CELINA ALMEIDA FURLANETTO MANÇANARES

Morfologia da glândula pineal de gambás (*Didelphis sp*)

CELINA ALMEIDA FURLANETTO MANÇANARES

Morfologia da glândula pineal de gambás (*Didelphis sp*)

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:

Anatomia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Irvênia Luiza de Santis Prada

São Paulo
2004

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
10	1	2	77 f.	76 f.
11	1	2	77 f.	76 f.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Morfologia da glândula pineal de gambás (*Didelphis sp*)", Protocolo nº493/2004, utilizando 10 gambás (material utilizado para pesquisa - cadáveres de gambás), 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 "Morphology of the pineal gland in opossum (*Didelphis sp*)", protocol number 493/2004, utilizing 10 opossum, 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, 19 de julho de 2004

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: MANÇANARES, Celina Almeida Furlanetto

Título: Morfologia da glândula pineal de gambás (*Didelphis sp*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data:___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

DEUS, pela força e coragem para enfrentar tantos momentos difíceis. Obrigado PAI porque naquele momento de desânimo me lembrei que TU és meu PAI.

Aos meus pais: João Batista Furlanetto e Sebastiana Almeida Furlanetto pelo amor, carinho, compreensão e apoio em todos os momentos de minha vida. Vocês são maravilhosos. Amo vocês.

Ao Ivan pelo amor, incentivo, exemplo e compreensão. Sem você nada disso seria possível.

Aos meus filhos: Leonardo, Rafael e Vinícius peço-lhes perdão pelos minutos, horas e dias de ausência, e agradeço pelo sorriso e brilho nos olhos na minha chegada. Vocês são a luz da minha vida.

Ao meu sogro e minha sogra pela amizade, carinho, paciência e compreensão.

Aos meus irmãos: Marina e Fernando, amor, carinho e cuidados com meus filhos na minha ausência.

Ao Beto pelo seu exemplo de força, determinação e sabedoria. Se cheguei até aqui foi porque um dia você acreditou em mim. Obrigado.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora e amiga Dra. Irvênia Luiza de Santis Prada . “Em cada ensinamento de mestre há algo de sua própria vida e é precisamente esta força oculta de vida a que infiltra no discípulo e vai gerando nova vida”.

À minha co-orientadora, amiga, companheira e querida Dra. Ana Flávia de Carvalho, que com carinho e muita perfeição, ensinou-me a como pesquisar, trabalhar e confeccionar a minha tese. Obrigada pela oportunidade, confiança e ensinamentos transmitidos. Sem você não faria tudo que faço hoje. Adoro você.

À Coordenadora e amiga Dra. Maria Angélica Miglino, por me oferecer à oportunidade de ingressar no mestrado e por tudo que tem feito por mim. Não há palavras para expressar a minha gratidão. Você mora no fundo do meu coração.

AGRADECIMENTOS

Ao João Octávio, João Flávio, Priscila pela oportunidade, colaboração, credibilidade e apoio durante todas as etapas deste trabalho.

Aos professores: Paula, Bombonato e Francisco pelos seus ensinamentos e pela significativa contribuição na nossa vida pessoal e profissional.

Ao professor José Roberto pela colaboração e por aceitar ser meu orientador pro-tempore.

Ao Caju pelas correções do inglês, e por estar sempre disposto a me ajudar.

A Lucimara minha querida amiga e companheira que me ouviu e me deu força em todos momentos.

Aos meus amigos André e Juliana Casals pela disposição e boa vontade em ajudar sempre que precisei.

À Rose pela sua disposição em sempre nos ajudar em tudo que precisamos.

A Alexandra pela amizade, companheirismo e ajuda na coleta de materiais.

Aos meus amigos do laboratório da UNIFEOD Marquinho, Sorriso, D. Aninha por toda amizade e carinho, durante o nosso convívio.

Ao Ricardo pela amizade, auxílio na coleta de materiais e boa vontade de sempre.

Aos funcionários do laboratório de Anatomia, da FMVZ-USP, Ronaldo, Índio, Diogo e Wanderley pela amizade, disposição e apoio.

Aos funcionários da biblioteca, da FMVZ-USP, pelas correções das normas da dissertação.

Ao Maicon, Jaqueline, e Patrícia, pela ajuda e atenção sempre dispensada.

Aos meus amigos: Catharine, Flavinha, Daniele, Mariana Matera, Tatiane, Marina, Paula, Ana Rita, Guilherme, Jeferson, Gerlane, Ubatuba, Michele, Vivian, Fernanda, Guilherme, Eduardo, Mila, Rosa Helena, André, Mendenson, Paula Azarias, Procassia e Maran pela atenção, paciência, disposição e auxílio em todos os momentos que precisei.

Ao Dito e Osmar pela ajuda, paciência e atenção.

A todos os colegas da Pós-graduação, pelos momentos que passamos juntos.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e da Faculdade de Medicina Veterinária Fundação de Ensino “Octávio Bastos”, que direta ou indiretamente me ajudaram.

À CAPES pelo financiamento deste trabalho.

“Em todos momentos difíceis de nossas vidas, não importando em que sentido seja, descobramos como é bom chegar. E para chegar, onde quer que seja, aprendemos que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso antes de mais nada, querer”.

RESUMO

MANÇANARES, C. A. F. **Morfologia da glândula pineal de gambás (*Didelphis sp*)**. [Morfology of the pineal gland in opossum (*Didelphis sp*)]. 2004. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

A glândula pineal deve ser analisada e estudada em animais da fauna brasileira, para que dados da pesquisa básica possam ser aplicados em novas técnicas de manejo reprodutivo destes animais, inclusive em cativeiro, face à íntima relação deste órgão fotorreceptor com o ciclo reprodutivo. Para este estudo, foram utilizados 10 gambás (*Didelphis sp*), provenientes do Departamento de Anatomia da USP e UNIFEOB, já mortos e fixados. Nenhum animal foi submetido a situações de dor/sofrimento e ao sacrifício de sua vida. A glândula pineal foi encontrada em todos animais estudados e apresentou-se de diminutas dimensões, não sendo possível, portanto descrever-lhe características macroscópicas. Através da análise microscópica pudemos localizar a glândula no espaço correspondente ao plano mediano, em relação ao encéfalo, rostral e dorsalmente aos colículos rostrais, ventralmente aos hemisférios cerebrais e caudalmente à comissura habenular. Consiste de uma evaginação do teto do diencéfalo e mostra-se em forma de "U" invertido. Comparativamente a características de glândulas pineais de outras espécies animais, a do *Didelphis genus*, que estudamos, revela peculiaridades tanto em relação ao seu tamanho, apenas perceptível microscopicamente, quanto ao fato de apresentar suas células secretoras dispersas também em áreas vizinhas. Tais peculiaridades motivam reflexões sobre o papel funcional da glândula, na espécie considerada.

Palavras-chave: Gambá. Glândula pineal. Morfologia animal.

ABSTRACT

MANÇANARES, C. A. F. **Morphology of the pineal gland in opossum (*Didelphis sp*)**. [Morfologia da glândula pineal de gambás (*Didelphis sp*)]. 2004. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

The pineal gland must to be analyzed and studied in animals of the Brazilian fauna, to apply the data obtained in the basic research of new techniques at reproductive handling of these animals, including in captivity, in view of the close relation between this photoreceptor organ with the circadian and reproductive cycle. For this study, 10 opossums (*Didelphis sp*), had been used, already died and fixed, proceeding from the Department of Anatomy of USP and UNIFEOB. None animals were submitted to pain/suffering situations and their no life sacrifice. The pineal gland was found in all studied animals with and smaller dimention, not possessing, therefore goss features. By microscopy analysis we could found the gland in the correspondent space to median plan in relation to the encephalon, rostral and dorsally to the rostral coliculli, ventrally to the brain hemispheres and caudally to the habenular comissure. That consistes like an evagination of the diencephalons tectum showing the “U” shape. Considering other pineal glands and its features in different species, we note the gland is extremely small for it specie, possessing dispersed secretory cells in the nervous parenchyma whose form, sufficiently irregular, suggests a small hormonal performance to them in the *Didelphis* genus. Comparatively of the pineal gland feactures in different animals, the *Didelphis* genus, that was our aim, shows pecualirity as in size relation, only microscopically visible, than the fact to prossessing dispased secretory cells, with irregular surrounding shape. All pecualiarites suggest refletion about the function action of the gland at the studied specie.

Key words: Opossum. Pineal gland. Animal morphology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotografia da vista dorsal de encéfalo de <i>Didelphis sp.</i> CB, Cerebelo; C, cérebro; BO, bulbo olfatório; seta amarela, região de localização da glândula pineal; seta vermelha, vasos sanguíneos. Técnica de injeção de látex e fixação.....46
Figura 2 -	Fotografia de encéfalo de <i>Didelphis sp.</i> , sendo removidos os hemisférios cerebrais para a visualização da região de localização da glândula pineal (seta), cranialmente aos colículos rostrais (Cr).47
Figura 3 -	Fotografia de encéfalo de <i>Didelphis sp.</i> , em corte mediano, indicando-se a exata localização (seta) sendo removidos os hemisférios cerebrais para a visualização da região de localização da glândula pineal (seta), cranialmente aos colículos rostrais (Cr).47
Figura 4 -	Fotografia de encéfalo de <i>Didelphis sp.</i> em vista dorsal, com afastamento lateral dos hemisférios cerebrais. Cerebelo, CR; Comissura habenular (seta); rede vascular (●); colículos rostrais (Cro). Técnica de injeção de látex e fixação – em azul, veias, em vermelho, artérias.....48
Figura 5a -	Esquema representativo de corte histológico da glândula pineal de <i>Didelphis sp.</i> em formato de “U” invertido. CH – comissura habenular; CP-corpo pineal; RP- recesso pineal; OS – órgão subcomissural; RI – recesso intercomissural; CR- colículo rostral; 110X52
Figura 5b -	Fotomicrografia da glândula pineal de <i>Didelphis sp.</i> , em formato de “U” invertido. CH – comissura habenular; CP-corpo pineal; RP- recesso pineal; OS – órgão subcomissural; RI – recesso intercomissural; CR- colículo rostral. Fotomicrografia – Tricromo de Masson 110X.....53
Figura 6a e 6b -	Fotomicrografias – Em 6a e 6b detalhe do epitélio de revestimento do recesso pineal. Notar o epitélio cilíndrico baixo ciliado (seta). Azul de Toluidina 440X.....54
Figura 7 -	Fotomicrografia evidenciando o órgão subcomissural (OS); (colículos rostrais) (CR); RP- recesso pineal; TV – terceiro ventrículo. HE, historesina - 110x.....55
Figura 8 -	Fotomicrografia da glândula pineal de <i>Didelphis sp.</i> Notar o diferente aspecto da glândula pineal no corte quando se afasta da linha mediana (em faixa alongada). CP – corpo pineal; OS – órgão subcomissural; RP – recesso pineal. Azul de Toluidina 110X.....56
Figura 9 -	Eletromicrografia de varredura. Observar a comparação das estruturas glandulares da figura 8 com a figura 9. CP – corpo pineal; OS – órgão subcomissural; RP – recesso pineal; TV – terceiro ventrículo. Barra = 200 µm.....56

