SÉRGIO FELIPE DE OLIVEIRA

**“ESTUDO DA ESTRUTURA DA GLÂNDULA PINEAL
HUMANA EMPREGANDO MÉTODOS DE MICROSCOPIA
DE LUZ, MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA,
MICROSCOPIA DE VARREDURA POR ESPECTROMETRIA
DE RAIO-X E DIFRAÇÃO DE RAIO-X”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

SÃO PAULO
1998

Candidato(a): SÉRGIO FELIPE DE OLIVEIRA

Título da Dissertação: Estudo da estrutura da glândula pineal humana empregando métodos de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de varredura por espectrometria de raio-x e difração de raio-x.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de

Defesa de Mestrado, em sessão pública realizada a

...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

1) Examinador(a) _____

2) Examinador(a) _____

3) Presidente _____

SÉRGIO FELIPE DE OLIVEIRA

**“ESTUDO DA ESTRUTURA DA GLÂNDULA PINEAL
HUMANA EMPREGANDO MÉTODOS DE MICROSCOPIA
DE LUZ, MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA,
MICROSCOPIA DE VARREDURA POR ESPECTROMETRIA
DE RAIO-X E DIFRAÇÃO DE RAIO-X”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração:
ANATOMIA FUNCIONAL:
ESTRUTURA E ULTRA-ESTRUTURA
Orientador:
Prof. Dr. ESEM PEREIRA CERQUEIRA

SÃO PAULO
1998

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Oliveira, Sérgio Felipe de.

Estudo da estrutura da glândula pineal humana empregando métodos de microscopia de luz, eletrônica de varredura, microscopia de varredura por espectrometria de raio-x e difração de raio-x / Sérgio Felipe de Oliveira.-- São Paulo, 1998.

Dissertação (Mestrado)--Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Anatomia.

Orientador: Cerqueira, Esem Pereira.

Área de Concentração: Anatomia.

Linha de pesquisa: Microscopia de glândula pineal humana.

Versão do título para o inglês: A study of human pineal gland structure, using optic microscopy, scanning eletron microscopy, x-ray spectrometry scanning microscopy and x-ray diffraction.

Descritores: 1.Glândula pineal 2.Concreção calcárea 3.Pinealócito
4.Microscopia eletrônica 5.Difração de raio-x 6.Biomineralização
ICB/SBIB.052/98

DEDICATÓRIA

A Pedro e Josefa, meus bisavós

A Tanúncio e Hermínia, Antônio e Rita, meus avós

pela genealogia de minha infância de sonhos.

Ao meu pai, o Dr. Sérgio, que ensinou-me a Medicina

e o gosto pela Universidade.

À minha mãe, Vera, que ensinou-me a vida....deu-me a luz.

Ao meu irmão Ricardo, amigo, sempre.

À minha irmã Rita, ouro do meu coração.

Aos meus sobrinhos Renato e Mateus, brilhos de meus olhos.

À minha esposa, Márcia

e a meu filho querido, Pietro,

amores de minha vida

esteios de minh'alma.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Esem Pereira Cerqueira, meu orientador, pela oportunidade que me deu de estudar a glândula pineal.

Ao Prof. Dr. Ii Sei Watanabe, pela compreensão e orientação inestimáveis no trajeto deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Ferraz de Carvalho, pelo estímulo ao estudo deste empolgante tema.

À Prof.a. Dra. Irvênia de Santis Prada, pela orientação e estímulo no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Celso Ivan Conegero, pela orientação nas técnicas anatômicas, e sobretudo pela amizade.

À Dra. Marlene Rossi Severino Nobre, pelo apoio e orientação segura nas minhas posturas de vida.

Ao Sr. Francisco Cândido Xavier, pelo estímulo que me dá à prática de uma Ciência espiritualizada e humana, em prol de uma sociedade justa e fraterna.

À Márcia Fuga, minha esposa, pela datilografia e diagramação deste trabalho, e sobretudo pelo estímulo e apoio nos momentos difíceis, tornando possível a realização desta tese.

Aos Professores do Departamento de Anatomia do ICB-USP, pela gentileza e apoio com que sempre fui atendido.

Aos técnicos do ICB, senhores Boleta, Andrés, Nilson, Adevair, Wilson, e senhoras Marta e Virgínia, pelo auxílio sempre pronto.

À Carla Carvalho, pelo auxílio na secretaria do Depto. de Anatomia.

À Biblioteca do ICB-USP, em especial às bibliotecárias Sra. Marily, Sra. Carminha e Sra. Rita, pela ajuda inestimável.

À CAPES, pela bolsa de estudos.

Aos meus colegas da pós-graduação da Anatomia, Sílvia, Juçara, Maria Ivone, Bruno, Renato, Eliane, Tânia, Cíntia e ao Allan, da Veterinária, companheiros de luta na difícil tarefa de fazer Ciência.

SUMÁRIO

RESUMO

1 - INTRODUÇÃO.....	01
Anatomia.....	02
Aspectos evolutivos e morfofuncionais.....	05
Aspectos citológicos e funcionais.....	11
Métodos anatômicos de estudo da pineal.....	29
2 - PROPOSIÇÃO.....	31
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Microscopia de luz.....	35
Microscopia eletrônica de varredura.....	35
Microanálise e difração de raio-x.....	36
4 - RESULTADOS.....	39
Microscopia de luz.....	40
Microscopia eletrônica de varredura com espectrometria de raio-x por dispersão de energia (EDS).....	44
Difração de raio-x.....	46
5 - DISCUSSÃO.....	92
6 - CONCLUSÕES.....	104
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

ABSTRACT

RESUMO

Resumo

Estruturas da glândula pineal humana foram estudadas empregando os métodos de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de varredura por espectrometria de raio-x e difração de raio-x. As peças para microscopia de luz foram fixadas em solução de formalina a 10% durante 48h e incluídas em parafina.

Para a microscopia eletrônica de varredura, as peças foram fixadas em solução de Karnovsky modificada, sendo que parte das peças foram fraturadas em nitrogênio líquido para o exame das características internas do corpo pineal.

Os resultados evidenciaram que o corpo pineal apresenta formações calcáreas distribuídas no interior do tecido conjuntivo. As 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.

1. INTRODUÇÃO

Anatomia

A glândula pineal humana, segundo ERHART, E.B. (1962) e MACHADO, A.B.M. (1983), está localizada na fissura formada pelo encontro do cerebelo e dos hemisférios cerebrais, medindo aproximadamente 8 mm de extensão. Ocupa a depressão dos colículos superiores e é inferior ao esplênio do corpo caloso, sendo separado deste pela tela coróidea do terceiro ventrículo e pelas veias cerebrais nela contidas, estando envolvido pela camada inferior da tela, que então se reflete sobre o tecto. A base da pineal é posicionada anteriormente e fixada por um pedúnculo dividido anteriormente pela lâmina superior e lâmina inferior, separados pelo recesso pineal do terceiro ventrículo (GRAY'S ANATOMY, 1995); a lâmina inferior contém a comissura posterior e a lâmina superior, a comissura habenular, estruturas componentes da parte não endócrina do epitélamo. Vale ressaltar que a comissura habenular faz parte do sistema límbico, assim como todas as outras estruturas não endócrinas do epitélamo, excetuando a comissura posterior, sendo portanto relacionadas com a regulação do comportamento emocional. O recesso pineal é a área do terceiro ventrículo cerebral onde o pedúnculo da pineal se prende, sendo revestido por

células endodimárias (BINKLEY, S., 1988). A pineal juntamente com o órgão subcomissural constitui a parte endócrina do epitalamo, sendo que este, conjuntamente com o tálamo, hipotálamo e subtálamo constituem o diencéfalo. A base do diencéfalo é formada por uma camada de células endodimárias recoberta por mesênquima vascular. A combinação destes dois tecidos origina o plexo coróide do terceiro ventrículo, e a parte mais caudal da base do diencéfalo origina o corpo pineal (SANDLER, T. W., 1996).

VOLLRATH, L. (1981) propôs uma classificação baseada na forma e arranjo do corpo pineal e suas relações com o terceiro ventrículo. São distinguidos os seguintes tipos essenciais: tipo A, quando o corpo pineal está junto ao terceiro ventrículo; tipo AB quando a pineal é alongada; tipo ABC quando a maior parte da pineal está justaposta ao cerebelo; tipo C quando toda a pineal está na superfície do crânio. Caso a pineal possua duas partes, a menor é representada pela correspondente letra do alfabeto grego. A pineal humana é do tipo A.

Quanto à inervação, ARENDT, J. (1995) afirma haver evidências de que a pineal receba múltiplos sistemas de inervação, seja de origem exógena, como a inervação simpática periférica, seja direta através do sistema nervoso central, haja visto a detecção de neurotransmissores como o peptídeo

intestinal vasoativo, arginina-vasopressina, oxitocina, entre outros. Antigamente pensava-se que as projeções do sistema nervoso central iam até o pedúnculo sem atingir a pineal, passando para a comissura posterior, mas a presença dos citados neurotransmissores na glândula evidencia a inervação central. Constituindo-se no nervo do conário, único ou duplo, as fibras nervosas periféricas vêm da região da tenda do cerebelo e penetram nas faces dorsal ou dorso lateral da pineal. Estas fibras periféricas simpáticas são originadas nas células do gânglio cervical superior e correm subendotelialmente na parede do seio reto. Esta via parte da retina ocular e pela projeção retino-hipotalâmica atinge o núcleo paraventricular, sendo que este funciona como uma estação intermediária neste circuito. CIPOLLA NETO, J. (1996) esclarece que o circuito neuroanatômico responsável pelo controle do metabolismo da glândula pineal segue a seguinte seqüência: retina, via retino-hipotalâmica, núcleo supraquiasmático, núcleo paraventricular hipotalâmico, fascículo prosencefálico medial, medula espinhal torácica alta, gânglio cervical superior, nervos conários e pineal, segundo estudos feitos em roedores.

O estudo da estrutura do corpo pineal e aspectos morfofuncionais podem ser melhor esclarecidos a partir da compreensão do desenvolvimento

filogenético e ontogenético da glândula pineal, assim como de características citológicas.

Aspectos evolutivos e morfofuncionais

ROMER, A.S. & PARSONS, T.S. (1977) descrevem a anatomia do epitálamo, em vertebrados inferiores. O teto do terceiro ventrículo é fino em sua maior parte e é uma estrutura não nervosa. Nele desenvolve-se a paráfise, um saco de paredes finas, presente no embrião e ausente no adulto na maioria dos casos, cuja função, do que é conhecido, está ligada à estocagem de glicogênio, que é enviado ao líquido céfalo-raquidiano. Adjacente à paráfise está a região do plexo coróideo anterior, situado na parte anterior do teto do diencéfalo. Mais para trás, no teto do diencéfalo podem desenvolver-se uma ou duas estruturas medianas pedunculadas, semelhantes a olhos, os órgãos parietal e pineal. Estas estruturas vão formar o olho mediano. Este parece que não é formado sempre a partir da mesma estrutura, mas pode desenvolver-se tanto do órgão parietal (ou órgão parapineal) como do órgão pineal. Ambos podem estar presentes no mesmo animal e, embora adjacentes, são imediatamente distinguíveis pela fixação de seus pedúnculos. Encontramos olhos medianos bem desenvolvidos somente nas lampréias e alguns lagartos;

situados sob a pele, eles podem fazer um pouco mais do que detectar a presença ou ausência de luz, apresentando uma diminuta córnea, cristalino e retina. Estes desapareceram na filogênese, estando ausentes na maioria dos peixes, nos modernos anfíbios, na maior parte dos répteis, em todas as aves e mamíferos. Apesar da perda de função do olho mediano, o órgão pineal persiste nos vertebrados superiores como uma estrutura glandular. No entanto, em alguns vertebrados, como nos tubarões e nas rãs, a pineal embora não se abra na superfície, contém células e ainda atua como um fotoreceptor. Isso já não mais ocorre nos mamíferos.

