Aliny Antunes Barbosa Lobo Ladd

Mecanismos de proliferação neuronal pós-natal no gânglio cervical cranial de preás (*Galea spixii spixii*) Wagler, 1831. Neurogênese x diferenciação neuronal tardia.

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Romeu Rodrigues De Souza

São Paulo
2009

RESUMO

LADD, A. A. B. L. **Mecanismos de proliferação neuronal pós-natal do gânglio cervical cranial de preás (*Galea spixii spixii*) Wagler, 1831. Neurogênese x diferenciação neuronal tardia.** [Mechanisms of post-natal neuronal proliferation in the cranial cervical ganglion of preás (*Galea spixii spixii*) Wagler, 1831. Neurogenesis vs. late neuronal differentiation]. 2009. 75f Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

Neste estudo, foram abordados os aspectos quantitativos do gânglio cervical cranial (GCC) esquerdo de preás (*Galea spixii spixii*) machos, oriundos do criatório da Universidade Federal Rural do Semi-Árido Nordeste de Mossoró-RN. Os seguintes parâmetros foram estimados: volume do GCC, número total e tamanho dos neurônios (uni e binucleados) durante dois períodos do desenvolvimento pós-natal (maturação e envelhecimento). Para tanto, utilizamos quatro grupos etários distintos de animais: neonatos, jovens, adultos e senis. Após a eutanásia dos animais, os GCCs foram fixados (perfusão sistêmica) com solução de formoldeído (4%) em PBS, embebidos em solução de ágar (10%) e seccionados sistemática, uniforme e aleatoriamente, aplicando-se o princípio de amostragem e contagem do fractionator. Os principais resultados desta pesquisa foram: houve diferença significativa entre os grupos etários para os parâmetros: Peso Neonato: 0,00056 ; Jovem: 0,00084; Adulto: 0,00116; Senil: 0,00118. Comprimento Neonato: 1,294 ; Jovem: 2,076; Adulto: 2,304; Senil: 2,082. Largura Neonato: 0,842; Jovem: 1,028; Adulto: 1,062; Senil: 1,174. Volume ganglionar Neonato: 0,34 mm³ ; Jovem: 0,30 mm³; Adulto: 0,39 mm³; Senil: 0,63 mm³ e Volume neuronal médio de neurônios uninucleados Neonato: 2916,90 mm³ ; Jovem: 3550,00 mm³; Adulto: 7409,00 mm³; Senil: 6701,00 mm³. As principais conclusões deste estudo foram: (i) peso, comprimento e largura do GCC apresentaram aumento significativo de 185%, 60% e 79% respectivamente, durante o período de maturação, enquanto durante o período de envelhecimento, o peso do GCC apresentou queda de 33%, o comprimento um pequeno decréscimo de 10%, entretanto a largura, durante este mesmo período, apresentou um aumento progressivo de mais de 10%, tais alterações relacionadas com a idade refletiram no volume ganglionar, causando hipertrofia; (ii) Essa hipertrofia do GCC de preás é secundária ao desenvolvimento pós-natal (maturação e envelhecimento),

aumentando em 85%, acompanhado por um aumento alométrico, da ordem de 6 vezes em relação à massa corporal, aproximadamente 622%; (iii) Há hipertrofia dos neurônios uninucleados que é secundária ao desenvolvimento pós-natal do GCC de preás, aumentando em 154% durante o período de maturação com uma pequena queda de 10% durante o envelhecimento. Finalmente, sugere-se que estudos futuros possam investigar se o tamanho dos territórios de inervação destes gânglios pode desencadear mudanças na micro e macroestrutura dos mesmos, incluindo a possibilidade de ocorrência de neurogênese, que seria estudada por meio de imunomarcadores específicos.

Palavras-chave: Gânglio cervical cranial, preás, estereologia, maturação, envelhecimento, roedores.