Figura 10 e 11 -	A fotomicrografia 10 mostra a área do colículo rostral onde são encontradas células semelhantes a pinealócitos (círculo), e logo abaixo da linha divisória, a área de tecido nervoso evidente. Notar em 10 as células (pinealócitos) muito semelhantes àquelas observadas na figura 11 (círculo). Azul de Toluidina 440X.....57
Figuras 12 -	Fotomicrografia da glândula pineal de <i>Didelphis</i> sp, mostrando uma área de concreção com destruição tecidual CC; pinealócitos (seta). Azul de Toluidina, 440X.....58
Figura 13 -	Fotomicrografia da glândula pineal de <i>Didelphis</i> sp. Observar as fibras nervosas entremeadas no corpo pineal (seta), e vasos (V). Fotomicrografia, Azul de Toluidina, historesina, 110X.....58
Figura 14 -	Fotomicrografia da região do órgão subcomissural de <i>Didelphis</i> sp, evidenciando-se filete nervoso com fibras mielínicas (seta). Azul de Toluidina, historesina - 1100X.....59
Figura 15 -	Fotomicrografia da glândula pineal de <i>Didelphis</i> sp. Notar os pinealócitos no corpo pineal (setas) e a grande quantidade de vasos no parênquima glandular (V). HE, historesina, 440X.....59
Figura 16 -	Fotomicrografia da glândula pineal de <i>Didelphis</i> sp. Observar os vasos (V) e a presença de mastócitos de disposição perivascular (setas). Azul de Toluidina, historesina – 1100X.....60
Figura 17 e 18 -	Na imagem 17 e 18 observamos a taenia talâmica. Notar na figura 18, detalhe das células globosas (seta) e a rica vascularização (V). Azul de Toluidina, historesina, 110X e 1100X.....61
Figuras 19 -	Fotomicrografia da glândula pineal de <i>Didelphis</i> sp. Nota-se ausência de uma cápsula conjuntiva evidente na glândula pineal. Notamos apenas pouca quantidade de fibras colágenas no parênquima glandular (setas). Picrossírius, historesina, 110X.....62
Figura 20 e 21 -	Eletromicrografias da glândula pineal de <i>Didelphis</i> sp. Notar na figura 21 o aspecto da glândula pineal, vista ventral. CP – corpo pineal; OS – órgão subcomissural; RP – recesso pineal; TV – terceiro ventrículo.....63
Figuras 22 e 23 -	Eletromicrografias de glândula pineal de <i>Didelphis</i> sp, em vista dorsal, evidenciando-se a rede vascular (RD). Seta – corpo pineal.....64
Figuras 24 -	Eletromicrografias de glândula pineal de <i>Didelphis</i> sp, em corte mediano. CP – corpo pineal; TV – terceiro ventrículo; OS – órgão subcomissural; RP – recesso pineal.....64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivo	22
1.2 Justificativa	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 ASPECTOS MACROSCÓPICOS	24
2.2 ASPECTOS MICROSCÓPICOS	32
3 MATERIAL E MÉTODO	40
3.1 MATERIAL	40
3.2 LABORATÓRIOS	41
3.3 COLHEITA E ANÁLISE MACROSCÓPICA	41
3.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OBSERVAÇÃO AO MICROSCÓPIO DE LUZ	42
3.4.1 Processamento em Histosec® (Merck)	42
3.4.2 Processamento em Historesina (Hydroxyethyl Methacrylate-Historesin, Lkb 2218-500, Sweden)	43
3.5 Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura	43
4 RESULTADOS	46
4.1 RESULTADOS MACROSCÓPICOS	46
4.2 RESULTADOS MICROSCÓPICOS	50
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

O *Didelphis marsupialis* pertence ao filo Chordata, ordem Marsupialia e família Didelphidae. No Brasil seu nome popular varia de acordo com a região onde se encontra: na Amazônia, mucura; na Bahia, suruê ou sarigue; no Nordeste, timbuo; no Mato Grosso, micurê e, no restante do Brasil, gambá.

Metatheria (Marsupialia) é um grupo de animais composto por 07 ordens, 19 famílias e 81 gêneros, com inúmeras espécies. Encontra-se assim organizado com base em semelhanças nas suas características anatômicas e fisiológicas, particularmente no que diz respeito à reprodução. O termo "Marsupialia" deriva da palavra marsúpio, nome dado à "bolsa", geralmente encontrada nas fêmeas, onde são "guardados" os filhotes durante os primeiros dias ou meses de vida.

A estrutura anatômica do marsúpio, no entanto, pode variar significativamente, indo desde a formação de uma verdadeira "bolsa" até a ausência completa de qualquer estrutura semelhante, externamente. Uma característica unificadora do grupo é a ausência de placenta verdadeira, como acontece nos outros mamíferos (exceto Monotremata), chamados coletivamente de "mamíferos placentários". Atualmente são encontrados apenas no Novo Mundo e são considerados os mais antigos marsupiais. O gambá (de guaambá, que significa saco vazio, referindo-se ao marsúpio) é um marsupial de pequeno porte, com corpo maciço, pescoço grosso, focinho alongado e pontudo, membros curtos, orelhas desenvolvidas e cauda longa, grossa e afilada.

São arborícolas ou terrestres, geralmente com hábitos noturnos e, apesar de seus movimentos lentos, sobem em árvores com facilidade, usando a cauda preênsil para agarrar-se aos galhos. Alimentam-se principalmente de frutos silvestres, ovos e filhotes de pássaros. A fêmea possui um marsúpio bem desenvolvido, ao contrário de outros da mesma família, que só tem duas dobras ventrais abertas.

O período gestacional é em média 12, podendo variar de 5 a 13 dias, nascendo em média, 10 a 15 filhotes por ninhada. A estimativa de vida desses animais é de 2 a 4 anos.

Os marsupiais apresentam características reprodutivas que favorecem sua utilização como modelos experimentais ideais no estudo de desenvolvimento fetal (RENFREE; PASK; SHAW, 2001).

A glândula pineal origina-se como uma evaginação neuroepitelial que se projeta do teto do diencéfalo. A glândula pineal sofreu grandes modificações à medida que os vertebrados evoluíram de anfíbios para mamíferos. É um órgão endócrino que apesar de sua derivação do teto do diencéfalo, não tem conexão direta com o sistema nervoso central (HAFEZ, 1988).

A pineal está envolvida no controle dos biorritmos circadianos (que duram 24 horas) e sazonais (relacionados à estação do ano). A pineal responde a estímulos luminosos recebidos pela retina, os quais são transmitidos ao córtex cerebral e retransmitido a pineal por nervos do sistema simpático. Sua resposta consiste em secretar melatonina e vários peptídeos, cuja quantidade na circulação aumenta muito durante o período de escuridão de um ciclo diário de 24 horas. Estas

moléculas, por sua vez promovem mudanças rítmicas nas atividades secretoras das gônadas e de vários outros órgãos. A glândula pineal é então um transdutor neuroendócrino, convertendo impulsos nervosos em modificações de níveis de produção de hormônios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A glândula pineal contém melatonina que é sintetizada a partir da serotonina, que é abundante e a histamina. É um órgão excretor que possui um papel na fotorrecepção e no equilíbrio hídrico e salino, compartilhado até certo ponto pelo órgão subcomissural. Pelo menos nos mamíferos, a pineal tem ação inibidora sobre as gônadas e, possivelmente, na espécie humana participa da regulação dos ritmos circadianos. A glândula pineal é muito ativa e secreta a melatonina, cujos mais altos níveis de produção ocorrem no escuro e durante o sono (DIDIO, 2002).

A melatonina tem como principal função sincronizar os ritmos endógenos com o ciclo claro/escuro ambiental (LOTUFO, 2003).

A pineal tem importância reguladora, modificando a atividade da adeno-hipófise, da neurohipófise, do pâncreas endócrino, do córtex supra-renal e das gônadas, assim a pineal é um “regulador dos reguladores”, que não atua diretamente sobre órgãos alvos periféricos (DIDIO, 2002).

Metabolicamente os pinealócitos são muito ativos, secretando a melatonina e a serotonina na corrente sangüínea, entretanto, eles não secretam ambas substâncias ao mesmo tempo (HAM; CORMACK, 1983).

A glândula pineal de vertebrados sintetiza o hormônio melatonina com um ritmo circadiano, sinalizando para o meio interno o dia e a noite externos. No período

noturno a noradrenalina liberada dos terminais simpáticos que inervam a glândula, interage com os receptores α e β -adrenérgicos, desencadeando uma série de eventos bioquímicos e promovendo a síntese de melatonina (CIPOLLA NETTO et al., 2003).

