 ^C	9,500 ^C	13,013 ^A	8,725 ^C	10,338 ^{B,C}

Médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste *t* de Student

Sendo que:

Aud: área auditiva
 Gust: área gustativa
 Olfat: área olfatória
 Visu: área visual

Comp: área límbica
 Motor: área motora
 Tact: área somestésica

HCD: hemisfério cerebral direito
 HCE: hemisfério cerebral esquerdo

Figura 5 - Médias de cada área avaliada dentro das raças e hemisférios cerebrais – São Paulo – 2006

6 DISCUSSÃO

A classificação das raças de cães proposta por Coren (1996) levou-nos a refletir sobre a possibilidade de existir uma eventual correlação entre os comportamentos diferentes em termos do que este autor chamou de “inteligência de obediência e trabalho”, observados nas diversas raças de cães, com características morfológicas de seus correspondentes cérebros. Nesta reflexão, estamos considerando a hipótese de ser o cérebro, o “órgão” de expressão da mente, conforme refere Finger (2000) na Introdução de seu livro “Minds Behind the Brain”.

Por outro lado, sabemos que aos diferentes tipos constitucionais apresentados pelas inúmeras raças de cães existentes (PRADA, 1978) estão associadas aptidões funcionais diferenciadas, o que vem ao encontro do mencionado por Coren (1996) em relação aos diversos graus de inteligência de obediência e de trabalho que encontrou ao analisar diferentes grupos raciais desses animais.

Acrescentam-se a esta nossa reflexão, dados que obtivemos anteriormente (ESTEVES; PRADA; CARVALHO, 2004), relativos à quantificação do número de corpos de neurônios em diversas áreas corticais do cérebro de cães machos e fêmeas, sem raça definida. As diferenças encontradas entre os sexos motivaram-nos a efetuar a quantificação de neurônios em algumas áreas corticais do cérebro de cães pertencentes a raças com tipos constitucionais diferentes e correspondentes aptidões funcionais.

Baseamo-nos então nesse trabalho de Prada (1978), para selecionar três diferentes raças de cães, com tipos morfológicos característicos e correspondentes aptidões funcionais, para quantificar o número de neurônios de algumas áreas de seu córtex cerebral: Dobermann - animal longilíneo, capaz de desenvolver grande velocidade, sendo adequado para perseguição de caça viva; Rottweiler, animal mediolíneo, originalmente utilizado para apontar a caça e recolhê-la; Boxer, animal brevilíneo, adequado para as tarefas de guarda e de defesa. Além da quantificação dos neurônios, nas áreas escolhidas, nosso interesse nessa análise é, portanto, também o de verificar a eventual existência de correlação de resultados, com a diversidade das raças estudadas.

Decidimos restringir nossa amostragem a fêmeas para diminuir o número de variáveis a comporem a estrutura do trabalho. Optamos pelas fêmeas por apresentarem, no nosso entendimento, um repertório comportamental mais rico em relação aos machos.

A pesquisa da literatura tem-nos mostrado publicações recentes relacionadas à contagem de células por métodos de morfometria, principalmente no relativo a células do sistema nervoso (BINZEGGER et al., 2004; EVERALL et al., 1997; RUELA et al., 1980; WEST et al., 1991).

Um trabalho importante, que serviu de base para a nossa pesquisa, foi o de Rabinowicz et al. (2002), que focalizou a estrutura do córtex cerebral de homens e mulheres. Em cada encéfalo foram considerados 86 locais escolhidos e em 8 campos para cada local, foi avaliada a quantidade de neurônios, astrócitos e neurópilos (contagem estereológica). Além de outros resultados, esse trabalho mostrou que a quantidade de neurônios no hemisfério cerebral esquerdo é maior no grupo das mulheres e no hemisfério cerebral direito é maior no grupo de homens. Portanto, já sabemos que, além de existirem diferenças no córtex cerebral, entre os sexos, o que igualmente pudemos verificar em estudo anterior, em cães (ESTEVES; PRADA; CARVALHO, 2004), há ainda diferenças entre os hemisférios, o que nos motivou a buscar dados comparativos entre os dois antímeros cerebrais, também.

Alguns trabalhos que relacionamos, apesar de não se inserirem no foco principal de nossa atenção, de alguma forma acham-se inseridos no halo de interesse do assunto, pois a análise desses trabalhos orientou-nos a decidir sobre alguns procedimentos particularmente relacionados à parte técnica da nossa pesquisa. Dentre essas publicações encontramos a de Tower (1954) que avaliou a quantidade total de neurônios em baleias (6800 neurônios/mm³) e elefantes (6900 neurônios/mm³) dos quais foram retiradas diferentes regiões, ao acaso, do córtex cerebral e coradas com a mesma técnica utilizada nesta pesquisa.

