

Comparação do número de corpos neuronais de áreas do córtex cerebral de cães

Comparison of the neuron body number of areas brain cortex of dogs

Alessandra ESTEVES¹;
Irvênia Luiza de Santis
PRADA¹;
Ana Flávia de CARVALHO¹

1- Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo - SP

Correspondência para:

IRVÊNIA LUIZA DE SANTIS PRADA
Departamento de Cirurgia
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária Armando Sales de Oliveira
05508-270 - São Paulo - SP
le.steves@bol.com.br

Recebido para publicação: 27/11/2003
Aprovado para publicação: 18/05/2004

Resumo

Foram utilizados 10 encéfalos de cães sem raça definida, 5 machos e 5 fêmeas, com peso entre 8-12 kg, com características constitucionais do crânio semelhantes (mesaquiécéfalos). Dos encéfalos foram retirados fragmentos das diferentes áreas cerebrais, que foram preparados segundo técnica histológica convencional e corados por violeta cresil modificada, para evidênciação dos corpos de neurônios. Através da análise morfométrica, foram buscados dados comparativos, principalmente entre as diferentes áreas cerebrais; hemisférios cerebrais direito e esquerdo e entre os sexos, para o conhecimento do comportamento e da quantidade de corpos de neurônios. As lâminas foram analisadas com auxílio do Axioscópico Zeiss® acoplado ao programa de análise de imagens KS-400 Zeiss®. Os resultados encontrados foram que os machos apresentam maior quantidade de corpos de neurônios no hemisfério cerebral direito (16,71). Já nas fêmeas as proporções foram inversas, apresentando maior quantidade de neurônios no hemisfério cerebral esquerdo (17,46), quando comparados as diferentes áreas cerebrais. Os cães apresentaram maiores quantidades de corpos de neurônios na área visual (19,77), seguida da comportamental ou límbica (18,37) e entre as outras áreas cerebrais não verificou-se diferenças significativas.

Palavras-chave:

Cães.
Córtex cerebral.
Neurônios.
Comparação.
Morfometria.

Introdução

Quando relacionamos a forma à função, podemos inferir dados que nos levam a imaginar hipóteses e desvendar mistérios. Desta maneira, a ciência morfológica está intimamente envolvida neste aspecto. Vários estudos sobre a forma dos cérebros, dimensão, volume têm sido feito através dos anos. Rabinowiz et al.¹ publicaram um trabalho muito polêmico sobre a contagem de neurônios e seus processos no homem e na mulher, descobrindo que o homem possui mais neurônio e a mulher, maior quantidade de processos entre neurônios, ou seja, maior número de sinapses.

Estes e muitos outros fatos nos

levaram a desenvolver este projeto em cães, contando em colaborar com mais dados sobre este assunto. O tecido nervoso é composto basicamente de dois tipos celulares que são os neurônios e as células gliais ou da neuroglia, sendo o neurônio a unidade funcional fundamental, com a função básica de receber, processar e enviar informações.²

Sendo assim, nosso estudo propõe quantificar os neurônios da espécie canina SRD (sem raça definida) de diferentes regiões cerebrais de um grupo de animais de peso, idade e constituição anatômica semelhante, para que possamos inferir dados sobre áreas comportamentais ligadas à libido, a visão, olfato, tato, audição, locomoção, gosto e comparar, entre si a quantidade de neurônios em cada uma dessas regiões e sexos distintos.

Materiais e Métodos

Foram coletados 10 encéfalos de cães SRD, dos quais 5 machos e 5 fêmeas. Os animais foram gentilmente cedidos pelo CCZ (Centro de controle de zoonoses) de São João da Boa Vista para a Faculdade de Medicina Veterinária Octávio Bastos onde foi realizada grande parte do experimento. Para diminuir a variação entre os animais, estes foram pesados ainda vivos e estipulamos que deveriam pesar entre 8-12 kg de peso vivo, e deveriam possuir características constitucionais do crânio semelhantes (mesaquicéfalos).