Segundo Voisin et al. (1994) a enzima hidroxiindol-O-metiltransferase (HIOMT) é catalisada no passo final da biossíntese da melatonina e parece ser especificamente expressada na glândula pineal e na retina. Estudos baseados em medidas da atividade de HIOMT e estudos mais recentes que envolvem a hibridização do cDNA para o mRNA da HIOMT revelam que a regulação a longo prazo da HIOMT pela luz confiaria no ritmo noite/dia da transcrição do gene de HIOMT, acoplado a um “turnover” lento da proteína. As mudanças rápidas nos níveis do mRNA da HIOMT e expressão precoce durante o desenvolvimento embrionário sugerem que estudos adicionais neste gene podem contribuir no esclarecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação da função melatoninérgica e em sua regulação pela luz, ambas na glândula pineal e na retina.

A produção rítmica de melatonina pela pineal de mamíferos ocorre em resposta à estimulação noradrenérgica que produz uma cascata de eventos bioquímicos dentro do pinealócito. No rato, as mudanças maciças na atividade da arilalkilamina N-acetiltransferase (NAT) resultam de um aumento nos níveis intracelulares do acampamento produzidos por uma interação sinérgica onde uma ativação alfa 1 amplifica a estimulação beta-adrenérgica. Os eventos intracelulares que mediam este efeito são descritos. Um aspecto principal do controle temporal da produção da melatonina é a baixa regulação programada das respostas à estimulação

noradrenérgica. A ativação noradrenérgica da glândula influencia também outras funções enzimáticas, incluindo a hidroxilase do triptofano e as atividades da HIOMT, e produz um aumento dramático em níveis intracelulares do AMPc (SUGDEN, 1989).

Lotufo (2003) afirmou, em seu trabalho que a inflamação crônica granulomatosa apresenta ritmo circadiano dependente da produção endógena de melatonina pela glândula pineal. A inflamação aguda também apresenta ritmo circadiano: no entanto, o papel da melatonina na manutenção deste ritmo não foi estudado, o objetivo deste estudo feito pelo autor foi verificar o efeito da melatonina sobre os eventos vasculares que caracterizam a inflamação aguda: vasodilatação arteriolar, migração de neutrófilos e aumento de permeabilidade vascular. Foi verificado que a melatonina e seu precursor N-acetilserotonina podem modular a resposta inflamatória aguda. A melatonina não altera a ativação de neutrófilos, mas inibe a ativação de células endoteliais por leucotrieno, sugerindo que as células endoteliais são o alvo de ação da melatonina na inflamação.

O principal suprimento sanguíneo é a artéria cerebral profunda, um ramo do ramo comunicante cranial da carótida interna. A artéria cerebral profunda de cada lado termina em três ramos para formar a rede pineal. A principal drenagem venosa é o seio longitudinal ventral que está intimamente associado com o pedúnculo e o corpo do órgão (VENZKE, 1986).

Os capilares são delgados do tipo fenestrado (DIDIO, 2002; LESSON; LESSON, 1976), e as células endoteliais repousam sobre a lâmina basal fina que às vezes é incompleta.

As veias pineais são numerosas e afluem as veias cerebrais internas e a veia magna do cérebro (DIDIO, 2002).

As fibras nervosas são provenientes da porção simpática do sistema nervoso autônomo. Os estudos de microscopia eletrônica mostraram que as terminações nervosas terminam diretamente sobre as células da pineal, e não nos vasos sanguíneos ou em células musculares lisas como dos outros órgãos (LESSON; LESSON, 1976).

A inervação simpática é essencial para as funções endócrinas da glândula pineal, sendo a noropinefrina o neurotransmissor (DIDIO, 2002).

Fibras não mielinizadas aparecem no estroma do órgão. Estas fibras são provavelmente simpáticas quanto a sua origem e caminham pelo órgão através da artéria cerebral profunda (VENZKE, 1986).

Os axônios perdem seus envoltórios de mielina quando penetram na pineal e terminam entre os pinealócitos, estabelecendo sinapses com alguns deles. As terminações axonais contêm um grande número de pequenas vesículas que contêm norepinefrina. Serotonina também está presente nos pinealócitos e nos terminais nervosos simpáticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As extremidades das fibras nervosas simpáticas pós-ganglionares estão associadas aos pinealócitos e, assim, influenciam sua atividade secretora; e às células musculares lisas dos vasos sanguíneos, regulando o fluxo de sangue através da glândula (ROSS; REITH; ROMRELL, 1993).

1.1 OBJETIVO

Este projeto teve por objetivo a caracterização morfológica da glândula pineal de *Didelphis sp.* através de análise macroscópica, microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura.

1.2 JUSTIFICATIVA

A glândula pineal, apesar dos estudos intensivos, a seu respeito, nas últimas décadas, continua desconhecida em muitos de seus aspectos, particularmente em alguns grupos de animais, como é no caso dos marsupiais.

No *Didelphis sp.*, no qual se quer se identifica a glândula macroscopicamente, pelo seu diminuto tamanho, surge naturalmente o interesse em analisá-la com os recursos da microscopia de luz e da microscopia eletrônica de varredura.

Os dados que puderam ser obtidos certamente se somarão a outros, correspondentes às mais variadas espécies animais, compondo material de suporte para análises comparativas, elucidação de questões e elaboração de novos conceitos.

A glândula pineal deve ser analisada e estudada em animais da fauna brasileira, para que possamos, através de dados obtidos nestas pesquisas básicas,

aplicar novas técnicas de manejo reprodutivo destes animais inclusive em cativeiro, tendo em vista a íntima relação deste órgão fotorreceptor com ciclos circadianos e ciclo reprodutivo.

Através de análises de projetos e propostas anteriores, procuramos esta espécie em especial devido à disponibilidade dos animais e adequação para esta análise, dispensando, portanto o sacrifício de vidas.

Foram respeitados os parâmetros Internacionais de bioética e bem estar animal, conforme preconiza a Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Estes dados bibliográficos incluem publicações sobre pineais de alguns mamíferos e trabalhos que descrevem achados que nos serviram para estabelecer uma análise comparativa.

A revisão de literatura foi dividida em dois tópicos:

2.1 Aspectos macroscópicos

A glândula pineal dos animais, por muito tempo foi uma estrutura "esquecida" ou considerada de pouca importância para muitos estudiosos ligados à anatomia. Após a descoberta da melatonina, hormônio por ela secretado, novas pesquisas e perspectivas surgiram (GOMES, 2003).

A epífise ou glândula pineal, assim denominada em virtude da semelhança imaginária da estrutura humana com uma pinha, é uma pequena excrescência, escuramente pigmentada, da face dorsal do cérebro, na extremidade caudal do teto do terceiro ventrículo e diretamente anterior aos colículos rostrais. Em certas espécies, está relacionada com um grande recesso epifisário da pia-epêndima, que cobre o ventrículo (DYCE, 1998).

Segundo Schaffer et al. (1909), a glândula pineal está presente em todos os vertebrados, exceto nos anfioxos.

Para Vollrath (1981), um órgão pineal propriamente dito está ausente em crocodilianos, edentatas e sirênios, porém células pineais principais sempre são

identificadas entremeadas por células gliais, tecido conjuntivo e vasos como um complexo pineal disperso.

A importância da glândula pineal sobre o comportamento sexual e a maturidade das gônadas tem sido extensivamente estudada, gerando conhecimentos embasados mais em observações funcionais, do, que em, suas bases morfológicas (SILVINO et al., 2000).

As pesquisas na área biológica utilizando animais como ratos e coelhos são bastante freqüentes, sendo a literatura encontrada muito extensa, porém os aspectos relacionados à morfologia da glândula pineal nestes animais são escassos (SILVINO et al., 2000).

A glândula pineal, antigamente designada *conarium*, *epífise cerebral*, ou *corpo pineal* é parte do epitálamo, que, por sua vez, integra o talamencéfalo. É um órgão mediano, impar, que se localiza, no homem, numa depressão entre os colículos superiores, abaixo do esplênio do corpo caloso, do qual esta separado pela tela coróidea do III ventrículo e pelas veias cerebrais (DIDIO, 2002).

Segundo Vollrath (1981), os corpos pineais dos mamíferos originam-se a partir da região postero-dorsal do teto do diencéfalo. Porém, isto não impede de nos roedores existirem pineais com forma e posição diferentes.

A glândula pineal é uma glândula endócrina cujas secreções são influenciadas pelos períodos de luz/escuridão do dia. Ela é uma projeção mediana em forma de cone, que parte do diencéfalo, com um recesso do terceiro ventrículo (GARTNER; HIATT, 1999).

Em roedores, a epífise apresenta uma grande variação na sua forma, posição e localização. Basicamente é uma estrutura longa, como um bastão e em algumas espécies consiste de duas ou mais partes separadas, dando a impressão de que certas áreas do complexo pineal são predispostas à regressão (VOLLRATH, 1981).

Innes e Zeman, (1963) consideram, na anatomia comparada, o corpo pineal como homólogo ao rudimentar olho parietal dos vertebrados inferiores.

Branco et al. (1997) citam que, em estudos realizados em 19 capivaras (*Hydrochoerus hydrochoeris*) órgão pineal foi encontrado em todos os espécimes analisados, e apresentou-se bastante desenvolvida, de formato alongado, coloração branca perolada ou ligeiramente acastanhada. Situa-se no teto do terceiro ventrículo, assentando-se entre o cérebro e o cerebelo. A glândula apresentou-se constituída de três partes distintas: um ápice mais dilatado, o qual insinua-se entre os hemisférios cerebrais; um corpo cilíndrico, mais delgado, que serve de conexão entre o ápice e a base do órgão. Esta, por sua vez, pouco espessa, serve para inserir a glândula no teto do III ventrículo encefálico através de dois pedúnculos. O ápice da glândula, de formato ovóide devido à sua dilatação, mostrou macroscopicamente, quando seccionado, a presença de uma cavidade lembrando um lúmen relativamente grande.