KAPPERS, J.A. (1971) estuda aspectos evolutivos do órgão pineal. Em peixes e anfíbios o desenvolvimento e estrutura da pineal é , em princípio, semelhante à retina dos olhos, embora com diferenças. Possui células ciliadas, de características neurosensoriais, fotoreceptoras, outros tipos de células nervosas, também sensoriais e tecido conectivo. Em répteis, lacertídeos e tartarugas há uma transformação evolutiva do órgão pineal, com decréscimo da atividade fotoreceptora e neurosensorial, como demonstram experimentos de eletrofisiologia assim como desorganização ou desintegração do tecido neurosensorial. Em aves, apesar de muitas espécies de pássaros que ainda apresentam uma rudimentar função fotossensória da pineal, os pólos

fotoreceptores das células principais já estão ausentes. Vale ressaltar, no entanto, que a pineal de aves exerce um papel nos efeitos da luz no sistema reprodutor. Vamos ter, na pineal de aves, uma inervação por fibras noradrenérgicas, à semelhança do que vamos observar e em roedores e mamíferos. Em mamíferos, o órgão pineal não mostra vestígios dos aspectos fotossensoriais, embora remanescentes do aparato ciliar possam eventualmente estar presente, sendo constituído por células específicas, os pinealócitos. Analisando aspectos morfológicos da pineal humana, ERHART, E. A. (1962), esclarece ser a pineal parte integrante do epítalamo. Há uma variação considerável de um indivíduo para outro, e afirma-se mesmo, “que não existem duas pineais iguais”. Rica em vasos sanguíneos, é constituída essencialmente por elementos neuro-ectodérmicos, por células da glia e por elementos parenquimatosos diversos. Ressalta a presença, principalmente em indivíduos adultos, das concreções calcáreas denominadas acervuli (areia cerebral). CAJAL, S. R. (1995) conclui que o desenvolvimento massivo dos plexos nervosos da pineal humana, advindos do gânglio cervical superior “indica inequivocamente que a epífise é pura e simplesmente um órgão endócrino”. A glândula pineal é hoje aceita como uma glândula endócrina regulatória da maior importância, modificando a atividade da adenohipófise, neurohipófise, pâncreas

endócrino, paratireóide, córtex e medula adrenal e gônadas (DE VRIES, R. A. C. & KAPPERS, J. A., 1971).

GREENSTEIN, B. (1994) ressalta que as funções atualmente estudadas, na qual a pineal está envolvida inclui : efeito antigonadotrófico, mudanças próprias da puberdade, relógio biológico, efeitos de “jet-lag”, escurecimento da pele e variações orgânicas sazonais. VOLLRATH, L. (1981) considera que, o fato do cérebro ser o maior alvo de atuação das substâncias produzidas pela pineal, deve haver uma ligação vascular direta entre a epífise e o cérebro. Um experimento com injeção de corante índia ink em ratos, demonstrou que a única ligação vascular entre a pineal e o cérebro é via plexo coróide de ambos os recessos suprapineais e o terceiro ventrículo via veia cerebral magna. Este fato requer uma reversão de fluxo, o que é aparentemente incomum na região da veia cerebral magna. Assim, as secreções da pineal alcançam as células alvo via líquido céfalo-raquidiano (SHERIDAN, M. N. et al., 1969; KNIGHT, B. K. et al., 1973) ou pela circulação sangüínea. No entanto KAPPERS, J.A. (1974) esclarece que o recesso pineal é coberto por uma camada de células endimárias. Entre a camada endimária do recesso e o parênquima da face dorsal do órgão existe a pia mater. Evidentemente, ressalta o autor, produtos do parênquima da pineal não alcançam diretamente o

líquido céfalo raquidiano que banha o recesso pineal. GARTNER, L.P. & HIATT, J.L. (1994) sintetiza aspectos estruturais da glândula pineal humana. O tecido conectivo que recobre o corpo pineal é pia-máter, a qual envia trabéculas e septos para dentro do parênquima pineal, subdividindo-o em lóbulos incompletos. Vasos sangüíneos suprem e drenam elementos do tecido conectivo do corpo pineal. Os principais elementos celulares são pinealócitos e células da glia. Os espaços intercelulares da pineal contém grânulos calcificados, material conhecido como areia cerebral ou corpora arenacea, “cujo significado é desconhecido, ressaltam os autores. A pineal tem um rico suprimento sangüíneo, sendo que sua irrigação é derivada da artéria cerebral posterior, que origina as artérias coroidais médio posteriores direita e esquerda e as artérias pineais. Estas ramificações suprem capilares fenestrados. Os capilares drenam em numerosas veias que desembocam na veia cerebral interna ou na veia cerebral magna (YAMAMOTO, I. & KAGEGAWA, N., 1980). Quanto à inervação, vindo do gânglio cervical superior, fibras nervosas autonômicas pós ganglionares, adentram a glândula pineal em associação com artérias que a suprem, ou pelo nervo do conário, ou ainda, pela leptomeninge da superfície da pineal. As fibras nervosas terminam nos espaços perivasculares entre os pinealócitos ou fazem sinapses com estes. Outras fibras

nervosas localizadas no pedúnculo podem ser originadas do núcleo da habênula. Os pinealócitos formam o parênquima da pineal; estendendo-se de cada corpo celular, que podem ter núcleos esféricos, ovais ou lobulados, há um ou mais processos basofílicos, tortuosos, contendo microtúbulos (KNIGHT, B. K. et al., 1973). Estes processos terminam em botões próximos a capilares, ou menos freqüentemente em células endimárias do recesso pineal. Estes botões terminais contêm retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e vesículas elétricas densas, que estocam monoaminas e hormônios polipeptídicos, cuja secreção parece depender de inervação simpática. Estes elementos são secretados por exocitose, conjuntamente com fragmentos de membranas de vesículas. Estas membranas exocitadas formariam complexos com o cálcio, cuja deposição concêntrica ao redor dos fragmentos destas membranas formariam as conhecidas concreções calcáreas da pineal.

ARMSTRONG, S.M. & REDMAN, J.R. (1993) afirmam ser a glândula pineal uma das três áreas anatômicas de localização do sistema circadiano nos vertebrados; assim sendo, temos a pineal, as retinas oculares e o núcleo supraquiasmático. A melatonina é o hormônio efetor do ritmo na organização temporal do corpo, sendo importante para a manutenção dos ritmos infradianos, circadianos e ultradianos, esclarecem os autores.

ZUBAY, G. L. et al. (1995) acentua que a melatonina, hormônio produzido pela pineal, cuja estrutura química é N-Acetil-5-Metoxitriptamina, tem a função de regulação dos ritmos circadianos.

No âmbito médico, ROBBINS, S. L. et al. (1994) acentua que as lesões clinicamente significativas de pineal são raras, consistindo quase que exclusivamente de tumores. LEWY, A. J. (1996), ressalta que a pineal está fora da barreira hemato-encefálica. Assim, a produção de melatonina pela pineal humana é deprimida por beta bloqueadores e alfa- 2 agonistas. Neurônios pós ganglionares do gânglio cervical superior, noradrenérgicos, estimulam receptores beta-1adrenérgicos dos pinealócitos. Isto resulta em síntese e secreção de melatonina no líquido céfalo-raquidiano e na circulação venosa.

Aspectos citológicos e funcionais

KAPPERS, J. A. (1971) ressalta que em pinealócitos adultos botões sinápticos são observados, lembrando o primitivo aparato ciliar. Pinealócitos não são neurônios verdadeiros, sendo que as características da pineal são típicas de um órgão endócrino. De acordo com o autor a pineal mostra sinais de funcionamento precocemente na vida pré natal, devido à endimosecreção no sistema ventricular. As células comissurais aparecem a

partir de células endimárias constituindo o lobo posterior da pineal. A produção secretória destas células é jogada na circulação sangüínea e não no terceiro ventrículo. A camada endimária prolifera e forma pseudofolículos, cuja luz não tem comunicação com o ventrículo cerebral. Estes folículos desaparecem em estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário.

Durante o desenvolvimento embrionário o corpo pineal é invadido por tecido conjuntivo derivado da pia- máter que forma a cápsula do órgão e penetra no seu interior formando septos. A estrutura da pineal é, pois, complexa devido à existência de elementos mesodérmicos derivados da pia- máter e elementos derivados do epêndima, ou seja, neuroectodérmicos. Diversos autores atribuem um envolvimento complexo de todas estas estruturas, parenquimatosas e de tecido conectivo, na gênese das concreções calcáreas da pineal.

KITAY, J. & ALTSCHULE, M. (1954) apud BINKLEY, S. (1988) consideram que a ocorrência de calcificação em pineal humana segue a seguinte proporção: desprezível no primeiro ano de vida; cerca de 25% na segunda década, havendo um incremento gradual da terceira para a oitava década de vida. Também colocam estes autores que nenhuma relação está

estabelecida entre a ocorrência de calcificação e estágios funcionais da glândula pineal humana.

ANGERVALL, L. et al. (1958) identificaram como hidroxiapatita a fase mineral presente na glândula pineal, num estudo com difração de raio-x. Estes autores fizeram um estudo difratográfico comparativo de diversos processos de calcificação, abrangendo esmalte e cimento dentário, calcificações tumorais intracranianas, calcificações arteriais e de linfonodos, além das concreções calcárias em pineal humana. Observou-se um grau de cristalinidade menor em pineal e outros tecidos, comparativamente ao esmalte e cimento dentários, apesar da mesma composição de hidroxiapatita. O que faz a diferença nestes casos é o arranjo cristalino.

EARLE, K. M. (1965) observou que as concreções calcárias em pineal são constituídas por agregação de pequenos cristais em forma de agulha, evidenciando por difração de raio-x que a constituição destes é característico dos padrões de hidroxiapatita.

MABIE, C. T. & WALLACE, B. M. (1974) estudaram as calcificações em pineal humana por diversos métodos, quais sejam, a microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, difração de raio-x, e análises químicas, corroborando os achados que

evidenciam a composição de hidroxiapatita das concreções calcáreas da pineal, demonstrando as características camadas concêntricas, observáveis também à microscopia óptica. O autor demonstra que as concreções podem ser mononucleadas ou multinucleadas, sendo que em humanos são mais comumente multinucleadas.

JAPHA, J. L. et al. (1976) estudaram calcificações em superfície de glândula pineal de gerbil (*Meriones unguiculatus*), observando que há similaridades no processo de calcificação neste animal e na pineal humana, sugerindo que o gerbil possa ser o modelo experimental ideal para estudos do fenômeno de calcificação da pineal. Estes autores observam que as inclusões calcáreas localizam-se nas porções superficiais da pineal, estando ausentes na pineal profunda. Estudando a composição orgânica das concreções da pineal de gerbil, demonstraram a presença de carboidratos, pela reação PAS-positivo, assim como a proteínas, pela digestão por tripsina. As reações com alcian blue, neste trabalho indicaram que a estrutura de carboidrato é um ácido mucopolissacarídeo. A presença de lípides na matriz orgânica das concreções foi demonstrada pelo método de sudan black. JAPHA, J. L. et al. (1976) ressaltam interessantes resultados que indicam o envolvimento da glândula pineal no metabolismo de cálcio (MENIGOT, M. et al., 1970) e podendo ter

relação funcional com a glândula paratireóide (KISS, J. et al., 1969; REITER, R. J. et al., 1973).

MOLLER, M. et al., (1979) estudaram calcificações em tumores de pineal humana, utilizando técnicas de microscopia eletrônica e difração de raio-x, evidenciando que estes tipos de calcificação são de padrão amorfo, diferindo da calcificação normal presente nas calcosferitas de pineal, que caracterizam-se pelo padrão de arranjo cristalino da hidroxiapatita.

BINKLEY, S. (1988) ressalta que a estrutura da pineal humana é caracterizada pela presença de muitas inclusões calcárias. Em importante publicação, este autor acentua aspectos relevantes: quanto ao desenvolvimento de concreções calcárias, há relatos da presença destas estruturas já dos 1 a 3 anos de idade, sendo que é alta a incidência em humanos; as concreções têm um formato curioso de amora e são compostas por hidroxiapatita e traços de elementos como magnésio e estrôncio, comparável à composição do esmalte dentário; o grau de calcificação da pineal aumenta com a idade.

SCHMID, H. A. & RAYKHTSAUM, G. (1995) realizaram importante trabalho com pineais humanas de homens de idades de 14, 47, 62, 82 anos, procurando relacionar alterações estruturais das concreções calcárias

de pineal com o envelhecimento. Utilizaram Microscopia eletrônica de varredura e espectrometria de raio-x. Baseados em cortes seriados de uma mesma concreção, com intervalos de 20 micrômetros e utilizando reconstrução estereológica, ficou evidenciada a estrutura de lamelas concêntricas em forma de anéis. O número de lamelas concêntricas aumenta com a idade. Gradualmente, conforme aumenta o número de lamelas, estas se tornam mais estreitas e tendem a sofrer ondulações que dão um aspecto de zig-zag. Evidenciam-se diversas formas evolutivas, a começar por concreções de morfologia esférica, evoluindo até a forma de amora, devido à agregação de unidades, com proporções que vão de 30 a 100 micrômetros. Tais resultados são discutidos no trabalho quanto suas implicações funcionais, dentre as quais ressaltamos alguns aspectos discutidos por estes autores.