Após a utilização destes animais nas aulas de técnica cirúrgica, eles foram ortotanasiados (*orto*, no sentido de adequada), iniciando-se então o procedimento de coleta. Uma vez isolada a cabeça do animal a artéria carótida comum foi canulada nos dois antímeros, para efetuar-se a perfusão com 4% de formaldeído em solução tampão fosfato pH 7,4 (Paraformaldehyde – Sigma Chemical Co. USA). As cabeças foram abertas e os encéfalos foram retirados para pesagem e compilação dos dados. Finalmente estes encéfalos foram armazenados em vidros de coleta devidamente identificados com peso corpóreo e encefálico, sexo e letra para identificação do animal, contendo 4% de formaldeído (Paraformaldehyde – Sigma Chemical Co. USA) em solução de tampão

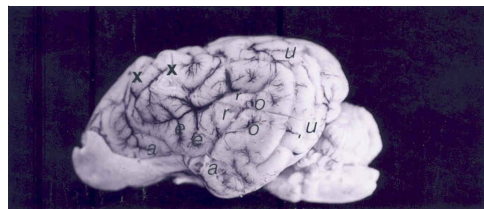


Figura 1
Fotografia da vista lateral esquerda do encéfalo de cão onde a corresponde à área olfatória; r – área tátil; x – área motora; e – área gustativa; o – área auditiva; u – área visual

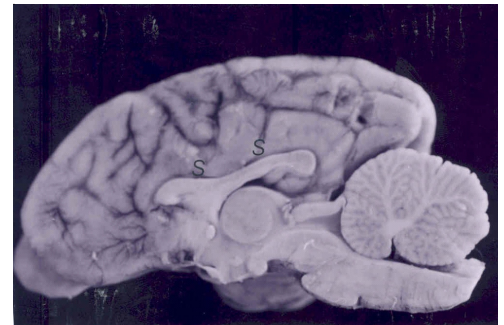


Figura 2
Fotografia da face medial do hemisfério cerebral direito e da superfície do corte sagital mediano, onde S corresponde ao giro do cíngulo que apresenta relação comportamental ou límbica

fosfato pH 7,4. Em cada encéfalo definimos diferentes sítios do córtex cerebral, nos dois hemisférios cerebrais.^{3,4} Foram retiradas amostras homólogas destes locais medindo 2 X 0,5 X 1,0 cm (Figuras 1 e 2).

Os fragmentos foram processados seguindo-se a sequência histológica convencional: desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em histosec® (Merck)⁵. Cada região foi emblocada e cortada com espessura de 5mm em um micrótomo Leica 2165. De cada região foram feitos cinco cortes. A coloração utilizada foi o técnica de violeta cresil modificada para facilitar a visualização dos Corpúsculos de Nissl dos neurônios e assim possibilitar sua contagem.

O Protocolo da técnica de violeta cresil modificada seguiu a sequência de coloração em dois banhos de xilol, dois banhos de álcool absoluto, álcool 90%, álcool 70%, água destilada por cinco minutos consecutivamente as lâminas foram imersas em uma cuba contendo violeta cresil onde ficou por cinquenta minutos em uma estufa a 60°C, posteriormente reidratamos o tecido em álcool 95% acético, álcool absoluto, álcool absoluto rapidamente e então novamente dois banhos de Xilol por cinco minutos.

As lâminas foram examinadas ao aumento de vinte vezes, com auxílio de um microscópio óptico Axíoscopio Zeiss ®,

acoplado a uma câmera de vídeo e monitor de um computador. Os cortes foram submetidos a um sistema KS-400 versão 2.0 Kontron – Zeiss®, analisando-se a quantidade de neurônios expressa em números por área escolhida, através da contagem manual⁶. Para a análise morfométrica, foram selecionados cinco cortes contínuos por região totalizando 65 cortes em cada hemisfério cerebral e 130 cortes por animal, somando-se ao final 1300 cortes, seguindo-se então a mensuração manual com o auxílio de um retículo desenhado em uma transparência e inserido no monitor do computador para facilitar a contagem dos neurônios de cada área. Em cada corte foram contados cinco campos distintos, obtendo-se deles uma média; das cinco médias obteve-se uma média final para compilação da análise estatística.