Holanda-Barros (2002), estudando a pineal em 30 serpentes, sendo 15 jararacas (*Bothrops jararaca*) e 15 cascavéis (*Crotalus durissus*), descreve que o órgão apresentou-se como uma pequena estrutura dorsal, mediana, ovóide, de coloração cinzenta ou castanho escura na região parietal do diencéfalo, ocupando

um sulco localizado rostralmente aos lobos ópticos e caudalmente aos hemisférios cerebrais.

Foram colhidos dados sobre aspectos biológicos da cutia dourada (*Dasyprocta aguti*) e foi estudada macro e microscopicamente a glândula pineal de 30 exemplares adultos, de ambos os sexos. A glândula pineal apresentou-se alongada, em geral de cor acinzentada ou castanho escuro. Revestida por uma cápsula de tecido conjuntivo, e contendo, pelo menos em parte de seu contorno, vasos sanguíneos, o parênquima pineal mostrou pinealócitos contendo pigmentos (melanina), células intersticiais e algumas células gliais. Diferentemente de outros roedores conhecidos, a glândula pineal da cutia é desprovida de lúmen ou de cavidade na haste (SILVINO et al., 1995).

Estudos macroscópicos da glândula pineal de búfalos, mostraram que ela é grande, de formato globoso, dividida em dois lobos (direito e esquerdo) e situada entre os colículos rostrais, de coloração bege clara e às vezes, pigmentação escura externamente (CARVALHO, 1997).

Gomes (2003) estudou aspectos morfológicos da glândula pineal em 20 cães, mediante análise macroscópica, mesoscópica e microscópica (microscopia de luz). A glândula pineal revelou um formato variando de cônico a glossóide (em relação à língua humana); cor entre bege e marrom-acinzentado; consistência gelatinosa. Sua largura e comprimento também foram avaliados e não guardam correlação com o tamanho (comprimento e largura) do encéfalo correspondente.

Segundo Jordan (1911), a glândula pineal de marsupiais pode ser vista como uma leve evaginação bulbar, levemente abaixo e imediatamente atrás da comissura habenular. Secções medianas longitudinais do cérebro e da região habenular revelam mais claramente sua relação com as comissuras habenular e posterior. Consiste de uma simples evaginação de grau variável da porção inter comissural do teto do terceiro ventrículo.

CLASSIFICAÇÃO DA PINEAL

Blin e Maurin (1956) apontaram uma classificação da pineal para os vários animais domésticos tomando como base a posição da glândula pineal em relação ao corpo caloso, como subcalosa, pós-calosa e supracalosa. De acordo com esta classificação, elas são subcalosas nos carnívoros e primatas, pós-calosas nas vacas, cavalos, mulas, ovelhas e bodes e supracalosas nos roedores.

Para Oksche (1965 apud VOLLRATH, 1981, p.12), a glândula deve ser classificada em alongada, cônica e piriforme (em forma de pêra).¹

Para Vollrath (1979), devido à complexa situação da glândula pineal em roedores, essa classificação não pareceu ser suficiente. Então, em 1981, classificou a glândula pineal independentemente do corpo caloso, levando em consideração

OKSCHE, A. Survey of the development and comparative morphology of the pineal organ. **Progress in brain research**. 10:3-29 (1965).

sua relação com o terceiro ventrículo, assim como sua forma e arranjo de seu tecido. É classificada como tipo A (ou proximal), se o volume do tecido pineal está intimamente relacionado com o terceiro ventrículo. Quando o comprimento do órgão aumenta e atinge duas vezes ou mais a largura do órgão, pertence ao tipo AB (próximo intermediário). Se a pineal é muito longa e uma quantidade de substância de tecido pineal dispõe-se, superficialmente ou intimamente, relacionado com o cerebelo, ela pertence ao tipo próximo-intermediário distal, chamado de ABC. Se qualquer uma dessas partes está substancialmente reduzida em quantidade, as letras maiúsculas são trocadas por letras minúsculas do alfabeto grego.

Espécies em que o tecido pineal é restrito às adjacências do terceiro ventrículo são classificadas como tendo pineal do tipo A. Aqui uma enorme quantidade de tecido pineal pode ter contato com o fluido cerebrospinal ou o terceiro ventrículo, e notavelmente com os nervos e fibras da região de origem central (quadro 1). Quando o comprimento do órgão pineal aumenta e atinge duas vezes, ou mais, a largura do órgão, a pineal é classificada como tipo AB. Órgãos pineais longos, mais ou menos em forma de bastão, atingindo o cerebelo e descansando perto próximos ao crânio pertencem ao tipo ABC. Se as partes são muito reduzidas de tamanho, a respectiva letra maiúscula latina é substituída pela correspondente do alfabeto grego (minúscula). Conseqüentemente um órgão pineal classificado como tipo $\alpha\beta C$ é aquele em que o corpo de tecido pineal tem uma posição distal ou superficial à parte proximal ou intermediária possuindo seu tamanho muito reduzido. Se parte do parênquima é perdido a letra da área respectiva é omitida, como exemplificado pelo Hamster, no qual a pineal é classificada como tipo αC (VOLLRATH, 1979).

Segundo Vollrath (1981), se não existem estruturas delimitadas que permitam a classificação do órgão, esta pineal recebe a sigla de difusa (diff) subscrita após as letras. Quando a pineal encontra-se dentro do ventrículo recebe a sigla de intraventricular (iv).

No gambá, *Didelphis virginiana*, a pineal encontrada era uma estrutura côncava, rodeando o recesso pineal e cobrindo as partes anteriores e basal da comissura habenular (HOFER; MERKER; OKSCHE, 1976).

Estes últimos autores (1976) referem ainda que, no *Didelphis sp*, uma considerável porção do parênquima pineal localiza-se dentro da região da comissura habenular, em posição subependimal, subpial e interfascicular.

Vollrath (1981) classifica a pineal dos marsupiais como tipo A. Esta conclusão tem sido subsidiada em estudos nos quais os órgãos pineais de 11 espécies de marsupiais pertencentes a cinco famílias, foram estudados (KENNY; SCHEELING, 1979).

REPRESENTAÇÃO	TIPO	CLASSIFICAÇÃO
A (Proximal)	O Tecido pineal está intimamente relacionado com o terceiro ventrículo. Grande quantidade de tecido pineal pode ter contato com o fluido cerebral. Ex: ovelha, búfalo.
AB (próximo intermediário)	O comprimento do órgão pineal atinge duas vezes ou mais a sua largura. Ex. porco.
ABC/AβC próximo-intermediário distal	A glândula pineal é muito longa e uma quantidade substancial de tecido pineal dispõe-se, superficialmente ou intimamente, relacionada com o cerebelo. Ex. guinea-pig.
αβC	O corpo da glândula pineal tem uma posição distal ou superficial à parte proximal ou intermediária, possuindo tamanho reduzido. As letras maiúsculas são então trocadas por letras minúsculas do alfabeto grego. Ex. rato.
αC	Parte do parênquima é ausente. A letra da respectiva área é omitida. Ex. hamster.

FONTE: Adaptado de VOLLRATH (1979)

Quadro 1 – Classificação das glândulas pineais

2.2 ASPECTOS MICROSCÓPICOS

A glândula pineal do homem é revestida externamente pela pia-máter, da qual partem septos de tecido conjuntivo que penetram na glândula, dividindo-a em lóbulos. Esses septos levam vasos e nervos para o interior da glândula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Segundo Venzke (1986), a observação histológica mostra que a glândula é envolta por uma cápsula formada pela pia-máter. Em várias espécies de animais nota-se a presença de trabéculas de tecido conjuntivo areolar delgado que divide o órgão em lóbulos.

Os lóbulos são compostos por células epitelióides ou pinealócitos e neuroglia. A lobulação da pineal nos bovinos e cães não é nítida, uma vez que as trabéculas não são numerosas. As células endimárias parecem formar a cápsula do órgão no local de ligação do pedúnculo com o terceiro ventrículo (LESSON; LESSON, 1976).

No parênquima da glândula pineal de mamíferos, estão presentes pinealócitos produtores de hormônio, células intersticiais e fagócitos perivascularres. Os fagócitos mostram propriedades antigênicas com células microgliais produtoras de antígeno (MOLLER; BAERES, 2001).

Nos estudos histológicos da glândula pineal de capivara, realizados por Branco et al. (1997), observou-se que o órgão está principalmente constituído por pinealócitos, ou seja, células poliédricas possuidoras de citoplasma abundante e núcleos arredondados, com condensações glandulares. Os pinealócitos arranjam-se

em fileiras formando cordões e concentram-se em determinadas regiões o corte, entremeando-se a vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e células neurogliais, conferindo à glândula, no seu conjunto, um aspecto homogêneo e uniforme. Com citoplasma abundante e núcleos arredondados os pinealócitos mostram condensações de grânulos nucleares. Segundo os autores, a base da glândula está inserida através de seus pedúnculos no tecido nervoso do III ventrículo encefálico, e a haste da pineal, porção intermediária entre a base e o ápice, mostra em corte o arranjo do tecido glandular, entremeado a uma série de vasos sanguíneos, alguns mais periféricos e congestos, delimitados juntamente com a glândula por uma fina capa de tecido conjuntivo. O ápice, por sua vez mostrou, em corte longitudinal, o início da formação de uma cavidade e, em corte transversal, a cavidade da pineal e a cápsula conjuntiva com vários vasos sanguíneos dispostos perifericamente. O autor descreve que no ápice da glândula foi encontrada uma estrutura arredondada, escura, que lembra concreção calcária.

Silvino et al. (2000) estudaram em doze ratos e doze coelhos, machos, adultos, aspectos macroscópicos, microscópicos e morfométricos da glândula pineal em animais orquiectomizados e não orquiectomizados. Os dados microscópicos indicam que o órgão é revestido por cápsula de tecido conjuntivo que envia septos dividindo-o em lóbulos. Seu parênquima é constituído essencialmente por pinealócitos, cujo núcleo tem formato arredondado ou ovóide. A análise morfométrica do tamanho dos núcleos dos pinealócitos evidência não haver diferença estatística significativa entre os animais orquiectomizados e não orquiectomizados.