A estrutura orgânica das concreções da pineal contém índoles, proteoglicanas e glicoproteínas (PALLADINI, G. et al., 1965; LUKASZYK, A. & REITER, R. J., 1975) assim como carboidratos e ácidos mucopolissacarídeos (JAPHA, J. L. et al., 1976). Este fato, tomado juntamente com a composição predominante de cálcio-hidroxiapatita (ANGERVALL, L. et al., 1958; EARLE, K. N., 1965; KRSTIC, R., 1986), aponta para uma relação

patológica ou fisiológica entre a biossíntese de melatonina, as etapas bioquímicas cálcio dependentes (MORTON, D. J. & REITER, R. J., 1991) e o estroma matricial da glândula pineal. A biomineralização é a manifestação físico-química da programação genética do envelhecimento do tecido pineal humano (KLOEDEN, P. E., 1990). Muitos sustentam que a mineralização reflete o envelhecimento e alterações sequelares de processos patológicos. (SCHMID, H. A. & RAYKHTSAUM, G. (1995), baseados em resultados experimentais que demonstram alterações na composição de cálcio e fósforo, dentro de uma mesma concreção, assim como variações características conforme a idade, coloca que estas mudanças representam processos de remodelação da estrutura mineralógica dentro da mesma calcificação ao longo da vida. Sustentam estes autores, que a calcificação da pineal é uma expressão da distrofia celular e está primária ou secundariamente associada ao processo de envelhecimento. O arranjo molecular envolvido com a biomineralização tem sido estudado em várias estruturas (conchas, dentina, ossos). A mineralização inicia-se intracelularmente a partir de vesículas de gordura guiada e influenciada pelo citoesqueleto, assim como, extracelularmente pelas fibras colágenas. Estas estruturas organizam a fase inorgânica numa geometria

precisa- lamelar, colunar ou reticular; no entanto muitos passos destas construções são ainda desconhecidos (MANN, S., 1993).

Distrofia de células da pineal secundárias à deposição de cálcio nunca foi diretamente demonstrado. Observação de um incremento das concreções em vacúolos de pinealócios de gerbil sugerem fortemente que células em estado hipersecretório precedem transformações distróficas (JAPHA, L. et al., 1976; LUKASZYK, A. & REITER, R. J., 1975; WELSH, M. G. & REITER, R. J., 1978). A formação das concreções calcáreas deve se dar secundariamente a estados celulares hipersecretórios, considerando-se que a porção orgânica das concreções contém índoles. O núcleo inorgânico de carbonato de cálcio e hidroxiapatita é semelhante à dentina nas proporções cristalinas e nos padrões de difração de raio-x. Considerando as múltiplas similaridades entre as concreções da pineal e a dentina, ossos, esmalte (BOCCHI, G. & VALDRE, G., 1993), o autor é levado a concluir que as concreções são um produto fisiológico e não patológico. Muitos processos de biomineralização , possivelmente, são engendrados por distrofia celular e produtos de pedaços de membranas, que servem como estrutura para a cristalização (WUTHIER, R. E., 1973; BOSKEY, A., 1989). A distrofia celular, por outro lado, não é o único mecanismo pelo qual os núcleos de

mineração são formados. Este processo pode ocorrer pela interação eletrostática, estrutural e estereoquímica dada uma interface orgânica-inorgânica. Como estudado na natureza a biomineralização lamelar é universalmente observada por deposições episódicas sobre uma matriz polimérica extracelular (frequentemente fibras colágenas) que servem como faces hidrofóbicas onde proteínas ácidas são agregadas. A mineralização ocorre na interface entre proteínas ácidas e o ambiente aquoso (MANN, S., 1993). A deposição sequencial de matéria orgânica e inorgânica cria a aparência de bandas claras e escuras, lamelas ou crescentes. Devido ao fato da mineralização ocorrer por aposição entende-se a sucessão de estágios do globular para as formas em amorfa. Assim, corroborando essa progressão, observa-se um grande número de formas globulares em espécime de uma amostra de um adolescente de catorze anos com uma mínima quantidade de estratificação e formação ativa de cristais. SCHMID, H. A. & RAYKHTSAUM, G. (1995) observam que a relação cálcio-fósforo é menor nas camadas intermediárias entre o centro e a periferia. Esta mesma relação é mais elevada em posições que se distanciam do centro, da concreção, e isto pode estar ligado ao fato de que os cristais são construídos dentro de formas supramoleculares das hélices da fibras colágenas e que o crescimento do cristal

é anisotrópico. Esta combinação de formas pode resultar num crescimento em espiral. Isto é corroborado pelos achados dos autores em que os núcleos de cristalização ocorrem num centro ao mesmo tempo que na periferia, sugerindo a formação em espiral. Observa-se uma relação maior de cálcio-fósforo em idoso em comparação com espécime jovem. Este dado somado ao fato de que as camadas de uma concreção tornam-se mais estreitas com a idade, sugerem uma repetitiva aposição com um constante remodelar ou reconstrução de todas as camadas. A observação de calcificações precoces em muitas crianças, assim como pouca calcificação em indivíduos velhos como demonstrados por alguns histologistas, como (HEIDEL, G., 1965; SCHARENBERG, K. & LISS, L., 1965; WILDI, E. & FRAUCHINGER, E., 1965; TAPP, E. & HUXLEY, M., 1972; GALLIANI, I. et al., 1989) pode ser explicado pelo fato do cálcio contido nas deposições pode aumentar sem se tornar extensivamente visível.

SCHMID, H. A. & RAYKHTSAUM, G. (1995) enfatizam que não há uma correlação positiva entre envelhecimento e depósito de cálcio na pineal (COMMENTZ, J. C. et al., 1986; BOJKOWSKY, C. J. & ARENDT, J., 1990), nem tampouco a relação inversa entre níveis de calcificação e produção de melatonina. A teoria do envelhecimento e falência da pineal está sendo mudada pela observação de que pinealócitos obtidos de humanos de todas as

idades são capazes de sintetizar melatonina em iguais níveis *in vitro*, quando apropriado substrato é fornecido. Similarmente estudos pós-mortem de pineais humanas não revelaram mudanças nas enzimas necessárias para a síntese de melatonina. A mais importante evidência explicativa para a atenuação da produção de melatonina relacionada ao envelhecimento, diz respeito a alterações ligadas ao avanço da idade, em receptores beta adrenérgicos. O cálcio tem importante papel no metabolismo da melatonina, de tal sorte que distúrbios neste sistema poderiam acarretar a deposição cálcica. Os autores hipotizam que o pinealócito poderia chegar a uma exaustão (distrofia), de tal modo que a regulação de cálcio poderia se desorganizar, semelhantemente ao que ocorre no envelhecimento celular. Poderia então haver uma precipitação juntamente com ésteres fosfatos sempre presentes nos pinealócitos, comprometendo a biossíntese de melatonina.

HUMBERT, W. & PÉVET, P. (1995) estudaram glândula pineal de ratos envelhecidos, enfocando a localização intracelular de cálcio e a variação do número de pinealócitos. Descrevemos a seguir, alguns aspectos dos resultados obtidos e tópicos importantes discutidos pelos autores. A glândula pineal de ratos é constituída de células parenquimatosas, pinealócitos claros e escuros e células da glia. Os resultados da análise por microscopia eletrônica

de transmissão demonstraram um relativo decréscimo de 12% no número de pinealócitos de ratos envelhecidos (células claras e escuras). Uma análise detalhada mostrou um decréscimo de 30% de pinealócitos claros típicos, conhecidos por serem pinealócitos funcionais, assim como um aumento de 140% de pinealócitos escuros observados no grupo de ratos velhos (28 meses) em comparação com o grupo de ratos novos (3 meses). A demonstração da presença de cálcio é feita por método citoquímico. Assim, os dois tipos de pinealócitos podem ser distinguidos com base na distribuição e concentração de cálcio. Pinealócitos claros são caracterizados por poucos precipitados, localizados principalmente nas mitocôndrias, na forma de grânulos intramitocondriais. Pinealócitos escuros, ao contrário, são caracterizados por numerosos precipitados, espalhados pelo citoplasma, assim como em mitocôndrias, retículo endoplasmático, grânulos de lipofucsina e concentrados de lipídios. Partículas eletrondensas formam redes (clusters) na matriz mitocondrial, depósitos intranucleares de cálcio, caracterizando sinais de degeneração dos pinealócitos. A microanálise por raio-x demonstrou que os precipitados, principalmente presentes nos pinealócitos escuros, contém cálcio. A presença de cálcio é demonstrada pelo método de potássio-piroantimoniato (KLEIN, C. et al., 1972).

O estudo confirma através de microanálise por raio-x, que potássio é substituído por uma forma de complexo cálcio-piroantimoniato (TANDLER, C. J. et al., 1970; SIMSON, I. A. V. & SPICER, S. S., 1975; CHANDLER, J. A., 1977; BOWEN, I. D. & RYDER, T. A., 1978). Assim, com os resultados microanalíticos obtidos, os autores consideraram que os precipitados encontrados no tecido pineal eram de cálcio-antimoniato, indicando alta probabilidade de localização intracelular do cálcio. Precipitados de antimoniatos tem sido descritos em pinealócitos escuros, especialmente em mitocôndrias degeneradas, dropletos de lipídios, lipopigmentos, núcleo, e concreções em crescimento, enquanto são menos freqüentes em pinealócitos claros, onde os precipitados localizam-se nas membranas celulares, como descrito acima. A presença de concreções em pinealócitos escuros fala a favor da formação de concreções a partir destes, numa ambiência rica em cálcio. A evidência que há pouco precipitado de antimoniato em pinealócitos claros em comparação aos escuros (PIZZARO, M. D. L. et al., 1989), fala a favor de que a membrana celular se torna enfraquecida, permitindo uma entrada em larga monta de cálcio na célula. Vesículas ricas em cálcio e vacúolos derivados de mitocôndrias presentes quase que exclusivamente durante a fase escura parecem ser sítios primários de mineralização, enquanto que a localização

citoplasmática do cálcio ocorre somente durante a fase clara. Os autores, analisando pineal de ratos em ultraestrutura e microanálise, procuram entender o processo de biogênese das concreções. Os autores colocam, na introdução do trabalho, que as concreções calcáreas em mamíferos são especialmente encontradas em gerbil e humanos. Segundo os autores, ainda que a via intracelular seja o modo clássico de biomineralização, a rota extracelular parece ser uma via alternativa. HUMBERT, W. & PÉVET, P. (1995) referem que, de acordo com seus resultados, nos estudos em ratos, que material resultante da degeneração celular e produtos secretórios proteináceos podem iniciar a formação de concreções pelo fato das mitocôndrias e retículo endoplasmático estarem sendo considerados sítios da regulação de cálcio, devido a grande concentração de cálcio e fósforo presentes na mitocôndria durante a mineralização (WALZ, B., 1982; SOMLYO, A. P., 1984; ALBERTS, B. et al., 1983). Consideram assim, a possibilidade de ser esta primeira fase da formação de hidroxiapatita. Também os autores observaram vesículas e vacúolos originados do retículo endoplasmático, as quais têm a mesma capacidade de concentrar cálcio e fósforo, evidenciando por microanálise por raio-x. Afirmam portanto que o retículo endoplasmático tem também importante função na gênese das concreções. Igualmente, fibras

colágenas podem servir de sítios de precipitação de cristais de hidroxiapatita e portanto iniciadores de mineralização. WUTHIER, R. E. (1973) em importante revisão coloca que há duas escolas de pensamento estudando como o processo de mineralização é induzido durante a calcificação de tecidos. Há a visão de que a mineralização é iniciada por núcleos heterogêneos de colágeno, isoladamente como nos estudos dos autores GLIMCHER, M. J. (1959); GLIMCHER, M. J. & KRANE, S. M. (1968); NEUMAN, W.F. (1980), ou em combinação com várias proteínas com as quais o colágeno se associa conforme estudaram os pesquisadores ANDREWS, A.T. et al. (1967); HAUSCHKA, P.V. et al. (1975); LINDE, A. et al. (1980); PRICE, P. A. et al. (1976); TERMINE, J.D. (1981); VEIS, A. et al. (1981). Há também a visão de que a mineralização é um processo diretamente mediado por células no qual as mitocôndrias e vesículas matriciais servem como sítios do processo de calcificação. Estudaram as mitocôndrias nesse processo os pesquisadores BRIGHTON, C.T. & HUNT, R.M. (1976, 1978); MARTIN, J.H. & MATTHEWS, J.L. (1970, 1971); SHAPIRO, I.M. & GREENSPAN, J.S. (1969), e as vesículas matriciais (ANDERSON, H.C., 1969; BAB, I. et al., 1979; BERNARD, G.W., 1972; BONUCCI, E., 1971; EISENMAN, D. R. & GLICK, P.L., 1972; SAYEGH, F.S. et al., 1974) .