A seu turno, West et al. (1991) estimaram o número total de neurônios no hipocampo de ratos (0,44 milhões de neurônios), sendo que as amostras foram processadas e cortadas com 20µm e coradas com Giemsa. Com base nas características deste trabalho, optamos em nossa pesquisa por efetuar cortes com espessura de 5µm e utilizar como corante o violeta cresil.

Stopiglia et al. (1998) e Merindano et al. (1998) efetuaram respectivamente, análises morfométricas de fibras nervosas do nervo ulnar do cão e do epitélio da

córnea de alguns mamíferos, utilizando como técnica histológica de inclusão a resina e contrastados com citrato de chumbo e acetato de uranila. Utilizamos em nosso trabalho a inclusão do material em histosec®, sendo corado com violeta cresil, pois através de projeto piloto pudemos verificar que este método foi mais eficiente na marcação dos corpos de neurônios.

Outro trabalho, dentro deste contexto é o de Anton e Rospen (2004). Esses autores analisaram a quantidade de receptores neuronais olfatórios do mosquito transmissor da malária, *Anopheles gambiae*, sendo que o número de amostras estipulado para contagem foi de 10 campos totais por indivíduo. Neste presente trabalho optamos pelo número de 25 campos por área cortical em cada indivíduo, com o objetivo de tornar a amostragem mais consistente.

Tsukahara et al. (2004) e Gagliardo et al. (2005) quantificaram respectivamente o número total de neurônios no núcleo septal de ratos e no gânglio mesentérico caudal de cães. Utilizaram como método de coloração azul de toluidina e cortes semi finos. Neste presente trabalho utilizamos violeta cresil que é uma técnica descrita para coloração específica de corpos de neurônios, especificamente da substância de Nissl. Entretanto quanto aos cortes, utilizamos cortes em parafina com 5µm, o que foi adequado para a contagem destas células, conforme pretendíamos.

Diferentes estudos morfométricos quantitativos têm sido efetuados no decorrer dos últimos anos, com o propósito de se esclarecerem diferentes padrões específicos do Sistema Nervoso Central e das células nervosas, visando obter dados sobre área, volume e número em diferentes espécies animais e no ser humano. Nesses estudos, o mais utilizado é o método de Cavalieri combinado ou não com o método de secções verticais “fractionator” (HENERY; MAYHEW, 1989; MAYHEW, 1992; MAYHEW; MWAMENGELE; DANTZER, 1990; MICHEL; CRUZ-ORIVE, 1988). Estas pesquisas foram importantes para determinar alguns resultados no campo de estudos morfométricos do sistema nervoso central, e também foram importantes para que pudéssemos nos inteirar do assunto, em seus diversos aspectos, dando-nos segurança inclusive para optarmos pelos procedimentos que julgamos adequados para o estudo que pretendíamos realizar em áreas corticais do cérebro de cães.

Ainda relativamente à escolha de técnicas mais específicas de coloração e contagem de células do sistema nervoso e adequadas à realização dos nossos

propósitos, a literatura pesquisada mostra alguns dados de interesse (AVRUSHCHENKO, 1981) analisou a quantidade de células de Purkinje em diferentes partes estruturais do córtex cerebelar de cães. Nesta pesquisa utilizamos o mesmo método de contagem “visual” de células, usadas por este autor.

Taga e Stipp (1994), por exemplo, enfocam a técnica de casualização dos campos histológicos e utilizam, para coloração de células da glândula mandibular de camundongos, o Tricromico de Masson. Arias, Pinochet e Disi, (2001), estudando o desenvolvimento do tecido nervoso em embriões de truta, valem-se da hematoxilina e eosina e do violeta cresil para as colorações. Este último corante também foi utilizado por Dombrowski et al. (2001) para estudo do cortex pré-frontal de macacos Rhesus.

Com base na experiência desses autores, quando efetuamos a seqüência histológica de coloração com violeta cresil, previamente estabelecida por algumas das pesquisas citadas, observamos que seriam necessárias algumas mudanças particularmente relacionadas ao tempo de exposição ao corante e à temperatura. Assim, nossas lâminas não foram colocadas em estufa por 30 minutos conforme o estabelecido, de modo geral, na literatura consultada, mas deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos, condições que em nosso caso se mostraram suficientes para que o tecido nervoso já se apresentasse corado de maneira adequada.