Holanda-Barros (2002) observou em pineal de serpentes que o órgão possui um ápice vesicular coberto por uma membrana composta por epitélio pavimentoso simples, bastante vascularizada e com lâmina própria delgada. Esta região apical mostrou-se bastante acidófila, muito vascularizada com ácinos compostos por células mais escuras, apresentando o núcleo arredondado, de esférico a ovalado, nucléolos evidentes e cromatina frouxa, além de células mais claras, com citoplasma preenchido por vesículas. Na periferia desta vesícula apical, infiltradas no tecido conjuntivo perivascular, encontram-se células com grânulos acastanhados, o que sugere a presença de melanócitos nesta área. Cortes transversais do encéfalo das duas espécies estudadas mostraram que esta vesícula apical possui uma comunicação com o terceiro ventrículo em sua porção ventral, e que esta região é circundada por um epitélio de cúbico a prismático e ciliado.

Carvalho (1997), estudando a glândula pineal de búfalos, microscopicamente observou que a glândula apresentava-se envolta por uma camada de tecido conjuntivo que continha vasos sanguíneos, o qual se infiltrava no parênquima glandular dividindo-o em lóbulos. O parênquima glandular é constituído em grande parte por pinealócitos e células da glia (astrócitos). O corpo pineal apresentou inúmeras concreções calcárias, situadas principalmente na região central da glândula.

Quanto à microscopia da glândula pineal de cães, Gomes (2003) observou que a glândula demonstrou um modelo típico dos mamíferos, com presença dos seguintes componentes: cápsula; septos ou trabéculas pinealócitos; células da glia; grânulos de pigmentos, não sendo registrada a presença de concreções calcárias. .

Machado (1965) relata que, histologicamente, o tecido pineal em *Didelphis sp* caracteriza-se pela abundância de fibras gliais e células endodimárias modificadas, enquanto em *Marmosa* predominam os pinealócitos.

Jordan (1911) afirma que a pineal de gambás é centralmente composta de uma massa densa de células, e perifericamente de células similares arranjadas em folículos, com um suporte de fibras da neuroglia e separados uns dos outros por delicados feixes de fibras nervosas.

McNulty e Hazlett (1980) observaram, através de microscopia eletrônica, que na glândula pineal de gambá *Didelphis sp.* dois tipos celulares são predominantes: os pinealócitos e os astrócitos fibrosos. Os pinealócitos são caracterizados pela presença de retículo endoplasmático rugoso e Complexo de Golgi desenvolvidos com numerosas vesículas claras e vesículas coradas densamente, possuindo também cílios sensoriais. Ocasionalmente são vistos dois outros tipos celulares: células semelhantes a neurônios e células coradas fortemente, de identidade desconhecida, que se coram escuramente pela presença de retículo endoplasmático expandido, com substância amorfa no seu interior. Algumas vezes há presença de cílios sensoriais e hastes, indicando que os pinealócitos dos gambás são filogeneticamente relacionados às células fotorreceptoras nos órgãos pineais dos vertebrados inferiores.

Entre as estruturas mais curiosas que tem sido observadas nos pinealócitos, destacam-se as chamadas “fitas sinápticas” descritas pela primeira vez, presentes em anfíbios. Estas estruturas consistem, geralmente, um bastão eletrondenso, rodeado por vesículas agranulares, localizando-se no citoplasma dos pinealócitos

geralmente próximo ou em íntima relação com a membrana celular. As fitas sinápticas foram descritas também em células receptoras de vários órgãos sensoriais de vertebrados, tais como o aparelho vestibulo-coclear e a retina onde se relaciona com a transmissão sináptica (SOUZA NETO E MACHADO, 1986).

A conformação dos corpos citoplasmáticos grânulo-filamentosos, conhecidos como nematosomas, ou corpos semelhantes a nucléolos, é estudada ao microscópio eletrônico em pinealócitos de gambá. Foram feitas também contagens destas estruturas em pineais de animais sacrificados em diferentes tempos ao longo de um período de 24 horas (claro/escuro=12/12) com o objetivo de se verificar a existência de rimiticidade. As contagens não mostraram diferença significativa entre o número de nematosomas obtido às 15 e às 3 horas, mas houve um aumento significativo de duas vezes entre 3 e 9 horas, caracterizando a existência de um ritmo de 24 horas com um pico do início de luz. Este resultado indica que os nematosomas dos pinealócitos do gambá são estruturas dinâmicas, tendo sido sugerido que eles poderiam funcionar como armazenadores cíclicos de substâncias que seriam liberadas periodicamente na membrana plásmatica para atender requisitos metabólicos dos pinealócitos (MARIA; MACHADO, 1987).

Kenny e Scheelings (1979) estudaram a região da pineal de onze espécies de marsupiais, através da microscopia ótica e eletrônica, observaram que, embora fosse bem definida em todas as espécies, apresentava uma variedade morfológica, em relação a três tipos de recesso pineal: recesso pineal in *stricto sensu*, intercomissural e infrapineal. O órgão sub-comissural, também presente em todas as espécies, não mostrou o mesmo grau de variação morfológica.

Areia cerebral é o nome que se dá aos depósitos de fosfato e carbonato de cálcio encontrados normalmente na pineal de seres humanos adultos e que aumentam de quantidade com o passar do tempo. Estas concreções se localizam na matriz extracelular do tecido conjuntivo. Sendo radio-opacas, tornam a pineal bem visível em radiografias do crânio. A calcificação da pineal não impede sua atividade, porque mesmo na idade avançada, quando o acúmulo de concreções é maior, a glândula funciona normalmente, a julgar pelas substâncias ativas e enzimas nela presentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Na pineal humana predominam dois tipos celulares, pinealócitos e astrócitos. Em cortes corados com HE, os pinealócitos são vistos com o citoplasma levemente basófilo e grandes núcleos de perfil irregular ou lobados contendo nucléolos bastante evidentes. Constituem 95% da pineal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os pinealócitos da glândula pineal em humanos estão organizados em grupos ou cordões dentro dos lóbulos. A característica mais marcante do pinealócito é a presença de um núcleo com profunda invaginação ou lobulado, com um ou mais nucléolos proeminentes. Seu citoplasma muitas vezes possui gotículas lipídicas (ROSS; REITH; ROMRELL, 1993).

A impregnação por prata (segundo método de Del Rio Hortega) mostra que os pinealócitos humanos possuem numerosas e longas ramificações com as extremidades dilatadas. Estas células produzem melatonina e alguns peptídeos ainda mal definidos. Os astrócitos aparecem entre os pinealócitos com núcleos alongados e fortemente corados. Como no tecido nervoso, os astrócitos possuem

prolongamnetos e grande quantidade de filamentos intermediários (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os pinealócitos são os tipos predominantes no corpo pineal dos mamíferos. Eles possuem um grande núcleo, sendo o citoplasma circundante, caracterizado por retículo endoplasmático rugoso e liso bem desenvolvido, aparelho de Golgi, numerosas mitocôndrias, formações tubulares, gotículas lipídicas e estruturas semelhantes a lisossomas. O segundo tipo celular do corpo pineal é o astrócito, com numerosos processos. Estes circundam os pinealócitos e estão em contato com a lâmina basal perivascular (DELLMANN, 1986). Eles são chamados com frequência de intersticiais (BANKS, 1992).

Segundo Jordan (1911), a variedade morfológica da pineal em gambás, combinada com a simples estrutura histológica, caracteriza-a como um órgão primitivo ou rudimentar.

Segundo Tulsi (1978), estudos através da microscopia eletrônica de varredura têm revelado muitas informações sobre o revestimento dos ventrículos cerebrais, principalmente distribuição de cílios, microvilos, e populações heterogêneas de células supraependimárias.

Para Samarasinghe e Delahunt (1980), a glândula pineal no gambá é representada por uma fina parede do recesso pineal. Características como o corpo pineal superficial e uma haste pineal são ausentes.

Tulsi (1978) estudou as características da superfície ventricular do recesso pineal de 35 gambás rabo de escova (*Trichosurus vulpecula*), adultos através do

microscópio eletrônico de varredura. O recesso pineal mostrou três zonas distintas que foram chamadas de: central, paracentral e periférica. As células da superfície da zona central mostraram-se sem cílios, e sem microvilos.

Células supraependimárias e vários processos supraependimários transitórios das células também estão presentes. Os processos supraependimários são encontrados entre os conjuntos de cílios, ou raramente, na superfície da camada ciliar. Não foram observadas diferenças na superfície da ultraestrutura quanto a sexo e estações do ano (SAMARASINGLE; DELAHUNT, 1980).

Oliveira (1998) estudou as estruturas da glândula pineal humana empregando os métodos de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de varredura por espectrometria de raio-x e difração de raio-x. Os resultados evidenciaram que o corpo pineal apresenta formações calcáreas distribuídas no interior do tecido conjuntivo, com formações calcáreas possuem tamanhos e formas diferentes. As estruturas calcáreas apresentam uma cápsula constituída pelo tecido conjuntivo. Na porção interna, a estrutura calcárea é constituída por uma série de lamelas concêntricas, com porosidade de aspecto amorfo. Evidenciou-se pela análise de difração de raio-x, a estrutura cristalina formada pelos átomos de vários elementos que compõem a formação calcárea.

3 MATERIAL E MÉTODO

O material e os procedimentos utilizados para esta pesquisa estão subdivididos em:

3.1 MATERIAL

Para a realização desta pesquisa foram coletados 10 encéfalos de gambás (*Didelphis sp.*) adultos, sendo 4 machos e 6 fêmeas. Destes 10 animais, 3 foram destinados ao estudo macroscópico, 5 ao estudo microscópico e 2 para a Microscopia eletrônica de varredura. Estes animais, já mortos, encontravam-se fixados no Departamento de Anatomia da FMVZ/USP e Departamento de Anatomia da UNIFEOB, 8 com formaldeído a 10% e 2 fixados por glutaraldeído a 4%. Estes animais já foram utilizados em outras pesquisas e encontravam-se acondicionados em cubas.