ABSTRACT

LADD, A.A.B.L. **Mechanisms of the post-natal neuronal proliferation in the cranial cervical ganglion of preás (*Galea spixii spixii*) Wagler, 1831. Neurogenesis vs late neuronal differentiation.** [Mecanismos de proliferação neuronal pós-natal do gânglio cervical cranial de preás (*Galea spixii spixii*) Wagler, 1831. Neurogênese vs diferenciação neuronal. 2009. 75f Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

This study aimed at detecting whether post-natal development would exert any effect on the size and number of cranial cervical ganglion (CCG) neurons of male preas (*Galea spixii spixii*). Twenty left CCGs from twenty preas were harvested from the Animal Facility of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido Nordeste, Mossoró- RN and were divided into four different age groups: newborn, young, adult and aged subjects. The following parameters were estimated using Cavalieri's principle and optical fractionator and planar rotator, respectively: the volume of CCG, total number and mean volume of uni and binucleate neurons. After euthanasia, the CCGs were perfusion-fixed with a 4% formaldehyde solution in PBS, agar-embedded and, SUR vibrosectioned. The ganglion volume was 0.34 mm³ (newborn), 0.30 mm³ (young), 0.39 mm³ (adult) and 0.63 mm³ (aged animals) (p= 0,012). The mean volume of uninucleate neurons was 2,917 mm³ (newborn), 3,550 mm³ (young), 7,409 mm³ (adult) and 6,701 mm³ (aged animals) (p=0,0001). The main conclusions of this study were: (i) The CCG hypertrophy - 85% - is the result of post-natal development (maturation and ageing), (ii) a 154% increase (hypertrophy) in the volume of uninucleate neurons during the maturation is followed by a 10% atrophy of them during ageing. Future studies may investigate whether the size of the CCG's target-organs can affect the structural foundation of CCG and, therefore, add further fuel to the notion that a post-natal neurogenesis may indeed exist in sympathetic ganglia.

Keywords: Cranial cervical ganglion, preas, design-based stereology, maturation, ageing, rodents.

1 INTRODUÇÃO

O gânglio cervical cranial (GCC) do preá foi o objeto deste estudo experimental, que serviu como modelo para analisarmos quantitativamente a dinâmica neuronal pós-natal. Futuramente, estes resultados preliminares servirão de base para um estudo específico sobre a neurogênese.

O preá (*Galea Spixii spixii*) (WANGLER, 1831) é um pequeno roedor da classe dos mamíferos, com comprimento de 15 a 25 cm nos adultos. Seu peso ao nascer varia de 30 a 70g, podendo atingir entre 300g e 800g, quando adultos. Pertencente à Ordem *Rodentia*; à Família *Cavidae* e ao Gênero *Gálea*; são animais desprovidos de calda, com superfície dorsal escura, acinzentada, e ventral branca, com manchas infraoculares e pós-auriculares também brancas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). São encontrados em todos os estados da região nordeste do Brasil, também em Minas Gerais e Mato Grosso (MOOJEN, 1952). Possui hábitos crepusculares basicamente noturnos. Vive em capinzais, entre moitas e arbustos, às vezes, perto de áreas alagadas, onde consegue mergulhar e nadar. Alimentam-se de brotos, folhas, sementes, tubérculos e raízes. Quando seu ambiente natural sofre alterações, invade arrozais e hortas e é considerado como praga. (CORRADELLO, 1987).

O sistema nervoso autônomo (SNA) supre o coração, vasos sanguíneos, órgãos intestinais, genitais, urinários e as vias respiratórias. Os nervos regulam e coordenam funções corpóreas como a atividade secretora de glândulas e a contração e relaxamento dos músculos. O sistema nervoso autônomo é organizado em grupos de gânglios, os quais podem ser divididos esquematicamente em quatro grupos: paravertebrais, pré-vertebrais, paraviscerais e intramurais. Estes gânglios não são apenas simples estações de retransmissão, mas locais de convergência, divergência, facilitação e inibição de impulsos nervosos (MATTHEWS, 1983; KRENLEN, 1984; BAKEWELL, 1995; GABELLA, 2004). Nos mamíferos, o SNA possui uma estrutura comum, sendo compreendido pelos neurônios eferentes que inervam toda a musculatura lisa do corpo e glândulas e pelos neurônios aferentes

que recebem e transmitem reflexos e sensações dos órgãos viscerais (GABELLA, 2004).

O gânglio cervical cranial (GCC) é classificado como um gânglio paravertebral e tem sido consideravelmente estudado durante as últimas quatro décadas. Estudos sobre estrutura e função dos gânglios autônomos utilizam o GCC devido ao seu fácil acesso e tamanho, o que permite a sua precisa localização. O GCC situa-se dorsalmente ao nervo vago e próximo à bifurcação da artéria carótida comum. Responsável pela inervação de toda a área da cabeça, innervando a túnica adventícia de todas as artérias desta região (KÖNIG e LIEBICH, 2004), emite fibras pós-ganglionares para os nervos cranianos oculomotor (III), glossofaríngeo (IX) e vago (X) e dá origem a fibras simpáticas pós-ganglionares que se dirigem para a glândula pineal.