As pesquisas que mais nos ofereceram embasamento para realizar este trabalho morfométrico de contagem “visual” no sistema nervoso central foram as de Bubenik e Brown (1972), Moryama, Shimada e Goto (1995), Everall et al. (1997), Pakkenberg e Gundersen (1997), Esteves, Prada e Carvalho (2004) e Gittins e Harrison (2004). De fato, estes trabalhos oferecem dados substanciais sobre a amostragem adequada para se inferir a respeito da quantidade total de células na região cortical de interesse. Entretanto, a definição de vinte e cinco cortes totalizando 110 campos por área cortical foi estabelecida a priori por influência de assessoria profissional em estatística.

Gostaríamos de fazer um comentário sobre a escolha dos grupos raciais estudados. O ideal seria termos diversidade extrema representada, por exemplo, por Galgo e Boxer. Entretanto, existem dificuldades pragmáticas de coleta do material, pois não encontramos nas fontes acessíveis toda a gama de raças de cães. Assim, sem faltar ao rigor metodológico que procuramos implantar em nossa pesquisa, foi-nos possível a obtenção de encéfalos das raças Boxer, Rottweiler e Dobermann que

se caracterizam por tipos constitucionais diferentes, com aptidões funcionais correspondentes.

Esteves, Prada e Carvalho (2004) procederam à análise comparativa entre dados pesquisados, principalmente levando-se em conta diferentes áreas cerebrais nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo e entre os sexos, para o conhecimento da distribuição e da quantidade de corpos de neurônios nas diferentes áreas corticais do encéfalo. Os resultados encontrados foram que os machos apresentam valores expressos em média, maiores em quantidade de corpos de neurônios, no hemisfério cerebral direito (16,71). Nas fêmeas, as proporções foram inversas, apresentando maior quantidade de neurônios no hemisfério cerebral esquerdo (17,46), quando comparadas as diferentes áreas cerebrais. Os cães apresentaram maiores quantidades de corpos de neurônios na área visual (19,77), seguida da comportamental ou límbica (18,37) e não havendo entre as outras áreas cerebrais, diferença significativa.

Quanto aos resultados obtidos nesta pesquisa, encontramos diferenças bastante significativas na contagem de corpos de neurônios nas diferentes raças estudadas quando comparadas as diversas áreas corticais. Dentre estes resultados as raças Boxer e Dobermann apresentam maiores quantidades de corpos de neurônios na área auditiva no hemisfério cerebral direito em relação às outras áreas corticais desse hemisfério, nos mesmos animais. Por sua vez, a raça Rottweiler apresenta maior quantidade de neurônios nas áreas auditiva, límbica, motora, somestésica e visual do hemisfério cerebral direito em relação ao hemisfério cerebral esquerdo. Neste hemisfério cerebral esquerdo, o Dobermann apresenta maiores quantidades de corpos de neurônios na área visual em relação ao antímero direito e o cão da raça Boxer, na área olfatória.

As diferenças encontradas em relação às quantidades de corpos de neurônios das áreas auditiva, límbica, motora, somestésica e visual no hemisfério cerebral esquerdo dos cães da raça Rotweiler (respectivamente 8,313; 11,625; 9,500; 8,725; 10,338) em relação ao hemisfério cerebral direito (respectivamente 11,413; 10,238; 10,338; 10,300; 9,850) não são significativas e portanto eventualmente podem ser interpretadas como compatíveis com o modelo de assimetrias anatômicas normais dos organismos.

Já as diferenças observadas na quantidade de corpos de neurônios da área auditiva no hemisfério cerebral direito (Boxer-18,138; Dobermann-18,683) em