CIPOLLA NETO, J. (1996) estudando o metabolismo da pineal em roedores resalta o envolvimento de influxo intracelular de cálcio. O autor afirma que a ativação dos receptores alfa 1, em ratos, promove um aumento do cálcio intracelular, dependente tanto de um aumento do influxo de cálcio, quanto da liberação de cálcio de estoques intracelulares. Há dados mostrando um papel potenciador do complexo cálcio-calmodulina na ativação da enzima adenilatociclase, fato que poderia estar ocorrendo também na glândula pineal. O cálcio parece exercer um papel importante nos processos de transcrição e tradução gênicas e síntese da própria N-acetiltransferase.

ARENDT, J. (1995) explica que o primeiro passo para a formação da melatonina é o aporte de triptofano da dieta. A absorção de triptofano pelo cérebro é dependente dos mecanismos de transporte através da barreira hemato-encefálica. O triptofano é transformado em 5-hidroxitriptofano pela triptofano-5-hidroxilase, uma enzima mitocondrial. Ocorre a descarboxilação do 5-hidroxitriptofano, originando a serotonina, pela enzima citoplasmática aminoácido descarboxilase aromático. Esta enzima é largamente distribuída nos tecidos e é essencial para a síntese de neurotransmissores catecolamínicos. A enzima N-acetil transferase (NAT) promove a N-acetilação da serotonina. A NAT está presente no citoplasma do penealócito e também na retina

(arilalquilamina N-acetil transferase), apresentando propriedades específicas, distintas de sua atuação em outros tecidos. O passo final é a O-metilação da N-acetil serotonina, pela hidroxiindol-O-metiltransferase (HIOMT), originando a melatonina. A variação da serotonina na pineal durante o dia, assim como os níveis de HIOMT demonstram a primeira evidência da atividade rítmica metabólica da pineal, com incremento da atividade desta enzima no período da noite e supressão durante o dia. Estes fatores fundamentam o conceito de que a pineal é um transdutor fotoneuroendócrino.

YAMADA, N. et al. (1996) estudaram radiologicamente calcificações cerebrais através de ressonância nuclear magnética, utilizando GRE (gradient-recalled echo). O objetivo era promover um modelo para diferenciação radiológica entre hematomas e calcificações cerebrais. Assim, detectou em 13 pacientes com calcificações em pineal e plexo coriárioide (dentre outros resultados referentes a outras áreas cerebrais, em mais ampla casuística), que estas calcificações têm características diamagnéticas mais acentuadas que a água e o tecido cerebral. Estas características ligadas a campos magnéticos foram estudadas por SEMM, P. et al. (1980) , no que diz respeito aos efeitos do campo magnético terrestre e a atividade elétrica de células da glândula pineal . Os pesquisadores concluem que a atividade é deprimida pela aplicação

de uma força magnética, e restaurada quando a força é revertida. Observam também que outras estruturas cerebrais (colículos superior e inferior, corpo caloso e epitálamo) em idênticas condições experimentais, não tiveram reação alguma à aplicação de força magnética, em experiências realizadas em guinea pig. Ressaltam ainda que o sistema nervoso simpático também sofre influências de campos magnéticos, assim o efeito na pineal poderia ser indireto. REITER, R. J. (1991) em interessante estudo sobre o assunto, conclui que campos magnéticos e elétricos alteram o metabolismo de indolamina na pineal, mas tais alterações também poderiam vir por vias indiretas.

A glândula pineal e seu principal hormônio, a melatonina, implicado na regulação dos ciclos biológicos, tem importância fundamental em medicina, seja na compreensão do ciclo reprodutivo, na farmacologia e compreensão da ritmicidade de atuação de medicamentos no organismo, os ciclos hormonais e as alterações psiquiátricas decorrentes de distúrbios dos ritmos biológicos, como a insônia e a depressão. Em Interessante estudo de 26 casos de pacientes com síndrome de Down, por ARAI, Y. et al. (1995), procura-se ligar a presença de calcificações intracranianas (inclusive pineal e plexo coriódio) com sintoma de envelhecimento. SANDYK, R. (1993) busca relacionar calcificação da pineal e esquizofrenia crônica. Seus achados sugerem

que tanto danos diencefálicos como calcificação da glândula pineal podem estar relacionados com desorganização do pensamento na esquizofrenia, assim como com um prognóstico desfavorável.

Métodos anatômicos de estudo da Pineal

BINKLEY, S. (1988) ressalta que a pineal pode ser estudada pela microscopia de luz utilizando técnicas histológicas convencionais. Após preparo e fixação em formalina, solução de Boin ou glutaraldeído; em bebição em parafina, secção com micrótomo ou ultramicrotomo e coloração, por exemplo, com hematoxilina-eosina. Muitas pineais são pequenas e requerem algumas mudanças técnicas no preparo. Também, as concreções podem dificultar os cortes ao micrótomo. Quanto à microscopia eletrônica BINKLEY, S. (1988) ressalta a importância da varredura na análise da anatomia da superfície, estudo da vasculatura e concreções da glândula pineal. GOLDSTEIN, J. I. et al. (1992) explicam que além da possibilidade da análise tridimensional, com efeitos de contrastes dados por elétrons secundários ou retroespalhados, a microscopia eletrônica de varredura pode estar acoplada ao espectômetro de raio-x por dispersão de energia (EDS), possibilitando a

microanálise quantitativa de elementos minerais, como é o caso das concreções da pineal.

Estes estudos nos induzem à necessidade de pesquisas, dada as possibilidades de aplicação médica, para uma melhor compreensão do padrão evolutivo da formação das concreções, o envolvimento celular, localização das concreções na pineal, natureza química e estrutural e estudo do padrão de cristalinidade do material, na glândula pineal humana.

2. PROPOSIÇÃO

Proposição:

Em face dos dados encontrados na literatura consultada, propomos analisar:

1. Os aspectos histológicos do corpo pineal empregando a coloração de hematoxilina-eosina.
2. Os aspectos tridimensionais do corpo pineal empregando vários métodos em microscopia eletrônica de varredura.
3. Os aspectos obtidos em microscopia de varredura por emissão de raio-x e difração de raio-x.

3. MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

O material consiste de 8 pineais de cadáveres humanos coletadas junto ao Serviço de Verificação de Óbito da Faculdade de Medicina da USP.

Este material foi distribuído da seguinte forma: 2 pineais humanas sem identificação foram utilizadas em microscopia de luz; 2 pineais para microscopia eletrônica de varredura, sendo que a segunda amostra é de cadáver humano com idade de 61 anos, masculino, branco, com causa mortis por tromboembolismo pulmonar tendo como patologia de base neoplasia de pulmão (foi utilizado também o plexo coriódio adjacente a esta glândula, para microscopia eletrônica de varredura); 2 pineais para EDS, sendo a primeira de cadáver humano com idade de 80 anos, feminino, branco, com causa mortis de infarto agudo do miocárdio e a segunda com idade de 59 anos, feminino, parda, com causa mortis por insuficiência respiratória; 2 pineais para difração de raio-x, a primeira correspondente a 31 anos, masculino, branco, com causa mortis de infarto hemorrágico do tronco cerebral, tendo como patologia de base

hipertensão arterial sistêmica, sendo a segunda amostra de 28 anos, masculino, sem especificação de cor, com causa mortis de infarto agudo do miocárdio.

1- MICROSCOPIA DE LUZ:

Após a retirada do encéfalo 2 glândulas pineais foram coletadas e fixadas em solução de formalina a 10% por período de 48 horas. Em seguida as peças foram lavadas em água corrente, desidratadas em série crescente de álcoois e submetidas a tratamento de rotina para inclusão em parafina e realização dos cortes histológicos.

Foram realizados cortes de 07 μ m que foram corados pelo método de Hematoxilina-Eosina. As lâminas foram observadas em microscópio Olympus do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As lâminas selecionadas para documentação foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss do Departamento de Anatomia do ICB/USP.

2 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após a retirada do encéfalo, 2 glândulas pineais foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky modificada, durante 24 horas. Após esta fase

o material foi lavado em solução tampão fosfato de sódio, 0,1 M (ph 7,2) sendo colocado posteriormente em solução de ácido tânico 2% durante 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida o material foi lavado em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (ph 7,2) e pós fixado em tetróxido de ósmio durante 2 horas a 4 oC. A desidratação foi realizada em série ascendente de álcoois e a secagem foi feita em aparelho de ponto crítico Balzers, CPD-030, utilizando CO2 líquido. As peças foram montadas em bases metálicas e cobertas com ouro em aparelho Iom Sputter Balzer - SCD- 040 e posteriormente analisadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol, JSM- 6100 do ICB-USP. Parte do material, após fixação, foi colocado em nitrogênio líquido e fraturado para evidenciação das concreções calcáreas. Em seguida foi empregada a mesma metodologia acima mencionada para observação ao microscópio eletrônico de Varredura.

3 - MICROANÁLISE E DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Para análise dos cristais 2 glândulas pineais foram digeridas em solução de NaOH a 10% durante 24 horas. Em seguida o material foi lavado em água destilada durante 72 horas para completa liberação das concreções.

Após o isolamento dos cristais, os mesmos passaram por um processo de secagem à temperatura ambiente.

Para o preparo das concreções, para visualização e microanálise ao microscópio de varredura por espectroscopia de raio-x, foi providenciado o polimento do material, realizado por equipe técnica da Faculdade de Geologia da USP. A seção polida consistiu de impregnação do material em resina epox com posterior polimento do mesmo com pastas de diamante em quatro seções . A primeira com pasta de partículas de diamante com 15 micrômetros de diâmetro. Depois progressivamente com pastas mais finas até partículas de diamante com 1 micrômetro de diâmetro.

As concreções polidas são analisadas em dois aparelhos acoplados:

a. Microscópio Eletrônico de Varredura por Elétrons Retroespalhados - Microscópio marca Leica - modelo S 440 do Laboratório de Tecnologia da Escola Politécnica da USP - Engenharia de Minas. Para esta análise as lâminas com cristais polidos são recobertas com finas camadas de carbono, por evaporação de carbono.

b. Microanálise - Espectrômetro de Raio X por dispersão de energia (EDS). Este aparelho é acoplado ao Microscópio Eletrônico de Varredura por Elétrons

Retroespalhados permitindo a análise da composição química do material. Para estudo da cristalinidade do material assim como caracterização do material, foi utilizado um Difratorômetro de Raio X Marca Phillips MPD 1880 - PW 1710 com tubo de cobre (gerador de Raio X). O material foi prensado com êmbolo manual para minimizar problemas de orientação preferencial, permitindo com que os planos dos cristais fiquem aleatórios, utilizando a fidelidade dos resultados. A amostra, para este procedimento, foi montada sobre uma lâmina de vidro circular com 2,5 cm de diâmetro e fixada com cola de estrutura amorfa (não interfere nos resultados da difração).

4. RESULTADOS

RESULTADOS

Os resultados obtidos na presente investigação estão divididos em três partes:

1. Microscopia de luz

Na análise das lâminas histológicas verifica-se a estrutura da glândula pineal constituída por um parênquima celular associado a trabéculas contendo fibras conjuntivas (Fig. 1).

Nota-se a distribuição de grânulos de maior densidade e de coloração mais intensa que correspondem às concreções calcáreas de formas circulares e em mórula (Fig. 2).

Observamos que na região onde essas concreções estão presentes existe uma menor densidade do componente celular. Pode-se observar formações em diversos estágios, com vários grupos de lamelas concêntricas agrupadas. Em posição satélite, estruturas com núcleo único rodeado por formações puntiformes com tendência à agregação (Fig. 1 e 2) Rodeando as

formações observa-se células de núcleo oval e citoplasma com expansões dendritiformes, que podem corresponder às células gliais ou penealócitos (Fig. 1).

As concreções observadas apresentam-se circunscritas por uma rede de células e fibras que compõem um alvéolo (Fig. 2).