Portanto, esta pesquisa experimental pode contribuir fornecendo base de dados para outros estudos das áreas de cirurgia e neurocirurgia, quanto à localização, topografia e aspectos microestruturais e quantitativos do GCC em roedores silvestres (preás), evitando assim intervenções cirúrgicas inacuradas que podem causar injúrias na região cervical, desencadeando disfunções simpáticas, sendo a principal delas a Síndrome de Horner, representada por um grupo de sinais clínicos que incluem anisocoria, enoftalmia, protrusão da terceira pálpebra, ptose e aumento da temperatura da face como resultado da vasodilatação periférica. Esta síndrome pode acometer tanto animais (principalmente gatos, cães e equinos) quanto humanos (BOYDELL, 1995; BELL et al. 2001; OZEL, 2004)

Os neurônios autonômicos têm sido examinados sob microscopia de luz e eletrônica (BARTON; CAUSEY, 1958; PICK et al., 1964).

Comumente há correlação alométrica entre o tamanho neuronal e o tamanho do corpo do animal (GABELLA, 2004). Farel (2003) cita que, em ratos, o número de neurônios no gânglio de raiz dorsal (DRGs) lombar é quase 35% maior em adultos do que em neonatos, sem proliferação neuronal, resultado este que sugere que os DRGs de ratos jovens contém uma população de neurônios que não sofrem diferenciação completa, vindo esta ocorrer tardiamente. Neste estudo, os critérios de contagem foram baseados em resultados de experimentos com marcação retrógrada e complementada por métodos imunohistoquímicos, usando o marcador de mitose Brd-U (Bromodeoxyuridina) e utilizando, a seguir, métodos estereológicos para a quantificação das estruturas imunorreativas.

Através de estudos autorradiográficos em coelhos, Filichkina (1981) observou que gânglios paravertebrais apresentaram neurônios mono e binucleados com quase a mesma intensidade no total de síntese protéica. Entretanto, Forsman et al., (1989) não detectou diferenças ultraestruturais nos núcleos de ambas as células, entretanto, análises microdensitométricas mostraram que células binucleadas do gânglio celíaco-mesentérico de cobaias contêm o dobro de DNA em relação às células uninucleadas.

Em relação à frequência de neurônios binucleados, Eranko (1972) cita que em ratos ocorrem algumas mitoses nos neurônios após o nascimento, sabendo-se que o número final de neurônios é estabelecido durante a vida fetal, e que da primeira semana após o nascimento, em ratos, o número de neurônios principais permanece inalterado ou mostra um pequeno decréscimo. Com isso, Forsman et al. (1989) sugere que a ocorrência de células binucleadas pode ser devido a uma interrupção de mitoses durante o processo de diferenciação. A determinação dos tipos neuronais pode ser verificada também quanto a sua funcionalidade (GUADIX et al., 1979). Células binucleadas têm sido reportadas em roedores silvestres brasileiros 36% e 13% em capivaras jovens e adultas (RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004 e RIBEIRO, 2006), respectivamente, porém seu significado funcional ainda é obscuro.

Desta forma, a primeira fase desta pesquisa teve como objetivo analisar morfoquantitativamente os GCCs de preás durante quatro períodos do desenvolvimento pós-natal (neonatos, jovens, adultos e animais de meia-idade). Concomitantemente à análise das fases etárias com a aplicação dos métodos estereológicos, foi possível estabelecer uma relação entre idade, número total de neurônios (uninucleados e binucleados), volume neuronal, volume ganglionar e massa corporal. Preliminarmente, com o uso de marcadores mitóticos específicos, como o Brd-U (Bromodeoxyuridina) Farel (2003) e Valero (2005), investigamos no GCC de preás a resposta destes neurônios ao Brd-U. Em um estudo mais futuro, pretendemos investigar, quimicamente e quantitativamente, a possível ocorrência de divisão celular durante a maturação e o envelhecimento, investigando assim a dinâmica neuronal pós-natal bem como os fenômenos que a regem: neurogênese x diferenciação tardia.

Contudo, os dados desta pesquisa poderão ser comparados posteriormente com capivaras e outros roedores, podendo assim fornecer bases citoarquiteturais

para o estudo, “in vivo”, do tecido nervoso destes roedores selvagens pertencentes a fauna brasileira.