Para esta pesquisa, nenhum animal foi submetido a situações de dor/sofrimento e ao sacrifício de sua vida.

3.2 LABORATÓRIOS

O presente estudo foi realizado no setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Pesquisas Morfológicas das Faculdades Integradas de Medicina Veterinária Octávio Bastos – São João da Boa Vista – SP.

3.3 COLHEITA E ANÁLISE MACROSCÓPICA

Dos animais utilizados para esta pesquisa, 8 já se encontravam fixados com formaldeído a 10%, injetados com látex vermelho (para artérias) e látex azul (para veias) e 2 encontravam-se fixados por glutaraldeído a 4% no Departamento de Anatomia da FMVZ/USP e Departamento de Anatomia da UNIFEOB. Para análise macroscópica, os encéfalos foram retirados. Foi realizada uma incisão da pele, no plano mediano, desde a região supra-orbitária até a região occipital. A musculatura ao redor da calota craniana foi removida, expondo-se a superfície óssea que, com auxílio de costótomo, foi seccionada em fragmentos, o que possibilitou o isolamento dos encéfalos mediante secção dos nervos cranianos. As peças foram devidamente etiquetadas com os números correspondentes aos animais e data de colheita. Os encéfalos foram seccionados manualmente na fissura mediana, expondo-se a pineal. A região anatômica correspondente à glândula pineal foi fotografada.

3.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OBSERVAÇÃO AO MICROSCÓPIO DE LUZ

As glândulas foram retiradas com uma zona de segurança de tecido nervoso para posterior inclusão rotineira em parafina (Histosec-Merck®) e historesina (resina glicol metacrilato historesin, 702218500) fabricado por LEICA Instruments da Alemanha. As lâminas que receberam os cortes de historesina foram previamente preparadas com 50% de cola branca e água. Foram obtidos cortes com espessura de 5 micrômetros para o material embebido em parafina e com 2 micrômetros para os incluídos em resina glicolmetacrilato.

3.4.1 Processamento em Histosec® (MERCK)

As glândulas pineais de gambás foram colocadas em solução fixadora de paraformaldeído a 4 % em PBS (Dulbecco's phosphate buffer saline-DPBS, Gibco Co., USA). Após a fixação, o material foi desidratado em série de etanol em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, seguido-se inclusão em Histosec® (BEHMER, 1976; TOLOSA et al., 2003).

3.4.2 Processamento em historesina (hydroxyethyl methacrylate-Historesin, LKB 218-500, Sweden)

Para inclusão em metacrilato, as amostras também foram fixadas em paraformaldeído a 4 % em PBS. Após a fixação, o material foi lavado em PBS, desidratado em etanol (concentrações crescentes de 50 a 100 %) e finalmente infiltrado na proporção de 1:1 em solução infiltradora (50 ml de resina básica [glicol-metacrilato] e 0,5 ml de ativador [peróxido de benzoila] /álcool 95% durante 2 horas e deixado para polimerizar em uma mistura de resina (15 ml de solução infiltradora e 1 ml de endurecedor, derivado do ácido barbitúrico-DMSO) em estufa a 37 °C, *overnight*).

Foram então obtidos os cortes, com espessura de 5µm para o material embebido em Histosec® e de 2 µm para os incluídos em historesina, que por sua vez foram rotineiramente corados por H&E, hematoxilina-eosina-floxina, azul de Toluidina (TOLOSA et al., 2003) e Picrossírius (JUNQUEIRA, 1979).

3.5 Processamento para microscopia eletrônica de varredura

Após a retirada do encéfalo, 2 glândulas pineais foram coletadas e fixadas em glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4. Uma vez fixados, os

fragmentos foram lavados no mesmo tampão por 3 vezes, colocados posteriormente em solução de ácido tânico a 2% durante duas horas à temperatura ambiente e lavados novamente em tampão fosfato. Em seguida, o material foi pós-fixado em solução de tetróxido de Ósmio a 2% durante 90 minutos.

As amostras foram lavadas em tampão fosfato e, posteriormente, também lavadas em água destilada. O material ficou em imersão em ácido tânico por meia hora e depois foi lavado em água destilada.

Após esse procedimento, as amostras passaram pelo processo de desidratação em álcool etílico em concentrações de 50% (2x -15 minutos); 70% (15 minutos); 80% (15 minutos); 90% (2x – 15 minutos) e 100% (4x – 15 minutos).

Após a desidratação foi feita a secagem em aparelho de ponto crítico Balzers, CPD-030, utilizando CO₂ líquido. As peças foram montadas em bases metálicas de alumínio (*stubs*) com cimento de carbono e cobertas com ouro (Au) através do aparelho Iom Sputter Balzer – SCD - 040 e posteriormente analisadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss Leo 435 VP do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres-USP.

A documentação fotográfica da glândula pineal foi feita:

Macroscopia - através de uma câmara digital Sony Mavica 3.2MP;

Microscopia - fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400.

Os termos anatômicos utilizados foram referidos conforme International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature e International Committee on Veterinary Gross Histological Nomenclature.

4 RESULTADOS

Os resultados foram obtidos a partir das seguintes análises:

4.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES MACROSCÓPICAS

A glândula pineal de gambá (*Didelphis sp*), em nossos estudos preliminares, apresentou-se microscópica, impedindo assim que avaliações de seu peso e medidas pudessem ser efetuados.

O encéfalo de *Didelphis sp* foi abordado de início dorsalmente sendo notada ausência de circunvoluções no cortex cérebral, com o bulbo olfatório extremamente desenvolvido (Figura 1). Afastando-se os lobos occipitais, do cerebelo, visualiza-se a região onde se situa a glândula pineal provida de muitos vasos sanguíneos (Figuras 1 e 4).

Os encéfalos mediram em média 2,5 cm no sentido rostro caudal, sendo que a região glandular encontrava-se na porção media desse comprimento (Figura 2).

A glândula pineal foi encontrada em relação ao plano mediano, próxima à comissura habenular e rostralmente aos colículos rostrais (Figuras 3 e 4).

Figura 1 - Fotografia de encéfalo de *Didelphis sp*, em vista dorsal. CB, Cerebelo; C, cérebro; BO, bulbo olfatório; seta amarela, região de localização da glândula pineal; seta vermelha, vasos sanguíneos. Técnica de injeção de látex e fixação

Figura 2 -Fotografia de encéfalo de *Didelphis sp* , sendo removidos os hemisférios cerebrais para a visualização da região de localização da glândula pineal (seta), cranialmente aos colículos rostrais (Cr)

Figura 3 - Fotografia de encéfalo de *Didelphis sp*, em corte mediano, indicando-se a exata localização da pineal (seta), cranialmente aos colículos rostrais (Cr)

Figura 4 - Fotografia de encéfalo de *Didelphis sp.*, em vista dorsal, com afastamento lateral dos hemisférios cerebrais. Cerebelo (C); comissura habenular (seta); rede vascular (•); colículos rostrais (CR). Técnica de injeção de látex e fixação – azul, veias e em vermelho, artérias

4.2 RESULTADOS DAS ANALISES MICROSCÓPICAS

Quanto à observação microscópica, foi possível visualizar a glândula pineal em todos os animais analisados.

Após a análise dos cortes histológicos em diferentes colorações, pudemos observar a presença da glândula pineal em correspondência ao plano mediano, rostralmente aos dois colículos rostrais, representando diminuta evaginação do teto do diencéfalo. Seu formato característico assemelhou-se ao da letra “U” invertida, particularmente evidenciado em cortes sagitais, exatamente no plano mediano.

Observamos o corpo pineal, em íntima relação com a base da glândula, que se insere no teto do diencéfalo (Figuras 5a e 5b). A comissura habenular foi identificada em relação à porção superior do corpo pineal. O recesso pineal era evidente e revestido por epitélio cilíndrico baixo ciliado (Figura 6a e 6b).

O órgão subcomissural apresentou-se ascendente à curvatura que divide o recesso pineal do recesso intercomissural. Próximo ao plano mediano (bilateralmente), a glândula pineal mostrou-se com formato de “U” invertido (Figura 7).

À medida que os cortes se afastavam do plano mediano, a figura de “U” invertido da glândula pineal deixava progressivamente de ser caracterizada identificando-se então sua estrutura em faixa alongada (figuras 8 e 9).

Quando foi observado detalhadamente os diversos cortes seqüenciais, notamos que na porção mediana existem células muito semelhantes aos pinealócitos na base do órgão subcomissural e também permeando a estrutura dos colículos rostrais (Figuras 5a , 5b e 7).

Pudemos notar que estas células do corpo pineal (pinealócitos) possuíam núcleos arredondados e grandes com cromatina evidente e citoplasma pouco aparente. As células encontradas na base do órgão subcomissural (colículos rostrais) possuíam o mesmo aspecto, porém com citoplasma mais evidente (Figuras 10 e 11).

Uma área encontrada no corpo pineal sugeriu a presença inicial de formação calcárea (areia cerebral) (Figura 12).

Áreas com fibras nervosas eram evidentes principalmente no órgão subcomissura. Nervos com fibras mielínicas foram observados em abundância nesta região (Figuras 13 e 14).

Todas as porções do corpo pineal e do órgão subcomissural apresentaram grande quantidade de vasos (Figura 15).

Foram encontrados mastócitos na região periférica externa dos vasos sanguíneos justapostos ao endotélio (Figura 16).

A taenia talâmica repousava sobre a pineal e possuía uma monocamada de células globosas com núcleos arredondados e citoplasma de aspecto espumoso ricamente irrigada (Figuras 17 e 18).

Não pudemos evidenciar na glândula pineal de *Didelphis sp.* uma cápsula de tecido conjuntivo evidente, sendo caracterizada por um endotélio simples cuja membrana basal não foi corada pelos métodos utilizados nesta pesquisa (Figura 19).

À microscopia eletrônica de transmissão pudemos notar os aspectos da superfície pineal em formato de “U” invertido característico. Detalhes são evidenciados nas figuras 20, 21, 22, 23 e 24.