Uma intensa agregação de concreções cálcicas são observadas no interior do parênquima circundado pelos feixes de tecido conjuntivo. Em áreas adjacentes, nota-se as concreções isoladas de vários diâmetros (Fig. 3). Em maior aumento da figura 3 pode-se identificar os agrupamentos de formações cálcicas constituindo estruturas mais complexas (Fig.4). A Fig.5 revela estruturas contendo grande quantidade de células correspondente ao tecido mais profundo do corpo pineal. Na parte superficial pode-se notar essencialmente as concreções cálcicas de vários tamanhos envoltas por fibras colágenas entremeadas de células. A superfície da glândula pineal humana observada ao microscópio eletrônico de varredura, observa-se uma forma esférica revestida por tecido fibroso, contendo três folhetos (Figs. 6 e 7). Na superfície do corpo pineal observa-se os relevos de diferentes alturas, mostrando as elevações de concreções subjacentes. No tecido conjuntivo observa-se os trajetos sinuosos de pequenos vasos (Fig.8). A estrutura interna

da glândula pineal mostra-se constituída por parênquima celular e tecido conjuntivo rico em fibras (Fig.9). As concreções calcárias estão localizadas no parênquima da glândula pineal sendo mais abundante na região periférica (Fig.9). Em maior aumento a Fig.10 revela as concreções calcárias constituídas por grupamentos de pequenos grânulos tendo a região central fundida, como um corpo sólido. A distribuição destes grânulos na superfície das concreções está arranjada assemelhando-se a pequenas amoras (Fig.10). Nas áreas adjacentes a esses grupamentos verifica-se a presença de concreções menores em grande quantidade (Figs. 9 e 10). A superfície de concreção calcária é revestida por feixes de fibras colágenas (Fig.11). Em maior aumento pode-se notar nitidamente os feixes de fibras colágenas orientados e percorrendo no interior do sulco entre as projeções calcárias arredondadas (Fig.12). Nas áreas adjacentes, observa-se as células com as suas expansões citoplasmáticas (Fig.12). Na superfície da porção calcária, após a remoção do tecido conjuntivo, observa-se formações em aspecto de circunvolução cerebral (Fig. 13). Na superfície de fratura por congelção por Nitrogênio líquido, houve a separação de tecido conjuntivo, o que revelou as formações superficiais granulares e as porções internas da estrutura calcária (Fig.14). Ao lado das estruturas calcárias nota-se os feixes de fibras colágenas e capilares sangüíneos

(Fig.14). As formações calcárias fraturadas transversal ou obliquamente mostram as estruturas maciças de tecido mineralizado e a cápsula de tecido conjuntivo envolvendo cada uma das formações (Fig.15). Nas áreas adjacentes à fratura, a formação cálcica revela as diferentes elevações correspondentes às circunvoluções e o tecido conjuntivo adjacente (Fig. 16). Em maior aumento, da Fig. anterior nota-se nitidamente as superfícies da formação calcária e a camada de tecido conjuntivo da cápsula (Fig.17). Após a remoção das concreções calcárias observa-se as cavidades que as alojavam (Fig. 18). Na superfície interna mostra os contornos superficiais de cada uma das projeções calcárias (Fig. 18). Nas áreas adjacentes observa-se as concreções fraturadas e estruturas conjuntivas (Fig. 18). A figura 19 mostra a superfície interna da cavidade após a remoção da concreção, identificando uma lamela calcária aderida à superfície. Nas áreas adjacentes nota-se as superfícies das concreções e feixes de fibras colágenas. Em maior aumento revela a superfície interna da lamela (Fig.20). A superfície interna, em maior aumento, revela nitidamente a estrutura calcificada a lamela aderida à cavidade (Fig.21). Após a digestão a superfície revela a presença de fibras colágenas espessas (Fig.22). Após a fratura da concreção cálcica, nota-se a formação interna evidenciando as lamelas concêntricas (Fig.23). Cada uma das projeções cálcicas de uma

formação maior, possuem a estrutura lamelar evidenciada nas Figs. 23 e 24. A Fig. 24 mostra nitidamente a caracterização das lamelas nas duas superfícies de fratura. Na Fig. 25 observa-se em maior aumento o padrão de lamelas concêntricas da porção superficial da projeção cálcica. O detalhe do núcleo interno de cada projeção cálcica é notada na Fig. 26, como tendo uma lamela em aspecto tridimensional. Ao microscópio eletrônica de varredura pode-se detectar a presença de microvilosidades plexo coróide (Fig. 27).

2 - Microscopia eletrônica de varredura com espectrometria de Rx por dispersão de energia (EDS).

A microanálise revelou a presença de cálcio, fósforo e oxigênio em quantidade expressiva nas concreções, além de sódio, magnésio e alumínio em quantidade residual (tabelas numeradas de 1 a 12). Foi constatado que o oxigênio presente está associado ao cálcio e ao fósforo formando óxidos, e não na forma livre. Pode-se constatar uma relação de 2/1 na composição cálcio/fósforo, sendo que estes níveis se mantêm na superfície ou no centro das concreções analisadas. Aspectos morfológicos podem ser observados: a Fig. 28 mostra diversos padrões de concreções uni e multinucleadas. Em maior

aumento (Fig. 29), focalizamos uma das concreções, a qual apresentou rachadura que se formou durante a observação. A Fig. 30 mostra uma aproximação após teste com aumento da incidência do feixe de elétrons com o objetivo de reproduzir novamente o fenômeno da rachadura. Observou-se que o feixe incidido não reproduziu o fenômeno, apenas perfurando a concreção, tendo a rachadura possivelmente outra causa a ser discutida. A Fig. 31 mostra concreção multinucleada com padrão pouco definido.

A Fig. 32 mostra o aspecto de acavamento de camadas concêntricas, na forma de zig-zag, correspondendo a concreção de uma amostra de pineal de idade senil. As Fig. 33 e 34 apresentam aspecto multinucleado e os padrões lamelados visíveis nos lóbulos. O contraste das áreas claras e escuras em realidade não se apresentam na intensidade mostrada na figura, pois esta objetiva a microanálise quantitativa; portanto, o contraste acentuado apresentado é um artefacto da técnica utilizada. A micrografia Fig. 35 mostra aspecto com inúmeros poros correspondentes a áreas ocupadas por material orgânico digerido no preparo da amostra. Observamos em inúmeras micrografias, concreções com as rachaduras, devido ao artefato de técnica. A Fig. 36 mostra uma concreção uninucleada com

destruição, por artefato de técnica, do material interior e preservação do aspecto da superfície, que se apresenta bem delineada.

As tabelas numeradas de 1 a 12 mostram quantitativamente os elementos constituintes das concreções, sendo que em média a relação Ca/P se comporta de 2/1 tanto em região central como em região periférica. Os elementos magnésio, alumínio e sódio, e em algumas amostras (tabela 6) traços de ferro apresentam-se sempre em quantidades residuais. O oxigênio presente em quantidade significativa apresenta-se na forma de óxido, como podemos constatar nas tabelas 1 e 2.

3 - Difração de Rx

A análise mostra picos característicos das ondas de Bragg (gráficos 1 e 2), evidenciando a presença de formações cristalinas. Comparando com o padrão difratográfico da apatita no gráfico conjugado (linhas verticais), demonstramos que as concreções calcáreas são cristais de apatita. Os picos são pouco intensos e muito largos, indicando que o material é de baixa cristalinidade. No entanto, fatores relacionados ao preparo da amostra, como a pouca quantidade do material analisado, tamanho do grão e fatores instrumentais, também dificultam os resultados do difratômetro. A pouca

quantidade da amostra se dá pelo fato de termos colocado para a análise concreções de pineal com características individuais. O procedimento é importante para se verificar o grau de cristalinidade individual das concreções em pineais humanas.

Os gráficos obedecem à equação de Bragg, $n.L=2d.\text{sen}O$, onde “n” representa o número de planos, “L” o comprimento de onda, “d” distância entre os planos paralelos sucessivos e “O” o ângulo de incidência e reflexão do feixe de raio x. Nos gráficos, as ordenadas informam a intensidade relativa dos picos, e as abcissas o ângulo “O”. Os picos relacionam-se aos planos cristalinos característicos da amostra analisada. A presença destes picos confere que o material analisado obedece à equação de Bragg e comprova ser de estrutura cristalina.

Fig.1- Microscopia de luz. Aspecto geral da glândula pineal humana mostrando os grânulos (*)e tecido conjuntivo (setas). 100X Coloração : H-E

Fig.2- Microscopia de luz. Em maior aumento, revela os grânulos (*) e tecido conjuntivo circundante. 300X Coloração : H-E

Fig.3- Microscopia de luz. Mostra a distribuição de concreções calcáreas (*) e tecido conjuntivo (setas). 150X Coloração: H-E

Fig.4 -Microscopia de Luz. Mostra em maior aumento, agrupamento de formações cálcicas. 200X Coloração: H-E

Fig.5 - Microscopia de Luz. Mostra agrupamento de concreções cálcicas (*) e tecido conjuntivo contendo as células (setas). 100X Coloração:H-E.

Fig.6 - Microscopia eletrônica de Varredura. Observa-se as concreções cálcicas envoltas pela capa de tecido conjuntivo (setas). 440X

Fig.7- Microscopia eletrônica de varredura. Mostra uma concreção calcárea, em maior aumento, evidenciando os folhetos de tecido conjuntivo envolvente (setas). 1000X

Fig.8 - Microscopia eletrônica de varredura. Revela a superfície do corpo pineal evidenciando os capilares (setas). 390X

Fig.9 -Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto geral da superfície de fratura do corpo pineal, mostrando a distribuição das concreções. 100X

Fig.10 -Microscopia eletrônica de varredura. Mostra as concreções calcáreas maiores (setas maiores) e menores (setas menores) e tecido conjuntivo adjacente (*). 300X

Fig.11 - Microscopia eletrônica de varredura. Mostra os detalhes de concreções revestidas por feixes de fibras colágenas. 800X

Fig.12 - Microscopia eletrônica de varredura. Em maior aumento revela a superfície de uma concreção calcárea (*) e feixes de fibras colágenas. 1800X

Fig.13 - Microscopia eletrônica de varredura. Nota-se as formações superficiais de concreções em aspecto de circunvolução cerebral. 2100X

Fig.14 - Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto geral da superfície do corpo pineal, evidenciando as formações calcáreas (seta maior), tecido conjuntivo (*) e capilares (seta menor). 300X

Fig.15 - Microscopia eletrônica de varredura. Mostra o aspecto de uma fratura do corpo pineal com várias formações calcáreas (*). A cápsula de cada formação é evidenciada (seta). 390X

Fig.16 - Microscopia eletrônica de varredura. Em maior aumento, nota-se a superfície fraturada de uma concreção e tecido conjuntivo adjacente. 3300X

Fig.17 - Microscopia eletrônica de varredura. Em maior aumento, revela uma projeção lateral da concreção (*) e tecido conjuntivo adjacente constituindo a cápsula (seta). 8000X

Fig.18 - Microscopia eletrônica de varredura. Mostra o aspecto geral de uma superfície de fratura, evidenciando as formações calcáreas (*) e as lojas (**).

160X

Fig.19 - Microscopia eletrônica de varredura. Evidencia as superfícies das formações calcáreas e o fundo da cavidade revestido por fibras colágenas (*).

600X

Fig.20 - Microscopia eletrônica de varredura. Mostra em maior aumento o fundo da cavidade evidenciando espessos feixes de fibras colágenas. 1300X

Fig.21 - Microscopia eletrônica de varredura. Mostra em maior aumento, a estrutura calcificada aderida à lamela (*). 4500X

Fig.22 - Microscopia eletrônica de varredura. Mostra em maior aumento a disposição de feixes de fibras colágenas do fundo da cavidade (*). 650X

Fig.23 - Microscopia eletrônica de varredura. Mostra uma superfície da concreção cálcica evidenciando as estruturas internas. 3900X

Fig.24 - Microscopia eletrônica de varredura. Em maior aumento, evidencia as formações lamelares (setas). 6900X

Fig.25 - Microscopia eletrônica de varredura. Mostra em maior aumento, a disposição de lamelas da estrutura calcárea. 10500X

Fig.26 - Microscopia eletrônica de varredura. Mostra em maior aumento, os detalhes do núcleo interno da formação calcárea. 22500X

Fig.27 - Microscopia eletrônica de varredura. Mostra as vilosidades do plexo coriônico. 1200X

Fig.28 - Microscopia de varredura por emissão de raio X, mostra concreções calcáreas de múltiplas formas.

Fig.29 - Microscopia de varredura por emissão de raio X, aproximação de uma das concreções demonstrando a agregação de múltiplas unidades de lamelas concêntricas formando lóbulos. Observa-se rachadura se formando durante a observação ao microscópio.

Fig.30 - Microscopia de varredura por emissão de raio-x, aproximação demonstrando o padrão de artefato por perfuração causado pelo feixe de elétrons. As rachaduras têm portanto outra origem, não sendo causada pela incidência do feixe eletrônico.

Fig.31 - Microscopia de varredura por emissão de raio X, mostrando concreções calcáreas com lamelas concêntricas.

Fig.32 - Microscopia de varredura por emissão de raio X, detalhes de uma concreção calcárea mostrando lamelas concêntricas em zig-zag.

MICROANÁLISE

correspondente à Fig. 32

TABELA 1 - SUPERFÍCIE (seta)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	38.850	.209	54.359	2.1
P	18.453	.141	42.287	
Mg	.637	.051	1.056	
Na	1.396	.098	1.881	
O	40.335			
Al / K / Cu / Fe / Zn / Mo - Desprezível				

TABELA 2a - PARTE ESCURA (*)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	38.683	.212	54.359	2.1
P	18.199	.144	41.705	
Mg	.302	.067	.501	
Na	2.443	.111	3.294	
O	40.027			
Al / K / Cu / Fe / Zn / Mo - Desprezível				

TABELA 2b - PARTE CLARA (**)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	38.700	-	54.199	2.0
P	19.001	.129	42.144	
Mg	.118	.056		
Na	2.170	.095		
O	40.152	-		
Al	.152	.045		
K / Cu / Fe / Zn / Mo - Desprezível

Fig.33 - Microscopia de varredura por emissão de raio X, mostrando concreção multilobulada apresentando lamelas concêntricas em regiões lobulares. As rachaduras são artefacto de técnica.