relação ao hemisfério cerebral esquerdo (Boxer-9,350; Dobermann-7,868) são muito grandes para se justificar como ocorrência de uma simples assimetria. Aliás, Raz et al. (2004) em estudos com 200 adultos humanos saudáveis encontraram assimetria entre as áreas corticais dos dois hemisférios cerebrais, não apresentando justificativas para a ocorrência desse fato. Admitindo-se a possibilidade das características estruturais das diferentes áreas corticais analisadas estarem intimamente relacionadas com as aptidões funcionais e conseqüentemente com os tipos constitucionais em relação a cada uma das raças estudadas, poder-se-ia inferir que a maior quantidade de corpos de neurônios da área visual de raça Dobermann e da área olfatória na raça Boxer, no hemisfério cerebral esquerdo em relação ao hemisfério cerebral direito esteja relacionada com as respectivas capacidades de perseguição de caça viva e corrida (Dobermann) e de guarda e defesa (Boxer), conforme as considerações de Prada (1978). De fato, admitindo-se ser o hemisfério esquerdo, como um todo, transdutor do lógico, do racional, é compreensível que durante a perseguição de uma caça viva, o animal esteja utilizando todo o seu aparato sensorial de visão, dentro de um estado de atenção e alerta. Nesse caso, o Dobermann é privilegiado em termos corticais. A mesma consideração pode ser aventada em relação à maior quantidade de neurônios na região olfatória do hemisfério esquerdo do Boxer. Ao desempenhar sua função de guarda e de defesa, essa sua capacidade sensorial tem bases anatômicas para se mostrar exacerbada nos estados de alerta e de atenção.

Outras razões devem existir, para explicar os dados obtidos, que fogem totalmente ao alcance desta pesquisa.

Encontramos ainda diferenças bastante significativas na contagem de corpos de neurônios nas diferentes raças, quando comparadas as áreas corticais analisadas de modo geral. Assim, as três raças estudadas apresentaram maior número de neurônios na área auditiva, em relação às outras áreas corticais dos mesmos animais, o que é compatível com a conhecida sensibilidade auditiva dos cães. Admite-se, hoje, que os hemisférios cerebrais tenham papéis diferentes, em sua relação com a mente, o que, entretanto, implica a participação funcional das áreas neocorticais terciárias, categoria a que não correspondem as áreas estudadas neste trabalho. Assim, não nos é possível inferir alguma conotação definitiva, nesse sentido, em relação às diferenças registradas entre os dois hemisférios cerebrais. Entretanto, chama-nos atenção o fato de os cães da raça Boxer terem apresentado

significativa contagem de neurônios nas áreas límbica e olfatória, pois este dado pode ser indicativo de uma expressiva sensibilidade desses animais, quanto à função sensorial olfativa, à qual se acha relacionada a área límbica, afeta ao componente emocional que integra o processo de transformação das percepções sensoriais em sensações.

Chama-nos também atenção o fato de o giro do cíngulo ter apresentado maior quantidade de corpos de neurônios no hemisfério cerebral esquerdo, na raça Rotweiller. Como trabalhamos apenas com fêmeas, surge o interesse em se verificar, em estudos posteriores, o dado correspondente em machos, uma vez que Allen et al. (2003) encontraram diferenças significativas na contagem de neurônios, nessa área, em seres humanos, quando comparados os dois sexos.

Os dados obtidos nesta pesquisa motivam nosso interesse e de outros pesquisadores à busca de novas informações sobre o tema enfocado. Assim, podemos sugerir a continuidade de estudos sobre o assunto, com o objetivo de serem comparados os sexos, uma vez que nossa amostragem restringiu-se às fêmeas. Por outro lado, esta análise que efetuamos pode ser estendida a outros grupos raciais e ainda às raças resultantes de cruzamentos inter-raciais, como é o caso do Pit Bull, do Pinscher, do Bull Terrier e dos Retrievers, na tentativa de serem explicadas e/ou justificadas, diferentes características do comportamento destes animais.

Muito embora a mente dos animais como dimensão abstrata ainda se constitua num grande mistério, temos a quase pretensão de supor que os mais variados tipos de estudos sobre a estrutura do cérebro - “órgão” de expressão da mente - possam nos introduzir em seu conhecimento e admiração.

7 CONCLUSÕES

Do que acabamos de expor, julgamos válidas as conclusões que se seguem:

Os fatores raças, áreas e hemisférios cerebrais podem ser variáveis dependentes entre si, pois foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em valores correspondentes à média de corpos de neurônios das áreas estudadas nas diferentes raças, bem como entre os hemisférios cerebrais.