7 CONCLUSÕES

Com base nos métodos empregados e resultados obtidos, é possível concluir o que se segue:

- Os seguintes dados macromorfolométricos: peso, comprimento e largura do gânglio cervical cranial sofreram alterações relacionadas com a idade e que refletiram no volume ganglionar.
- A hipertrofia do GCC de preás é secundária ao desenvolvimento pós-natal (maturação e envelhecimento).
- A hipertrofia dos neurônios uninucleados é secundária ao desenvolvimento pós-natal do GCC de preás.
- Detectou-se a presença de neurônios em ciclo celular no GCC de preás neonatos e senil, o que sugere que estas células estão mitoticamente ativas durante o período pós-natal.

REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, M., Estimation of nuclear population from microtome sections. **The Anatomical Record**. v. 94, p.239 – 247,1946.
- ABRAHÃO, L. M. B., NYENGAARD, J. R. , SASAHARA, T. H. C., GOMES S. P. , OLIVEIRA F. R. , LADD, F. V. L., LADD, A. A. B. L., MELO M. P. , MACHADO M. R. F., MELO S. R. , RIBEIRO A. A. C. M, Asymmetric post-natal development of superior cervical ganglion of paca (Agouti paca). **Int. J. Devl Neuroscience**. v. 27, p. 37–45, 2009.
- ANDERSEN, B.B; GUNDERSEN, H.J.G.; PAKKENBERG, B. Aging of the human cerebellum: A stereological study. *J. Comp. Neurol.* V. 466 p. 356-365 2003
- ANDERSEN, B. B., FABRICIUS, K., GUNDERSEN, H. J., JELSING, J., STARK, A. K., No change in neuron numbers in the dentate nucleus of patients with schizophrenia estimated with a new stereological method--the smooth fractionator. **J Anat.** v. 205, p.313–321, 2004.
- BAKEWELL, S. The antonomic nervons system. Update in anesthesia, n. 5, art. 6, 2 p. 1995.
- BALJET, B., DRUKKER J., The extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. **Acta Anatomica**. v.104, p.243-267, 1979.
- BAO-PING S.; YAN-PING.; D; ZHAO-HUI, X.; HONG-XIAN, Y.; BRAND-SABERI; JIAN-LIN, W. The cranial cervical ganglion and its branches in the yak (*Bos grunniens*). **The veterinary Jornal**, v. 173, n. 1 , p. 174-177 , 2007.
- BARTON, A. A., CAUSEY, G., Electron microscopic study of the superior cervical ganglion. **Journal Anatomy**. v.92, p. 399–407, 1958.
- BEDDELEY, A. J.; GUNDERSEN, H. J. G.; CRUZ-ORIVE, H. J. G. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of Microscopy**, v. 142, n. 3, p. 259-276, 1986.
- BELL, R. L.; ATWEH, N.; IVY, M.; POSSENTI, P. Traumatic and iatrogenic horner syndrome: case reports and review of the literature. **The Jornal of Trauma Injury, Infection and Critical Care**, v. 51, n. 2, p. 400-404, 2001.
- BOYDELL, P. Idiopathic horner's syndrome in the gold retriever. **Journal of small animal practice** n.36 p.382-384 1995.
- CABELLO, C. R., THUNE, J. J., PAKKENBERG, H., PAKKENBERG, B., Ageing of substantia nigra in humans: cell loss may be compensated by hypertrophy. **Neuropathology & Applied Neurobiology**. v. 28, p.283-291, 2002.

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

COGGESHALL, R. E., CHUNGA K., GREENWOODA D., HULSEBOSCHA, C. E., An empirical method for converting nucleolar counts to neuronal numbers. **Journal of Neuroscience Methods.** v. 12, p. 125-132, 1984.

CORRADELLO, E., **Criação de preá.** p.83, 1987.

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

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

DEL RIO, J. A., SORIANO, E., Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse. **Brain research.** v. 49, p. 311-317, 1989.

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

DOLBEARE, F., Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. **Histochemical Journal.** v. 27, p.339-369, 1995.

DOLBEARE, F., Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part III. Proliferation in normal, injured and diseased tissue, growth factors, differentiation, DNA replication sites and *in-situ* hybridization. **Histochemical Journal.** v. 28, p. 531-575, 1996.

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

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

ERANKO, L., Postnatal development of histochemically demonstrable Catecholamines in the superior cervical Ganglion of the rat. **Histochem.**v.3, p. 225-236, 1972.