MICROANÁLISE

correspondente à Fig. 33

TABELA 3 - PARTE EXTERNA COM LAMELA (seta)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	38.770	.188	não analisado	2.2
P	17.600	.126		
Mg	.249	.054		
Na	.751	.081		
O	41.517	.534		
Al	.123	.045		
Al / K / Cu / Fe / Zn / Mo - Desprezível				

TABELA 4 - PARTE EXTERNA SEM LAMELAS (*)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	39.132	.186	não analisado	2.1
P	18.086	.124		
Mg	.257	.051		
Na	.498	.073		
O	40.841	.523		
Al	.115	.042		
K / Cu / Fe / Zn / Mo - Desprezível				

TABELA 5 - PARTE INTERNA (**)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	39.689	.182	não analisado	2.2
P	18.283	.121		
Mg	.239	.047		
Na	.602	.067		
O	39.345	.496		
Al	.123	.039		
K / Cu / Fe / Zn / Mo - Desprezível

Fig.34 - Microscopia de varredura por emissão de raio X, mostrando concreção cujas áreas mais claras ou mais escuras indicam diferença de concentração de cálcio. A intensidade da variação cromática não corresponde à pouca significativa diferença detectada na análise química das partes estudadas.

MICROANÁLISE

correspondente à Fig. 34

TABELA 6 - PARTE EXTERNA (seta)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	40.287	.196	não analisado	2.2
P	18.047	.129		
Mg	.199	.052		
Na	.487	.075		
O	39.422	.541		
Al	.106	.044		
K / Cu / Fe / Zn / Mo - Desprezível				

TABELA 7 - PARTE INTERNA (*)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	41.156	.190	não analisado	2.2
P	18.426	.125		
Mg	.152	.050		
Na	.508	.071		
O	39.209	.521		
Al	.099	.042		
K / Cu / Fe / Zn / Mo - Desprezível

Fig.35 - Microscopia de varredura por emissão de raio X, detalhe de estrutura porosa da concreção. Ainda assim, observamos lamelas concêntricas.

MICROANÁLISE

correspondente à Fig. 35

TABELA 8 - PARTE EXTERNA II, AI (seta maior)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	39.012	.192	não analisado	2.2
P	18.024	.129		
Mg	.217	.055		
Na	.673	.079		
O	41.345	.553		
Al	.103	.046		
Fe	.202	.084		
Zn	.306	.144		
K / Cu / Mo - Desprezível				

TABELA 9 - PARTE EXTERNA II, AI (*)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	45.956	.225	não analisado	2.4
P	19.408	.143		
Mg	.242	.054		
Na	.451	.076		
O	33.222	.575		
Al	.145	.047		
Fe	.269	.097		
K / Cu / Zn / Mo - Desprezível				

TABELA 10 - PARTE EXTERNA II, AI (**)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	41.768	.196	não analisado	2.2
P	18.783	.129		
Mg	.208	.051		
Na	.547	.073		
O	37.904	.535		
Al	.105	.043		
Fe	.276	.082		
K / Cu / Zn / Mo - Desprezível				

TABELA 11 - PARTE INTERNA (seta menor)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	38.774	.170	não analisado	2.1
P	18.575	.115		
Mg	.146	.046		
Na	.784	.070		
O	40.919	.484		
Al	.136	.039		
K / Cu / Fe / Zn / Mo - Desprezível

Fig.36 - Microscopia de varredura por emissão de raio X, detalhe de uma concreção mostrando destruição da parte interna por artefato de técnica.

MICROANÁLISE

correspondente à Fig. 36

TABELA 12a - PARTE INTERNA (seta)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	37.577	.178	não analisado	2.0
P	18.528	.122		
Mg	.196	.052		
Na	.718	.077		
O	42.581	.509		
Al	.085	.043		
Fe	.208	.075		
K / Cu / Zn / Mo - Desprezível				

TABELA 12b - PARTE EXTERNA (*)

Elemento	Percentual	Erro	% Óxido	Ca / P
Ca	38.774	.170	não analisado	2.1
P	18.575	.115		
Mg	.146	.046		
Na	.784	.070		
O	40.919	.484		
Al	.136	.039		
K / Cu / Fe / Zn / Mo - Desprezível

Gráfico 1- Difração de raio X. O gráfico representa o padrão de difração de raio X de uma amostra de concreções de uma glândula pineal individualizada. Os picos pouco delineados e largos sugerem material com baixo cristalinidade. Em linhas verticais, o padrão próprio de difração da apatita na natureza.

Gráfico 2 - Demonstra picos ainda menos intensos e delineados que o gráfico 1, indicando menor cristalinidade deste material.

5. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Da estrutura da glândula pineal humana podemos analisar aspectos anatômicos do corpo pineal, como as cápsulas conjuntivas envolvendo as concreções, os alvéolos (cavidades no interior das cápsulas) e vasos sanguíneos justapostos à pia-máter em área marcada pela presença de concreções. As cápsulas são compostas por células conjuntivas e fibras, como podemos observar nas lâminas de microscopia óptica, consistindo de múltiplas camadas conjuntivas concêntricas, aderidas à superfície das concreções observadas à microscopia eletrônica de varredura. As lamelas calcáreas da superfície das concreções deslocadas dos alvéolos, se destacam do corpo das mesmas e permanecem aderidas à rede conjuntiva da cavidade alveolar. Histologicamente observamos aspectos do parênquima, tecido conjuntivo e concreções calcáreas. No que diz respeito ao parênquima não foi possível a discriminação dos tipos celulares constituintes, como pinealócitos claros e escuros, células da glia, neurônios e mastócitos, já que a microscopia óptica não permite uma definição clara destes tipos celulares quando utilizamos a

coloração de H.E. (TAPP, E. & HUXLEY, M., 1972). No entanto foi possível discriminar regiões com predomínio de células e fibras conjuntivas daquelas com predomínio de células parenquimatosas. Na microscopia óptica ficou evidente que as concreções calcáreas estão presentes em áreas com predominância de tecido conjuntivo, estando ausentes em áreas parenquimatosas, observada em pineal profunda. A microscopia de varredura demonstra que as áreas com presença de concreções são regiões mais superficiais, preservando a pineal profunda, onde estão ausentes. Os métodos utilizados para estudo da estrutura da pineal favoreceram a observação predominantemente do tecido conjuntivo e principalmente das concreções calcáreas. A microscopia eletrônica por espectrometria de raio-x por dispersão de energia (EDS) permitiu o estudo da composição das concreções e uma visão da morfologia interna destas estruturas. Com a difração de raio-x identificamos a estrutura do arranjo atômico dos elementos que compõe as concreções, permitindo a verificação do grau de cristalinidade do material. Assim, os dados do presente trabalho demonstram os aspectos da presença de formações calcáreas na glândula pineal humana, conforme detectado por KITAY, J. & ALTSCHULE, M. (1954) e HEIDEL, G. (1965). A observação de que as formações cálcicas distribuem-se

aleatoriamente em toda a extensão da glândula pineal humana numa camada superficial, estando ausente na região profunda da glândula, está de acordo com os resultados de JAPHA, J. L. et al. (1976).

O método de fratura por congelação em nitrogênio líquido, evidencia que o padrão lamelar tem um aspecto tridimensional consistindo de uma espessura e textura específica. O arranjo lamelar concêntrico ocorre em cada lóbulo da concreção em mórula. O padrão lamelar parece ser uma estrutura dinâmica e está relacionada a idade em humanos (SCHMID, H. A. & RAYKHTSAUM, G., 1995), sendo que observamos em cada lóbulo um padrão funcional unitário. Este dado pode nos dar o indicativo da dimensão de uma unidade funcional do processo de mineralização na pineal. Os dados do presente trabalho revelam que a concreção não é uma estrutura estática mas metabolicamente ativa, havendo a formação em vários estágios, desde os menores até os maiores, de acordo com a agregação de lamelas em uma unidade funcional, e a agregação destas unidades em um maciço em forma de mórula. Este aspecto dinâmico-funcional é evidenciado por SCHMID, H. A. & RAYKHTSAUM, G. (1995), HUMBERT, W. & PÉVET, P. (1995) e ressaltados por BINKLEY, S. (1988).

Foi demonstrada uma estrutura lamelar tridimensional, por aposição de camadas numa formação secundária por depósitos sucessivos de cálcio, fósforo, resíduos de magnésio, alumínio, e às vezes ferro, evidenciado pela microanálise. A justaposição de camadas provoca a formação em zig-zag, característica da senilidade, conforme pudemos constatar nas imagens por EDS. Este aspecto foi evidenciado anteriormente por SCHMID, H. A. & RAYKHTSAUM, G. (1995); no entanto, ao contrário destes autores, não encontramos diferença de concentração na relação cálcio/fósforo relativamente a região central ou periférica das concreções em nossa amostragem., embora os autores supracitados tenham analisado na verdade aspectos do centro e camadas intermediárias das concreções. As camadas concêntricas lamelares estão presentes em cada lóbulo de uma concreção em forma de amora, dando a idéia de que esta seja uma unidade funcional da concreção e a mórula, uma agregação destas unidades funcionais; a fusão das unidades forma um maciço central, examinadas em nossas amostras. É importante observar que o aspecto circular das lamelas está delineado previamente pela deposição da rede fibrosa conjuntiva da cápsula, também organizada em folhetos concêntricos. Entretanto, o mecanismo do processo de mineralização ocorre na forma de um ponto calcificado, sendo que esses pontos calcificados têm a proporção de uma

célula. Este dado observado à microscopia óptica pode ser mensurado nas imagens por microscopia eletrônica de varredura e EDS, observando-se que os núcleos das concreções com cerca de 10 micrômetros de diâmetro tem proporções celulares (JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J.; 1985). Isto sugere a co-participação da mineralização a partir do conteúdo celular. No entanto, conforme foi observado em nossos resultados, a estrutura fibrosa circunjacente às concreções, sugere a participação do tecido conjuntivo no processo de mineralização. A localização mais superficial das concreções na pineal, pode ser interpretada pela maior proximidade com a pia-máter, reforçando a hipótese do envolvimento do tecido conjuntivo neste processo. A matriz conjuntiva pode ser a estrutura precipitadora numa região de alto metabolismo de cálcio, no metabolismo da produção de melatonina, conforme ressaltam SCHMID, H. A. & RAYKHTSAUM, G. (1995) .

WUTHIER, R. E. (1973) faz menção a duas hipóteses sobre os mecanismos de biomineralização: a hipótese celular e a conjuntiva. Em nossos resultados encontramos bases morfológicas que sustentam tanto a hipótese da origem celular, como a de origem matricial conjuntiva. Os achados de concreções puntiformes, na dimensão celular, assim como a característica do tecido conjuntivo estruturado em camadas concêntricas envolvendo as formações

calcáreas, sugerem que os dois mecanismos devam estar envolvidos na gênese da concreção, de forma conjugada. Interessante a observação de estrutura calcárea de aspecto poroso, o que sugere ter havido digestão de material orgânico, após preparo da amostra que formava a matriz da concreção. A digestão por NaOH também fragiliza as concreções tornando-as quebradiças, daí as rachaduras observadas às micrografias eletrônicas. Estes aspectos vêm reforçar a hipótese da formação de um núcleo orgânico antecedendo a gênese da concreção. Tal matriz foi estudada por PALLADINI, G. et al. (1965), LUKASZYK, A. & REITER, R. J. (1975) e JAPHA, J. L. et al. (1976).

Os vasos sangüíneos presentes em região de mineralização, estão de acordo com a possibilidade de mineralização ativa, mediante as trocas de cálcio, fósforo e outros elementos. Vale ressaltar as observações de CIPOLLA NETO, J. (1996) quanto à participação do cálcio no metabolismo da melatonina. O envolvimento do cálcio na regulação da fisiologia da glândula pineal e controle da síntese de melatonina está ligado aos mecanismos simpáticos noradrenérgicos dados pela inervação de fibras simpáticas pós-ganglionares. A estimulação de receptores alfa-adrenérgicos potencializa os receptores beta-adrenérgicos dos pinealócitos, estimulando a síntese de melatonina. Há evidências de que a estimulação crônica de beta-receptores

elevam os níveis de HIOMT. Os mecanismos pelos quais a estimulação alfa-adrenérgica potencializa a indução beta-adrenérgica envolve o incremento de cálcio intracelular. Há evidências de que cálcio e cAMP provavelmente agem de forma coordenada na estimulação da NAT. A secção da inervação ou a ganglionectomia cervical superior abolem a ritmicidade da síntese de melatonina e o controle de sua produção pela variação de intensidade de luz. Estes fatores sugerem que as concreções possam funcionar como um estoque dinâmico de cálcio, implicado na regulação da produção de melatonina e aspectos da fisiologia da glândula pineal. Pelo fato das concreções apresentarem estrutura e composição muito semelhante a ossos e dentes (ANGERVALL, L. et al., 1958) é possível que estejam sujeitas à regulação hormonal do metabolismo de cálcio, tal qual nesses tecidos.