- A quantidade de neurônios nas diferentes áreas cerebrais, quando considerados raça x hemisfério cerebral é significativa entre as áreas auditiva e visual do hemisfério cerebral direito e olfativa do hemisfério cerebral esquerdo, nas três raças estudadas.
- Para as áreas auditiva e visual do hemisfério cerebral direito, as raças Boxer e Dobermann apresentaram valores médios de neurônios respectivamente iguais entre si e superiores aos observados para a raça Rottweiler. Entretanto, para a área olfatória do hemisfério cerebral esquerdo, as raças Boxer e Dobermann apresentaram valores médios de neurônios respectivamente iguais entre si e inferiores aos observados para a raça Rottweiler.
- Quando comparadas as diferentes áreas cerebrais (visual, auditiva, olfatória, somestésica, motora, gustativa e límbica) dentro de cada raça, observou-se que algumas mostram significativamente ($P < 0,01$) mais neurônios que as outras áreas, ou seja: Boxer - auditiva e visual; Dobermann – auditiva e visual e Rottweiler – auditiva e olfatória.
- Valores médios de neurônios são significativamente ($P < 0,01$) superiores no hemisfério cerebral direito em relação aos observados no hemisfério cerebral esquerdo para as seguintes raças e áreas: Boxer – auditiva e visual, Dobermann – auditiva e visual e Rottweiler – auditiva.
- Para o cão da raça Rottweiler, na área olfatória, o hemisfério cerebral esquerdo apresentou valor médio de neurônios significativamente superior ao observado no hemisfério cerebral direito.

- Quando considerados raça x hemisfério cerebral, o cão da raça Boxer e o da raça Dobermann apresentaram quando comparadas as diversas áreas corticais do hemisfério cerebral direito maiores quantidades de neurônios na área auditiva, enquanto que na raça Rottweiler as áreas com maiores quantidades de neurônios nesse antímero foram: auditiva, límbica, motora, somestésica e visual. No hemisfério cerebral esquerdo, a raça Dobermann apresentou quantidades significativas de neurônios nas áreas límbica, motora e visual, em relação às demais áreas corticais desse antímero, estudadas.

Os resultados permitem concluir que a distribuição quantitativa de neurônios nas diferentes áreas corticais estudadas mostra diferenças significativas que estabelecem correlações com as aptidões funcionais e respectivos tipos constitucionais das raças enfocadas.

REFERÊNCIAS

ALLEN, J. S.; DAMASIO, H.; GRABOWSKI, T. J.; BRUSS, J.; ZHANG, W. Sexual dimorphism and asymmetries in the gray-white composition of human cerebrum. **Neuroimage**, v. 18, p. 880-894, 2003.

ANTON, S.; ROSPARS, J. P. Quantitative analysis of olfactory receptor neuron projections in the antennal lobe of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 475, p. 315-326, 2004.

ARIAS, P.; PINOCHET, L. F.; DISI, A. Study of the nervous tissue development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos treated with oxytetracycline. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 31, p. 144-147, 2001.

AVRUSHCHENKO, M. S. Morphometric study of purkinje cells in the dog cerebellar cortex. **Byulleten Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny**, v. 92, n. 9, p. 363-366, 1981.

BINZEGGER, T.; DOUGLAS, R. J.; MARTIN, K. A. C. A quantitative map of the circuit of cat primary visual cortex. **The journal of neuroscience**, v. 24, n. 39, p. 8411-8453, 2004.

BUBENIK, G. A.; BROWN, G. M. Morphologic sex differences in primate brain areas involved in regulation of reproductive activity. **Specialia**, v. 29, n. 5, p. 619-621, 1973.

COREN, S. **A inteligência dos cães**. 1. ed. Rio de Janeiro: Ediouro, 1996. 248 p.

DOMBROWSKI, S. M.; HILGETAG, C. C.; BARBAS, H. Quantitative architecture distinguishes prefrontal cortical systems in the rhesus monkey. **Journal Cerebral Cortex**, v. 11, p. 975-988, 2001.

ESTEVES, A.; PRADA, I. L. S.; CARVALHO, A. F. Comparação do número de corpos neuronais de áreas do córtex cerebral de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 4, n. 5, p. 332-338, 2004.

EVERALL, I. P.; DETERESA, R.; TERRY, R.; MASLIAH, E. Comparasion of two methods for the evaluation of neuronal number in the frontal cortex in alzheimer

disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 56, n. 11, p. 1202-1206, 1997.

FINGER, S. **Minds behind the brain: a history of the pioneers and their discoveries.** New York: Oxford University Press, Inc., 2000. 347 p.

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 inferior mesenteric ganglion of dogs. Total number of neurons can be predicted from body weight and ganglion volume. **Anatomical Record**, v. 286A, p. 917-929, 2005.

GEARY, M. **Tudo sobre cães.** São Paulo: Círculo do livro, 1978.

GITTINS, R.; HARRISON, P. J. A quantitative morphometric study of the human anterior cingulate cortex. **Brain Research**, v. 1013, p. 212-222, 2004.