ESIRI, M. M., Ageing and the brain. **The Journal of Pathology.** v. 211, p.181 – 187, 2007.

EVANS, R., J. F., SURPRENANT, A. P2X receptors in autonomic and sensory neurons. **Seminars in Neuroscience.** v. 8, p. 217-223, 1996

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

FILICHKINA, N. M., Comparative radioautographic analysis of synthesis and slow transport of protein axons of uni- and double nuclear neurocytes in the rabbit. **Acta Anat Histol Embryol**. v. 11, p.49–52, 1981.

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

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

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

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

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

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

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

GUNDERSEN, H .J. G., BAGGER, P., BENDTSEN, T. F. The new stereoloical tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Microb Imm Scand**. v. 96, p. 857-881,1988.

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

GUNDERSEN, H. J. G .The smooth fractionator. **Journal of Microscopy**. v. 207, p.191-210, 2002

HAYAKAWA, T., ITOH, M., MIKI T., KANETO T., TOMIYAMA H., TAKEUCHI Y. Sympathetic fibres innervating the extraocular muscles: cells of origin in the cat superior cervical ganglion. **Okajimas Folia Anat Jpn.** v. 77, p.119-124, 2000.

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

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

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

JOHNSON, J. R., GORIN, P. D., BRANDEIS, L. D., PEARSON, J., Dorsal root ganglion neurons are destroyed by exposure in utero to maternal antibody to nerve growth factor. **Science.** v. 210, p. 916-918, 1980.

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

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

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

KONIG, H., LIEBICH, H., Veterinary anatomy of domestic animals. **Textbook and color atlas.** p. 495–7, 2004

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

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

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

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

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

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

MELO, S. R., NYENGAARD, J. R., DA ROZA, O. F., LADD, F. V., ABRAHÃO, L. M., MACHADO, M. R., SASAHARA, T. H., DE MELO, M. P., RIBEIRO, A. A., The developing left superior cervical ganglion of Pacas (Agouti paca). **Anatomical Records**. v. 292, p. 966-975, 2009.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE., Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle de roedores Brasil**, p.132, 2002.

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

MOLLER, M., LIU, W. Innervation of the rat pineal gland by nerve fibres originating in the sphenopalatine, otic and trigeminal ganglia: a retrograde in vivo neuronal tracing study. **Reprod Nutr Dev.** v. 39, p.345-353, 1999.

MOMMAA, S., VASILYEVAC, E., TOMILINC, N., SHUPLIAKOV, O. Ultrastructural identification of dividing cells in the adult mammalian central nervous system. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 119, p. 59-63, 2002.

MOOJEN, J., Os roedores do Brasil: **Instituto Nacional do Livro Rio de Janeiro**, Brazil. p. 214, 1952.

NGWENYA, L. B., PETERS, A., ROSENE, D. L., Light and Electron Microscopic Immunohistochemical Detection of Bromodeoxyuridine-labeled Cells in the Brain : Different Fixation and Processing Protocols. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v 53 (7), p. 821-832, 2005.

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

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

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

PAKKENBERG, B., GUNDERSEN, H. J. G., New stereological method for obtaining unbiased and efficient estimates of total nerve cell number in human brain areas: exemplified by the mediodorsal thalamic nucleus in schizophrenics. *APMIS. Acta pathologica, microbiologica et immunologica scandinavica*. v. 97, p. 677-681, 1989.

PICK, J., The fine structure of sympathetic neurons in x-irradiated frogs. *J Cell Biol*.v.26, p.335–351,1965.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TOSCANO, C. P., MELO. M. P., MATERA, J. M., LOESCH, A.; RIBEIRO, A. A. C. M., The developing and restructuring superior cervical ganglion of guinea pigs (*Cavia porcellus* var. *albina*.) **Int. Journal of Developmental Neuroscience**. v. 27, p. 329-336, 2009.

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

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

WARD, J. M., WEGHORST, C. M., DIWAN, B. A., KONISHI, N., LUBET, R. A., HENNEMAN, J. R, DEVOR, D. E. Evaluation of cell proliferation in the kidneys of rodents with bromodeoxyuridine immunohistochemistry or tritiated thymidine autoradiography after exposure to renal toxins, tumor promoters, and carcinogens. In: Chemically Induced Cell Proliferation: Implications for Risk Assessment. Butterworth BE, Slaga TJ, Farland W, McClain M (eds), p. 369—388, 1991.

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