É relevante a observação de JAPHA, J. L. et al. (1976) , MENIGOT, M. (1970), KISS, J. et al. (1969) e REITER, R. J. et al. (1973) de que a glândula pineal está envolvida com o metabolismo de cálcio, apresentando relações funcionais com a glândula paratireóide. GREENSTEIN, B. (1994) explica o envolvimento do metabolismo do cálcio, a calcitonina e a vitamina D (1-alfa, 25-diidroxitamina D3): a vitamina D estimula a reabsorção de cálcio pelos ossos, sendo que esta via metabólica é dependente

da radiação solar. Questionamos se a dinâmica metabólica das concreções não sofreria interferência desta via, de tal forma que teríamos além da já conhecida interferência luminosa sobre a pineal, através da via retino-hipotalâmica (CIPOLLA NETO, J., 1996), também uma suposta regulação da pineal por incidência luminosa na epiderme, envolvendo o metabolismo de Vitamina D e cálcio. A presença de vasos sangüíneos próximos às concreções, o conteúdo de cálcio evidenciado pela microanálise, o aspecto dinâmico da morfologia das concreções, são aspectos encontrados que tornam possível esta hipótese já presumida pelos autores citados, merecendo estudos mais aprofundados.

Os nossos resultados demonstram ser cristalina a estrutura das concreções. A difração de raio-x demonstrou a característica formação de cristais de apatita, embora os achados evidenciem baixa cristalinidade do material. Este resultado está de acordo com os achados de ANGERVALL, L. et al.(1958), EARLE, K. M. (1965) e MABIE, C. P. & WALLACE, B. M. (1974).

Os aspectos morfofuncionais ainda não estão totalmente elucidados, no entanto os trabalhos que relacionam pineal com propriedades magnéticas, como YAMADA, N. et al. (1996), SEMM, P. et al. (1980) e REITER, R. J. (1991), nos sugere a hipótese de que as propriedades

diamagnéticas dos cristais de apatita formam uma camada de regulação por interferência na captação magnética regulando a função dos pinealócitos. A apatita na natureza possui propriedades diamagnéticas; KLEIN, C. & HURLBUT JR., C. S. (1993) explicam que este tipo de material é conhecido como diamagnético devido à propriedade de não ser atraído por magnetos. A apatita é em verdade, repelida por campos magnéticos. Esta propriedade se dá devido à nuvem de elétrons que os átomos da apatita expõem, e não propriamente pelos spins eletrônicos. Nesta substância há um número equivalente de spins eletrônicos “up” e “down”, provocando o cancelamento dos efeitos magnético. GOODMAN, E. M. et al. (1995) , propõem, através de resultados experimentais, que uma proteína ligada ao cálcio poderia ser afetada por campos magnéticos. LUBEN, R. A. et al. (1982) desenvolveu modelos experimentais nesta linha, utilizando células ósseas e suas respostas aos hormônios. Estes dados reforçam a hipótese de um possível envolvimento das concreções da pineal na regulação da interação de campos magnéticos.

Em plexo coriódio observamos que não há indícios de formações calcáreas na porção analisada. Em GRAY’S ANATOMY (1995), é citada a formação calcárea em estroma de plexos corioides, sendo que a estrutura dos mesmos se diferencia das concreções pineais por serem (os de plexo coriódio)

amorfo. Interessante que MOLLER, M. et al. (1979) já observaram concreções amorfas também em tumores cerebrais. Possivelmente, as concreções que se observa justapostas ao plexo corióide em tomografias, como observado por ARAI, Y. et al. (1995), ou mesmo macroscopicamente em peças anatômicas, devem ser ou formações do estroma corióide, onde encontramos tecido conjuntivo derivado da pia-máter, ou extrusões que se formam na pineal e alcançam o plexo sem interferir na sua estrutura. A face endimária do plexo corióide, apesar de envolver passagem de cálcio, no contexto do metabolismo líquido, não apresenta exteriormente qualquer sinal de formação cálcica, ao contrário do que se observa na superfície da pineal. Quando se formam concreções cálcicas em plexo corióide, conforme literatura, esta ocorre no estroma, reforçando a participação do tecido conjuntivo. Este aspecto sugere a não participação de células endimárias no processo de calcificação. Assim, temos que na pineal, quando situamos proximamente à pia-máter, temos formações calcáreas, estando ausentes na superfície recoberta por epêndima, na base da pineal. Tal fato estaria de acordo com as afirmações de KAPPERS, J. A. (1971) sobre a característica de epêndimo secreção da pineal embrionária, onde não se encontram formações calcáreas (BINKLEY, S., 1988). Este fator

acentua a hipótese da participação do tecido conjuntivo na formação dos cristais em pineal e não do tecido ependimário.

Evidentemente, com este trabalho não pretendemos analisar todos os aspectos morfofuncionais do corpo pineal. Portanto, outros projetos serão necessários para melhor elucidação das estruturas do corpo pineal, visando relacionar com processos fisiopatológicos.

6. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados alcançados na presente pesquisa podemos concluir que:

1. Histologicamente o corpo pineal apresenta uma estrutura contendo formações calcáreas, células e tecido conjuntivo. As formações calcáreas apresentam diferentes formas e tamanhos, concentrando-se em áreas onde se localiza grande quantidade de tecido conjuntivo.

2. Ao microscópio eletrônico de varredura, as formações calcáreas revelam nitidamente as características externas com aspectos de mórula e internamente uma constituição lamelar.

3. Cada formação calcárea é envolta por uma cápsula contendo espessos feixes de fibras colágenas.

4. A microscopia eletrônica de varredura com espectrômetro de raio-x revelou nas imagens, a existência de camadas concêntricas, contendo estruturas porosas e amorfas, e na microanálise a composição predominante de cálcio e fósforo.

5. O método por difração de raio-x evidenciou que as amostras calcáreas da glândula pineal possuem uma estrutura compatível com formações cristalinas de apatita.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIBLIOGRAFIA

ALBERTS, B; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFFI, R. M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. - The mode of actions of cyclic AMP and calcium ions as second messengers. In: Molecular Biology of the Cell. Garland Inc., New York, p. 743-754, 1983.

ANDERSON, H. C. - Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. - J. Cell Biol. 41:59, 1969.

ANDERSON, H. C. - Matris vesicles of cartilage and bone. - In Bourne, G. H. (ed.) : The Biochemistry and Physiology of Bone, Vol. 4, 2. ed. New York, Academic Press, p. 135, 1976.

ANDREWS, A. T. DE B.; HERRING, G. M.; KENT, P. W. - Some studies on the composition of bovine cortical-bone sialoproteins. Biochem. J. 104:705, 1967.

ANGERVALL, L.; BERGER, S.; ROECKERT, H. - A microradiographic and X-ray crystallographic study of calcium in the pineal body and in intracranial tumors. *Acta Path. Microbiol.* 44:113-119, 1958.

ARAI, Y.; YOSHIHARA, S.; IINUMA, K. - Brain CT studies in 26 cases of aged patients with Down Syndrome. *No-To-Hattatsu*, 27 (1): 17-22 - abstract, 1995.

ARENDT, J. - Melatonin and The Mamalian Pineal Gland. Ed. Chapman & Hall, 1995.

ARMSTRONG, S. M. & REDMAN, J. R. - Melatonin and circadian rhythmicity p. 187-224 in melatonin: Biosynthesis, physiological effects, and clinical applications. Edited by Hing-Sing Yu & Russel. J. Reiter, 1993.

BAB, I.; MUHLRAD, A.; SELA, J. - Occurrence of extracellular matrix vesicles in normal alveolar bone of rats. *Cells Tiss. Res.* 202:1, 1979.

BERNARD, G. W. - Ultrastructural observations of initial calcification in dentine and enamel. *J. Iltrastruct. Res.* 41:1, 1972.

BERNARD, G. W.; PEASE, D. C. - An electron microscopic study of the initial intramembranous osteogenesis. *Am J. Anat.* 125:271, 1969.

BINKLEY, S. - The Pineal: Endocrine and Nonendodrine Function. Ed. Printice Hall, 1988.

BOCCHI, G.; VALDRE, G. - Psysical, chemical and micralogical characterization of carbonate-hydroxyapatite concretions of the human pineal gland. *J. Inorg. Biochem.* 49:209-220, 1993.

BOJKOWSKY, C. J.; ARENDT, J. - Factors influencing urinary 6-sulphatoxymelatonin, a major melatonin metabolite, in normal human subjects. *Clin. Endocrinol.* 33:345-444, 1990.

BONUCCI, E. - Fine structure and histochemistry of "calcifying globules" in epiphyseal cartilage. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 103:192, 1970.

BONUCCI, E. - The locus of initial calcification in cartilage and bone. Clin. Orthop. 78:108, 1971.

BOSKEY, A. - Phospholipids and calcification. In: Calcified Tissue. D. W. L. Hukins, ed., CRC Press, Boca Raton, pp.215-245, 1989.

BOWEN, I. D.; RYDER, T. A. - The application of X-ray microanalysis to histochemistry. In: Electron Probe Microanalysis in Biology. D. A. Erasmus, ed. London; Champman and Hall, pp. 183-211, 1978.

BRIGTHON, C. T.; HUNT, R. M. - Histochemical localization of calcium in growth plate mitochondria and matrix vesicles. Fed. Proc. 35:143, 1976.

BRIGTHON, C. T.; HUNT, R. M. - Electron microscopic pyroantimonate studies of matrix vesicles and mitochondria in rachitic growth plate. Metab. Bone Dis. 1:199, 1978.

BUTLER, W. T. - Structure and function of mineralized tissue components-
Chemistry and Biology of mineralized tissue. Ed. Elsevier Science Publishers,
1992.

CAJAL, S. R. - Histology of the nervous system. p. 400-402. Ed. Oxford
University Press, Inc., 1995.

CHANDLER, J. A. - X-ray microanalysis in the electron microscope. In:
Practical Methods in Electron Microscopy. Vol. 5, II. A. M. Glauert, ed. North
Holland, Amsterdam, p. 317-547, 1977.

CIPOLLA NETO, J. - Controle Neural do metabolismo da Glândula Pineal.
Tese apresentada ao ICB-USP, 1996.

COMMENTZ, J. C.; FISCHER, P.; STEGNER, H; WINKLER, P.; HELMKE,
K.; WILLIG, R. P. - Pineal calcification does not affect melatonin production.
J. Neural Transm. Suppl. 21:481-502, 1986.

CRAFT, C. M. -Molecular Biology of pineal gland: Melatonin Synthesizing Enzymes- Melatonin Biosynthesis, Physiological Effects and Clinical Applications. Ed. H.S. Yu e R.J. Reiter- CRC press, 1993.

DE VRIES, R. A. C. & KAPPERS, J. A. - Influence of the pineal gland on the neurosecretory activity of the supraoptic hypothalamic nucleus in the male rat. Neuroendocrinology, 8, 359-366, 1971.

EARLE, K. M. - X-ray diffraction and other studies of the calcareous deposits in human pineal glands. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 24:108-118, 1965.

EISENMAN, D. R.; GLICK, P. L. - Ultrastructure of initial crystal formation in dentin. J. Ultrastruct. Res. 41:1, 1972.

ERHART, E. A. - Neuroanatomia. 2. ed. p. 33-34 e 187. Atheneu Editora São Paulo Ltda., 1962.

GALLIANI, I.; FRANK, F.; GOBBI, P.; GIANGASPERO, F.; FALCIERI, E. - Histochemical and ultrastructure study of the human pineal gland in the course of aging. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 21:571-578, 1989.

GARTNER, L. P. & HIATT, J. L. - Color atlas of Histology 2. ed. p. 186-187. Ed. William & Wilkins, 1994.

GLIMCHER, M. J. - Molecular biology of mineralized tissues with particular reference to bone. Rev. Mod. Physics 31:359, 1959.

GLIMCHER, M. J.; KRANE, S. M. - The organization and structure of bone and the mechanism of calcification. In Ramachandran, G. N., and Gould, B. S. (eds): Treatise on Collagen, Vol. 2, Part B. New York, Academic Press, p. 67, 1968.

GOLDSTEIN, J. I.; NEWBURY, D. E.; ECHLIN, P.; JOY, D. C.; ROMIG JR, A. D.; LYMAN, C. E.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. - Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. 2. ed. p. 1-19. Ed. Plenum Press. New York and London, 1994.