Figura 5a - Esquema representativo de corte histológico da glândula pineal de *Didelphis sp.* em formato de “U” invertido. CH – comissura habenular; CP-corpo pineal; RP- recesso pineal; OS – órgão subcomissural; RI – recesso intercomissural; CR- colículo rostral; 110X

Figura 5 b - Fotomicrografia da glândula pineal de *Didelphis sp.*, em formato de “U” invertido. CH – comissura habenular; CP – corpo pineal; RP – recesso pineal; OS – órgão subcomissural; RI – recesso intercomissural; CR – colículo rostral. Fotomicrografia – Tricromo de Masson 110X

Figura 6 - Fotomicrografias – Em 6a e 6b detalhe do epitélio de revestimento do recesso pineal. Notar o epitélio cilíndrico baixo ciliado (seta). Azul de Toluidina 440X

Figura 7 - Fotomicrografia evidenciando o órgão subcomissural (OS); colículo rostral (CR); recesso pineal (RP); terceiro ventrículo (TV). HE, historesina - 110x

Figura 8 – Fotomicrografia da glândula pineal de *Didelphis* sp. Notar o diferente aspecto da glândula pineal no corte quando se afasta da linha mediana (em faixa alongada). CP – corpo pineal; OS – órgão subcomissural; RP – recesso pineal. Azul de Toluidina, historesina 110X

Figura 9 - Eletromicrografia de varredura. Observar a comparação das estruturas glandulares da figura 8 com a figura 9. CP – corpo pineal; OS – órgão subcomissural; RP –recesso pineal; TV – terceiro ventrículo. Barra = 200 μm

Figura 10 e 11 - A fotomicrografia 10 mostra a área do colículo rostral onde são encontradas células semelhantes a pinealócitos (círculo), e logo abaixo da linha divisória, a área de tecido nervoso evidente. Notar em 10 as células (pinealócitos) muito semelhantes àsquelas observadas na figura 11 (círculo). Azul de Toluidina 440X

Figura 12 – Fotomicrografia da glândula pineal de *Didelphis* sp, mostrando uma área de concreção com destruição tecidual CC; pinealócitos (seta). Azul de Toluidina, 440X

Figura 13 - Fotomicrografia da glândula pineal de *Didelphis* sp. Observar as fibras nervosas entremeadas no corpo pineal (seta), e vasos (V). Fotomicrografia, Azul de Toluidina, historesina, 110X

Figura 14 – Fotomicrografia da região do órgão subcomissural de *Didelphis* sp, da região do órgão subcomissural evidenciando-se filete nervoso com fibras mielínicas (seta). Azul de Toluidina, historesina - 1100X

Figura 15 - Fotomicrografia da glândula pineal de *Didelphis* sp. Notar os pinealócitos no corpo pineal (setas) e a grande quantidade de vasos no parênquima glandular (V). HE, historesina, 440X

Figura 16 - Fotomicrografia da glândula pineal de *Didelphis* sp. Observar os vasos (V) e a presença de mastócitos de disposição perivascular (setas). Azul de Toluidina, historessina – 1100X

Figuras 17 e 18 - Na imagem 17 e 18 observamos a taenia talâmica. Notar na figura 18, detalhe das células globosas (seta) e a rica vascularização (V). Azul de Toluidina, historesina, 110X e 1100X

Figura 19 – Fotomicrografia da glândula pineal de *Didelphis* sp. Nota-se ausência de uma cápsula conjuntiva evidente na glândula pineal. Notamos apenas pouca quantidade de fibras colágenas no parênquima glandular (setas). Picrossírius, historesina, 110X

Figuras 20 e 21 – Eletromicrografias da glândula pineal de *Didelphis* sp. Notar em 21 aspecto da glândula pineal, vista ventral. CP – corpo pineal; OS – órgão subcomissural; RP – recesso pineal; TV – terceiro ventrículo

Figuras 22 e 23 - Eletromicrografias de glândula pineal de *Didelphis* sp, em vista dorsal, evidenciando-se a rede vascular (RD). Seta – corpo pineal

Figura 24 - Eletromicrografias de glândula pineal de *Didelphis* sp, em corte mediano. CP – corpo pineal; TV terceiro ventrículo; OS – órgão subcomissural; RP — recesso pineal

4 DISCUSSÃO

Os aspectos microscópicos da glândula pineal de *Didelphis sp* são muito interessantes e importantes tendo em vista seu tamanho microscópico.

Diferentemente do “formato de pinha”, da glândula pineal humana (DYCE,1998) outras formas tem sido identificadas em varias espécies como no caso deste trabalho sobre *Didelphis sp*, em que pudemos observar uma forma de “U” invertido, cujo arranjo final só pode ser elucidado através de SEM (Microscopia Eletrônica de Varredura).

Ao iniciarmos os nossos estudos nos indagamos sobre a afirmação de Scaffer et al. (1909), de que todos animais possuíam pineal, exceto o anfioxo. Quando decidimos averiguar sobre a glândula pineal de *Didelphis sp* brasileiro, tanto o *D. virginiana* quanto o *Didelphis albiventris*, esperamos encontrar a glândula macroscopicamente evidenciada. Entretanto, neste trabalho, identificamos a glândula pineal apenas microscopicamente sendo, portanto, difícil comparar esta glândula com achados macroscópicos de outros autores, em outras espécies. Vollrath (1979) também descreveu que os crocodilianos, edentatas e sirenios não possuíam um órgão pineal definido. No *Didelphis*, a caracterização do corpo pineal foi bastante difícil e, além do mais, pinealócitos também pareciam estar presentes na região dos colículos rostrais, sugerindo ser a pineal, forma de glândula difusa. Estas células muito semelhantes aos pinealócitos, também estão presentes no órgão subcomissural, o que sugere que esta glândula poderia ter o formato da letra “U”, não invertido.

Segundo Silvino (2000), informações sobre a morfologia e funções da glândula pineal ainda são escassas, e pudemos confirmar este fato quando fizemos nossa revisão literária.

Encontramos a glândula pineal de *Didelphis sp* em correspondência ao plano mediano entre os dois hemisférios cerebrais rostralmente aos colículos rostrais, apenas ao teto do diencéfalo, conforme referem Didio (2002), Gartner e Hiatt (1999) e Vollrath (1981).

A estrutura pineal de *Didelphis sp*, por ser microscópica, era muito peculiar, com formato único em “U” invertido, o que difere dos achados em roedores que possuem, segundo Branco (1997) e Vollrath (1981), formato de bastão e, em serpentes, que segundo Holanda-Barros (2002), tem formato ovóide. Esta estrutura em roedores (cutia) era desprovida de lúmen, o que no *Didelphis* também não foi observado.

Já em búfalos e cães, Carvalho (1997) e Gomes (2003) notaram que essa glândula mostrava-se macroscopicamente com formato de “amendoim” e globosa, respectivamente, com grande variação de formato, portanto, em relação ao *Didelphis*, que se evidencia microscópicamente em formato de “U” invertido, com íntima relação com o teto do 3º ventrículo. Esta relação confirma os dados de Jordan que trabalhou com marsupiais (1911).

As diferentes classificações propostas por Blin e Maurin (1956) e Oksche (1965) não satisfizeram os meios científicos e posteriormente em 1981, Vollrath classificou a glândula pineal com maior rigor. Podemos comparar os

nossos achados em informações exaradas por com Blin e Maurin (1956), classificando a glândula desses animais como pós-calosa. Pela classificação de Oksche (1965), como alongada e, pela de Vollrath (1981), como do tipo A.

Histologicamente observou-se que a glândula pineal de *Didephis sp* possuía uma delgada camada de mesotélio disposta envolvendo fina rede de fibras colágenas que se encontram em contato com o órgão pineal. Este fino tecido conjuntivo supre, através de seus vasos e nervos, a glândula pineal, porém não há divisão distinta da glândula em lóbulos, como o descrito por Lesson e Lesson (1977) e Venzke (1986).

Os achados histológicos em *Didelphis sp* assemelharam-se aos de Branco (1997); Carvalho (1997); Gomes (1965); Holanda-Barros (2002); Jordan (1911) e Moller e Baeres (2002). No parênquima encontramos pinealócitos, além de células gliais, vasos nervosos, nervos e algumas características especiais que serão discutidas a seguir.

Os pinealócitos são o tipo celular predominante com citoplasma basófilo e núcleos arredondados contendo, na maioria das vezes, mais de dois nucléolos, organizados em cordões. Esses achados assemelham-se aos encontrados por Junqueira e Carneiro (2004) e Ross et al (1993). Em nossos estudos não foram utilizadas técnicas de impregnação por prata (Ag), não sendo portanto possível definir astrócitos e prolongamentos de pinealócitos como fizeram Junqueira e Carneiro (2004) para a glândula pineal humana.

Todas as características morfológicas das células estudadas, são compatíveis com a identificação de pinealócitos, o que não dispensa a efetuação de procedimentos de imunohistoquímica com marcadores específicos para essas células, o que pretendemos realizar em etapas futuras. A aplicação técnica será importante principalmente na elucidação das áreas expandidas (órgão subcomissural e colículos rostrais) além do corpo pineal, onde essas células também se apresentaram. Alias, o fato de encontrarmos presença de células (sugestivas de serem pinealócitos) em áreas expandidas além do corpo pineal (órgão subcomissural e colículos rostrais) encontra ressonância no exarado por Hofer; Merker; Oksche, 1976, para quem, no Didelphis uma considerável porção do parênquima pineal localiza-se dentro da região da comissura habenular, em posição subependimal, subpial e interfascicular.

Os astrócitos, pela técnica empregada em nossos estudos, só puderam ser diferenciados visualmente quanto à morfologia nuclear. Como a Microscopia Eletrônica de Transmissão não foi utilizada, não podemos comparar nossos achados aos de Banks (1992); Dellman (1986) que estudaram a glândula em humano.