HENERY, C. C.; MAYHEW, T. M. The cerebrum and cerebellum of the fixed human brain: efficient and unbiased estimates of volumes and cortical surface areas. **Journal Anatomy**, v. 167, p. 167-180, 1989.

MAYHEW, T. M. A review of recente advances in stereology for quantifying neural structure. **Journal of Neurocytology**, v. 21, p. 313-328, 1992.

MAYHEW, T. M.; MWAMENGELE, G. L. M.; DANTZER, V. Comparative morphometry of the mammalian brain: estimates of cerebral volumes and cortical surface areas obtained from microscopic slices. **Journal Anatomy**, v. 172, p. 191-200, 1990.

MERINDANO, M. D.; CANALS, M.; POTAU, J. M.; COSTA, J.; RUANO, D. Morphometric features of the corneal epithelium in mammals. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 27, p. 105-110, 1998.

MICHEL, R. P.; CRUZ – ORIVE, L. M. Application of the cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area. **Journal of Microscopy**, v. 150, p. 117-136, 1988

MICHON, J. J.; LI, Z.; SHIOURA, N.; ANDERSON, R. J.; TSO, M. O. M. A comparative study of methods of photoreceptor morphometry. **Investigative Ophthalmology e Visual Science**, v. 32, n. 2, p. 280-284, 1991.

MORYAMA, H.; SHIMADA, K.; GOTO, N. Morphometric analysis of neurons in ganglia: geniculate, submandibular, cervical spinal and superior cervical. **Okajimas Folia Anatomic Japanese**, v. 72, n. 4, p. 185-190, 1995.

PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H. J. G. Neocortical neuron number in humans: effects of sex and age. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 384, p. 312-320, 1997.

PRADA, I. L. S. **A alma dos animais**. Campos do Jordão: Mantiqueira, 1997. 63 p.

PRADA, I. L. S. **Tipos constitucionais**. São Paulo: [s.n.], 1978. [15] f. (Apostila).

RABINOWICZ, T.; DEAN, D. E.; PETETOT, J. M. C.; MYERS, G. M. C. Gender differences in the human cerebral cortex: more neurons in males; more processes in female. **Journal of Child Neurology**, v. 14, n. 2, p. 98-107, 1999.

RABINOWICZ, T.; PETETOT, J. M. C.; GARTSIDE, P. S.; SHEYN, D.; SHEYN, T.; COURTEN-MEYRS, G. M. Structure of the cerebral cortex in men and women. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 61, n. 1, p. 46-67, 2002.

RAZ, N.; GUNNING-DIXON, F.; HEAD, D.; RODRIGUE, K. M.; WILLIAMSON, A.; ACKER, J. D. Aging, sexual dimorphism, and hemispheric asymmetry of the cerebral cortex: replicability of regional differences in volume. **Neurobiology of aging**, v. 25, p. 377-396, 2004.

RUELA, C.; MATOS-LIMA, L.; SOBRINHO-SIMÕES, M. A.; PAULA-BARBOSA, M. M. Comparative morphometric study of cerebellar neurons. **Acta Anatomic**, v. 106, n. 2, p. 270-275, 1980.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide**: basic and statistic. Cary: SAS, 1995. 1686 p.

STOPIGLIA, A. J.; LAINETTI, R. D.; PIRES, R. S. S.; SILVA, C. F. Avaliação morfométrica de fibras nervosas do nervo ulnar após reparação cirúrgica com auto-enxerto e prótese tubular em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 2, p. 1-10, 1998.

TAGA, R.; STIPP, A. C. M. **Manual prático de morfometria ao microscópio óptico, planejamento e desenvolvimento de um experimento**. 1994. 35 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 1994.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS, A. G. N. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. Manole: São Paulo, 2003. 331 p.

TOWER, D. B. Structural and functional organization of the mammalian cerebral cortex: the correlation of neuron density with brain size. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 101, p. 19-52, 1954.

TSUKAHARA, S.; INAMI, K.; MAEKAWA, F.; KAKEYAMA, M.; YOKOYAMA, T.; YUJI, M.; KITAGAWA, M.; KANNAN, Y.; YAMANOUCHI, K. Postnatal apoptosis, development, and sex difference in the lateral septum of rats. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 475, p. 177-187, 2004.

WEST, M. J.; SLOMIANKA, L.; GUNDERSEN, H. J. G. 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.

VON ECONOMO C.; KOSKINAS G. N. **Die cytoarchitectonik der hirnrinde des erwachsenen menschen**. Vienna: Verlag Julius Springer, 1925.