GOODMAN, E.M.; GREENEBAUM, B.; MARRON, M. T. - Effects of Eletromagnetic fields on molecules and cells. In: International Review of Cytology - vol 158 p. 279-325, 1995.

GRAY'S ANATOMY - Endocrine System - Section Editor: Mary Dyson. p. 1888-1889 e 1891. Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1995.

GREENSTEIN, B. - Endocrinology at a glance. p. 74-75, 92-93. Ed. Blackwell Science Ltda., 1994.

HAUSCHKA, P. V.; LIAN, J. B.; GALLOP, P. M. - Direct identificacion of the calcium-binding amino acid, γ -carboxyglutamate, in mineralized tissues. proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3925, 1975.

HEIDEL, G. - Ueber die Haeufigkeit des Vorkommens von Kalkkonkrementen im Corpus Pineal des Kindes. Anat. Anz. 116:139-154, 1965 (apud SCHMID & RAYKHTSAUM, 1995).

HUMBERT, W. & PEVET, P. - Calcium content and concretions of pineal glands of young and old rats : a scanning and X ray microanalytical study.-

Cell -Tissue - Res.; 263 (3): 593-6, 1991.

HUMBERT, W. & PEVET, P. - Calcium concretions in the pineal gland of aged rats: an ultrastructural and microanalytical study of their biogenesis. Cell- Tissue - Res; 279 (3) : 565-73, 1995.

HUMBERT, W. & PÉVET, P. - The pineal gland of the aging rat: Calcium localization and variation in the number of pinealocytes. J. Pineal Res 18:32-40, 1995.

JAPHA, J. L.; EDER, T. J.; GOLDSMITTHY, E. D. - Calcified inclusions in the superficial pineal gland of the mongolian gerbil. Acta. Anat. 94:553-544, 1976.

JUNQUEIRA, L. C. ; CARNEIRO, J. - Histologia Básica. 6. ed. p. 27-57, 235-251. Ed. Guanabara Koogan, 1985.

KAPPERS, J.A.- The Pineal Organ: An Introduction- The Pineal Gland. A Ciba Foundation Symposium- Churchill Livingstone, 1971.

KISS, J.; BANHEGYI, D.; CSABA, G. - Endocrine regulation of blood calcium. II. Relationship between the pineal body and the parathyroid glands. Acta med. hung. 26:363-370, 1969.

KITAY, J. & ALTSCHULE, M. - The pineal gland. Cambridge, Mass.: Harvard Univ. Press. 1954 apud. Binkley, S. - The pineal. Endocrine and nonendocrine function. p. 203. Ed. Prentice Hall, 1988.

KLEIN, R. L.; YEN, S. S.; THURESON-KLEIN, A. - Critique on the K-pyroantimonate method for semiquantitative estimation of cations in conjunction with electron microscopy. J. Histochem. Cytochem. 20:65-78, 1972.

KLEIN, C & HURLBUT JR., C.S.- Manual of Mineralogy. 32. ed. p. 272. Ed. John Wiley & Sons, Inc., 1993.

KLOEDEN, P. E. - Does a centralized clock for aging exist ? Gerontology 36:314-322, 1990.

KNIGHT, B. K.; HAYES, M. M. M.; SYMINGTON, R. B. - The pineal gland - a synopsis of present knowledge with particular emphasis on its possible role in control of gonadotrophin function. S. Afr. J. Anim. Sci. 3:143-146, 1973.

KRSTIC, R. - Pineal calcification: Its mechanism and significance. J. Neural Transm. Suppl. 21:415-432, 1986.

LEWY, A. J. - The pineal gland; in Cecil Textbook of Medicine. 20 a. ed. Ed. W. B. Saunders Company, 1996.

LINDE, A.; BHOWN, M.; BUTLER, W. T. - Noncollagen proteins of dentin: A reexamination of proteins from rat incisor dentin utilizing techniques to avoid artifacts. J. Biol. Chem. 255:5931, 1980.

LUBEN, R. A.; CAIN, C. D.; CHEN, M. C. Y.; ROSEN, D. M.; ADEY, W. R. - Effects of electromagnetic stimulate on bone and bone cells in vitro:

inhibition of responses to parathyroid hormone by low-energy low-frequency fields. *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4180-4184, 1982.

LUKASYK, A. & REITER, R. J. - Histopathological evidence for the secretion of polypeptides by the pineal gland- *American Journal of Anatomy* 143:451-464, 1975.

MABIE, C. P. & WALLACE, B. M. - Optical, physical and chemical properties of pineal gland calcifications. *Calc. Tiss. Res.* 16:59-71, 1974.

MACHADO, A.B.M. - *Neuroanatomia Funcional*. p. 189-190, 192-193. Atheneu Editora São Paulo Ltda., 1983.

MANN, S. - Molecular tectonics in biomineralization and biominetic materials chemistry. *Nature* 365:499-505, 1993.

MARTIN, J. H.; MATTHEWS, J. L. - Mitochondrial granules in chondrocytes, osteoblasts and osteocytes. *Clin. Oto.* 68:273, 1970.

MATTHEWS, J. L.; MARTIN, J. H. - Intracellular transport of calcium and its relationship to homeostasis and mineralization. *Am. J. Med.* 50:589, 1971.

MENIGOT, M; GAILLARD, G.; THIEBLOT, L. - Influence de la pinéalectomie sur le métabolisme calcique chez le rat. *J. Physiol., Paris* 62:suppl. 1, p. 189, 1970.

MOLLER, M.; GJERRIS, F.; HANSEN, H. J.; JOHNSON, E. - Calcification in a pineal tumour studied by transmission electron microscopy, electron diffraction and x-ray microanalysis. *Acta neurol. scandinav.* 59:178-187, 1979.

MORTON, D. J.; REITER, R. J. - Involvement of calcium in pineal gland function. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 197:378-383, 1991.

NEUMAN, W. F. - Bone material and calcification mechanisms. In Urist, M. R. (ed.) : *Fundamental and Clinical Bone Physiology*. Philadelphia, J. B. Lippincott, p. 83, 1980.

PALLADINI, G.; ALFEI, L.; APPICCIUTOLI, L. - Osservazioni isotochimiche sui corpora arenacea dell'epifisi umana. Arch. Anat. Embryol. 70:253-270, 1965.

PIZZARO, M. D. L.; PASTOR, F. E.; LOPEZ-GIL, A.; MUNOZ BARRAGAN, L. - Ultrastructural study of the distribution of calcium in the pineal gland of the rat subjected to manipulation of the photoperiod. Histochemistry 92:161-169, 1989.

PRICE, P. A.; OTSUKA, A. S.; POSER, J. W.; KRISTAPONIS, J.; RAMAN, N. - Characterization of a γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1447, 1976.

REITER, R. J.; MORGAN, W. W.; TALBOT, J. A. - Seizures in rats induced by pineal-ectomy: influence of diazepam, chlordiazepoxide, diphenylhydantoin and pineal substances. Archs int. Pharmacodyn. Thé. 202:219-230, 1973.

REITER, R.J. - Visible and non-visible eletromagnetic field exposure induced changes in pineal indoleamine metabolism. Advances in pineal research: 6.

Andrew Folders & R. J. Reiter eds, 1991. John Libbey & Co ltd pp.111-121, 1991.

REY, C. & GLIMCXHR, M.J. - Short Range Organization of the Ca-P Mineral Phase oin bone and Enamel - Changes with age and maturation- Chemistry and Biology of Mineral Tissues- Procedings of the fourth Internatinal Conference on the Chemistry and biology of mineralized Tissues held in Colorado, California Feb: 5-9 - Excerpta Medica, 1992.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S. - Pathologic Basis of Disease. p. 1168-1169. Ed. W. B. Saunders Company, 1994.

ROMER, A. S. & PARSONS, T. S. - Anatomia comparada dos vertebrados. p. 474-475, 502-503. Atheneu Editora São Paulo Ltda., 1985.

SADLER, T.W. - Langman's Medical Embriology - 7. ed.- International Edition Editado por Williams&Wilkins. P. 393, 1996.

SANDIK, R. - The relationship of thought disorders to third ventricle width and calcification of the pineal gland in chronic schizophrenic. *Int. J. Neurosc.* 68 (1-2): 53-9, 1993.

SAYEG, F. S.; SOLOMON, G. C.; DAVIS, R. W. - Ultrastructure of intracellular mineralization in the deer's antler. *Clin. Orthop.* 99:267, 1974.

SCHARENBERG, K.; LISS, L. - The histologic structure of the human pineal body. *Prog. Brain. Res.* 10:193-217, 1965.

SCHMID, H. A.; RAYKHTSAUM, G. - Age-related differences in the structure of human calcium deposits: Results of transmission electronmicroscope and mineralograhic microanalysis. *J. Pineal Res.* 18:12-20, 1995.

SEMM, P.; SCHNEIDER, T.; VOLLRATH, L.- Effects of na Earth-strength magnetic field on electrical activity of pineal cells. *Nature* vol 288 - 11, 1980.

SHAPIRO, I. M.; GREENSPAN, J. S. - "Are mitochondria directly involved in biological mineralization ?" *Calcif. Tiss. Res.* 3:100, 1969.

SHERIDAN, M. N.; REITER, R. J.; JACOBS, J. J. - An interesting anatomical relationship between the ramster pineal gland abd the ventricular system of the brain. J. Endocr. 45:131-132, 1969.

SIMSON, I. A. V.; SPICER, S. S. - Selective subcellular localization of cations withs variants of the potassium (pyro)-antimonate technique. J. Histochem. Cytochem. 23:575-598, 1975.

SOMLYO, A. P. - Cellular sites of calcium regulation. Nature 309:516-517, 1984.

TANDLER, C. J.; LIBANATI, C. S.; SANDRIS, C. A. - The intracellular localization of inorganic cations with potassium pyroantimonate. J. Cell. Biol. 45:355-366, 1970.

TAPP, E. & HUXLEY, M.- The histochemical appearance of the human pineal gland from puberty to old age. J. Pathol. Bact. 27:137-144, 1972.

TERMINE, J. D. - Chemical characterization of fetal bone matrix constituents. In Veis, A. (ed.): The Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissues. New York, Elsevier / North-Holland, p. 349, 1981.

THYBERG, J.; FRIBERG, U. - Ultrastructure and phosphatase activity of matrix vesicles and dense cytoplasmic bodies in the epiphyseal plate. J. Ultrastruct. Res. 33:554, 1970.

VEIS, A.; STETLER-STEVENSON, W.; TAKAGI, Y.; SABSAY, B.; FULLERTON, R. - The nature and localization of phosphorylated proteins of mineralized dentin. In Veis, A. (ed.): The Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissues. New York, Elsevier / North-Holland, p. 377, 1981.

VOLLRATH, L. - The pineal organ. p. 216-237. Springer - Verlag. Berlin, 1981.

WALZ, B. - Calcium _ sequestering smooth endoplasmic reticulum in retinula cells of the blowfly. J. Ultrastr. Res. 81:240-248, 1982.

WELSH, M. G.; REITER, R. J. - The pineal gland of the gerbil. I. An ultrastructural study. Cell. Tissue Res. 193:323-336, 1978.

WILDI, E.; FRAUCHINGER, E. - Modifications histologique de l'épiphyse humaine pendant l'enfance, l'âge adulte et le vieillissement. Prog. Brain Res. 10:218-233, 1965.

WUTHIER, R. E. - The role of phospholipids in biologic calcification. Clin. Orthoped. 90:191-200, 1973.

YAMADA, N.; IMAKITA, S.; SAKUMA, T.; TAKAMIYA, M - Intracranial calcification on gradient-echo phase image: description of diamagnetic susceptibility. Radiology 198 (1) : 171-8, 1996.

YAMAMOTO, I.; KAGEYAMA, N. - Microsurgical anatomy of the pineal region. J. Neurosurg 53:205-221, 1980.

ZUBAY, G. L.; PARSON, W. W.; VANCE, D. E. - Principles of biochemistry.
p.572-573. Ed. Wm. C. Brown Publishers, 1995.

ABSTRACT

The structure of human pineal gland was studied by optic microscopy, scanning electron microscopy, spectrometer x-ray scanning electron microscopy with energy dispersion (EDS). The tissues to analysis by optic microscopy were fixed in formalin at 10 % during 48 h and put in paraffin.

For S.E.M., the tissues were fixed in modified Karnovsky solution, and a part of the material was fractured in liquid nitrogen to analysis of internal characteristic of the pineal body. The results showed that the pineal body has calcareous concretion distributed in the connective tissue. In the internal position, the calcareous structure was made of concentric lamellae with amorphous aspect. The x-ray diffractor showed the crystalline structure of the atom arrangement of the elements that compose the calcareous concretions.