Sabemos que os pinealócitos são células ativas produtoras de melatonina e secretam conforme o ciclo luminoso claro/escuro, conforme referências de Junqueira e Carneiro (2004); Cipolla Netto et al. (2003); Didio (2002); Sugden (1989); Han e Cormack (1983); Jourdan (1911); Lotufo (2003); Voisin et al. (1994). Porém, nossos estudos morfológicos não nos permitiram inferir qualquer dado sobre estas informações.

Segundo Tulsi (1978), estudos em SEM mostraram que o recesso pineal de *Trichourus vulpeca* possuía áreas ciliadas e não ciliadas, inferindo a este respeito que algumas regiões são mais secretoras que outras. Apesar de nossos estudos não terem sido baseados apenas no recesso pineal, pudemos observar a presença de cílios na região do recesso pineal compatíveis com os achados de Samarasinghe e Delahunt (1980).

Estruturas calcáreas foram evidenciadas em algumas regiões perivasculares, em pequenas proporções, quando comparadas a de outras espécies, como o descrito por Junqueira e Carneiro (2004) e Oliveira (1998), respectivamente para a glândula pineal humana.

Finalmente, diante destas comparações e buscando complementar informações inerentes à morfologia da pineal de marsupiais, esperamos ter, com este trabalho, dado a nossa contribuição a um assunto tão vasto e tão questionado. Portanto, outros projetos serão necessários para melhor elucidação das estruturas da glândula pineal de *Didelphis* sp, principalmente para se averiguar a difusão de pinealócitos para áreas vizinhas (órgão subcomissural e colículos rostrais) ao corpo da glândula.

5 CONCLUSÕES

Do que foi exposto, julgamos validas as seguintes conclusões:

- 1 - A glândula pineal estava presente em todos os animais analisados.
- 2 - A glândula pineal não pode ser visualizada macroscopicamente devido ao seu diminuto tamanho
- 3 - A glândula pineal localizou-se em correspondência ao plano mediano, entre os dois hemisférios cerebrais, rostralmente aos colículos rostrais e caudalmente à comissura habenular.
- 4 - Microscopicamente apresentou-se em formato de “U” invertido.
- 5 - A glândula pineal de *Didelphis sp* apresentou pinealócitos disperso em áreas vizinhas (orgão subcomissural e colículos rostrais) ao corpo da glândula.
- 6 - Histologicamente pudemos notar que as células do corpo pineal (pinealócitos) possuíam núcleos arredondados e grandes com cromatina evidente e citoplasma pouco aparente.
- 7 - Uma área encontrada no corpo pineal sugeriu a formação de concreções (areia cerebral).

8 – A glândula pineal do *Didelphis sp* pode ser assim classificada: segundo a localização de células secretoras (VOLLRATH, 1979), como sendo do tipo A; segundo a forma, em alongada (OKSCHE, 1965); segundo a sua localização em relação ao corpo caloso (BLIN; MAURIN, 1956) como pós calosa.

REFERÊNCIAS

- ARAKI, M. Developmental potency of cultured pineal cells: an approach to pineal developmental biology. **Microscopy Research and Technique**, v. 1, n. 53, p. 33-42, 2001.
- AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. **Reproduction in mammals**. Hormonal control of reproduction. Cambridge: 2. ed. Cambridge University Press, 1984. v. 3, 244 p.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.
- BEHMER, O. A. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976. 241 p.
- BLIN, P. C.; MAURIN, C. Anatomie macroscopique de l'épiphyse des mammifères domestiques. **Recueil Medicine Vétérinaire**, v. 1, n. 132, p. 36-52, 1956.
- BRANCO, E. R.; GUIMARÃES, A.; MIGLINO, M. A.; DIDIO, L. J. A.; NURMBERGER, R.; SOUZA, W. M. Pesquisa anatômica da glândula pineal em capivaras (*Hydrochoerus hydrochoeris*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 34, n. 4 p. 191-195, 1997.
- CARVALHO, A. F. **Histologia e Histometria da glândula da pineal de búfalos (*Bubalus bubalis*- Linneaus, 1758)**. 1997. 117 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) – Faculdade de Medicina Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 1997.
- CIPOLLA NETO, J.; CASSOLA, A. C; SCIALFA, J.; TERRA, I. C. M.; AFECHÉ, S. C. Papel do cálcio na síntese de melatonina pela glândula pineal de ratos. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental 16., 2001 Caxambu: **Anais...** Caxambu: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2001. p. 380.
- DELLMANN, H. D. Sistema endócrino. In: DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p. 305.
- DIDIO, J. A. L. **Tratado de anatomia sistêmica aplicada**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. v. 2, 948 p.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 663 p.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 426 p.

GOMES, L. A. **Estudo morfológico da glândula pineal no cão**. 2002. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

HAM, A. W.; CORMACK, D. H. **Histologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 907 p.

HOFFER, H. O.; MERKER, G.; OKSCHE, A. Atypische formen des pinealorgans der Säugetiere. **Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft**. v. 70, n. 1. p. 97-102, 1976.

HOLANDA-BARROS, P. M. **Estudo da pineal em jararacas (*Bothrops jararaca*) e cascavéis (*Crotalus durissus*)**. 2002. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

INNES, V. R. M.; ZEMAN, W. **Craige's neuroanatomy of the rat**. New York: Academic Press, 1963. 230p.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina anatomica veterinaria**. 4. ed. Zurich, 1994. (Together with nomina histologica, 2. ed., 1992 and nomina embriologica veterinaria, 1992).

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY HISTOLOGICAL NOMENCLATURE. **Nomina histologica**. 2. ed. rev. Zurich, 1994. (Together with nomina anatomica veterinaria, 4. ed. and nomina embriologica veterinaria.).

JORDAN, H. E. The microscopy anatomy of the epiphysis of the opossum. **The Anatomy Record**, v. 5, n. 7, p. 325-338, 1911.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNONAS, G.; BRETAN, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in the tissue sections. **Histochem journal**. v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 448 p.

KENNY, G. C. T.; SCHEELINGS, F. T. Observation of the pineal region of non-eutherian mammals. **Cell and Tissue Research**, v. 198, n. 2, p. 309-324, 1979.

LEESON, C. R.; LEESON, T. S. **Histologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1976. 533 p.

LOTUFO, C. M. C. **Efeito da melatonina sobre as alterações vasculares que caracterizam a inflamação aguda**. 2003. 88f. Dissertação (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MACHADO, A. B. M. Dados histológicos e embriológicos sobre a região pineal em alguns marsupiais brasileiros. **Ciência e Cultura**, v. 17, n. 2, p. 249, 1965.

MARIA, T. A.; MACHADO, A. B. N. Nematosomes or nucleolos-like body in the pineal gland of the opossum: diurnal rhythmicity. **Microscopia Eletrônica e Biologia Celular**, v. 11, n. 1, p. 59-65, 1987.

MCNULTY, J.A.; HAZLETT, J. The pineal region in the opossum, *Didelphis virginiana*. I. Ultrastructural observations. **Cell and Tissue Research**, v. 207, n. 1, p. 109-121, 1980.

MOLLER, M.; BAERES, F. M. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. **Cell and Tissue Research**, v. 309, n. 1, p. 139-50, 2001.

SOUZA NETO, J. A.; MACHADO, A. B. N. Morfologia e variações rítmicas das fitas sinápticas da glândula pineal do gambá (*Didelphis albiventris*, Lund). **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**, v. 3, n. 2, p. 70-79, 1986.

OLIVEIRA, S. F. **Estudo da estrutura da glândula pineal humana empregando métodos de microscopia de luz, eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de varredura por espectrometria de raio-x e difração de raio-x**. 1998. 129 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia Funcional: Estrutura e Ultra-estrutura) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

RENFREE, M. B.; PASK, A. J.; SHAW, G. Sex down under: the differentiation of sexual dimorphisms during marsupial development. **Reproduction Fertility and Development**, v. 13, n. 7-8, p. 679-690, 2001.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. **Histologia: texto e atlas**. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1993. 779 p.

SAMARASINGLE, D.; DELAHUNT, B. The ependyma of the saccular pineal gland in the non-eutherian mammal *Trichosurus vulpeca*. **Cell and Tissue Research**, v. 213, n. 3, p. 417-432, 1980.

SCHAFFER, E. A.; SYMINGTON, J.; BRYCE, T. H. **Quain's elements of anatomy**. New York: Longmans & Green, 1909. 230 p.

SHERIDAN, M. N.; REITER, R. J. The fine structure of the hamster pineal gland. **American Journal of Anatomy**, v. 122, n. 2, p. 357-376, 1968.

SILVINO, M. J.; BOMBONATO, P. P.; MIGLINO, M. A.; DIDIO, L. J. A.; SANTANA, M. I. Aspectos morfológicos macroscópicos da glândula pineal em ratos e coelhos. **Brazilian Journal of Morphology Science**, v. 17, n.1 , p. 207, 2000.

SILVINO, M. J.; MIGLINO, M. A.; DIDIO, L. J. A.; HERNANDES-BLASQUEZ, F. J. The pinealgland in adult "golden cutia" (*Dasyprocta aguti*, Rodentia Caviomorpha). **Revista Chilena de Anatomia**, v. 13, n. 1, p. 17-23, 1995.

SUGDEN, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. **Experientia**, v. 45, n. 10, p. 922-932, 1989.

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

TULSI, R. S. A scanning electron microscope study of the pineal recess of the adult brush-tailed possum (*Trichosurus vulpeca*). **Journal Anatomy** v.129, n. 3, p. 521-530, 1979.

VENZKE, W. G. Endocrinologia geral. In: GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. Vol II. São Paulo: Interamericana, 1986. v. 2, p. 49-150.

VOISIN, P.; GUERLOTTE, J.; BERNARD, M.; GREVE, P.; GRECHEZ-CASSIAU, A.; COLLIN, J. P. Regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression in the pineal gland and retina. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 54, n. 1, p. 41-46, 1994.

VOLLRATH, L. Comparative morphology of the vertebrate pineal complex. The pineal gland including man. **Progress in brain research**, v. 42, n. 1 p. 25-38, 1979.

VOLLRATH, L. **The Pineal Organ**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1981. 665 p.