Para as análises estatísticas, utilizou-se o procedimento PROC ANOVA do programa SAS⁷. Dois modelos foram adotados nas análises, visando a obtenção de comparações de particular interesse. O modelo 1 foi utilizado para verificar o comportamento do número de neurônios em relação às possíveis áreas avaliadas. Para tal análise adotou-se o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ij} = m + a_i + s_j + r_k + sr_{jk} + e_{ijkl}$$

em que,

y_{ijkl} = valor observado do número de neurônio na do k-ésima área, do animal de sexo j-ésimo, no i-ésimo animal;

m = média geral;

a_i = efeito do i-ésimo animal avaliado, sendo $i = 1, 2, \dots, 10$;

s_j = efeito do j-ésimo sexo, sendo do animal, sendo $j = 1$ (macho) e 2 (fêmea);

r_k = efeito da k-ésima área cerebral, sendo $k = 1$ (motora), 2 (visual), $\dots, 7$ (comportamental ou límbica);

sr_{jk} = efeito da interação do j-ésimo sexo com a k-ésima área cerebral;

e_{ijkl} = erro aleatório inerente à observação y_{ijkl}

O modelo 2 foi utilizado para

verificar o comportamento do número de neurônios em relação aos hemisférios cerebrais, em relação a todas as áreas e dentro da área 7 (comportamental ou límbica). Nesta análise adotou-se o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ij} = m + a_i + s_j + h_k + sh_{jk} + e_{ijkl}$$

em que,

y_{ijkl} = valor observado do número de neurônio na do k-ésimo hemisfério, do animal de sexo j-ésimo, no i-ésimo animal;

m = média geral;

a_i = efeito do i-ésimo animal avaliado, sendo $i = 1, 2, \dots, 10$;

s_j = efeito do j-ésimo sexo, sendo do animal, sendo $j = 1$ (macho) e 2 (fêmea);

r_k = efeito da k-ésimo hemisfério cerebral, sendo $k = 1$ (direito) e 2 (esquerdo);

sr_{jk} = efeito da interação do j-ésimo sexo com a k-ésimo hemisfério cerebral;

e_{ijkl} = erro aleatório inerente à observação y_{ijkl}

Quando verificado efeito significativo ($P < 0,05$) na análise de variância entre os grupos comparativos para as diferentes variáveis estudadas, utilizou-se o Teste de Tukey para discriminar as diferenças e/ou igualdades entre as médias avaliadas.

Resultados

As médias de corpos de neurônios entre as áreas foram comparadas estatisticamente pela Análise de variância tabela 1, mostrando que as comparações feitas das médias dos corpos de neurônios contados entre os animais estudados foram altamente significativas. Já a média entre os dois sexos estudados nas diferentes áreas não se apresentou estatisticamente significativa.

Também comparamos machos e fêmeas, utilizando como amostragem $n = 5$ para cada sexo e seguindo os padrões descritos em Materiais e Métodos. Foi observado que não há diferença estatística significativa entre as médias do número de

Tabela 1

Resumo da Análise de Variância segundo animal, sexo, área e interação sexo x área - São Paulo – 2003

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Animal	9	188,36	9,33 **
Sexo	1	0,00	0,00 **
Área	6	113,93	5,64 **
Interação Sexo x Área	6	20,15	1,00 **
Resíduo	237	20,18	

** = Resultado significativo (P < 0,01); n.s = Resultado não significativo (P > 0,05)

Tabela 2

Resumo das Análises de Variância segundo animal, sexo, antímero cerebral e interação sexo x antímero cerebral – São Paulo – 2003

Comparação	Grado de liberdade	Quadrado médio	F
Animal	9	213,16	9,76 **
Sexo	1	15,60	0,71 **
Antímero cerebral	1	4,49	0,21 **
Interação Sexo X Antímero	1	160,76	7,36 **

** = Resultado significativo (P < 0,01); n.s = Resultado não significativo (P > 0,05)

Tabela 3

Médias de corpos de neurônios/campo no aumento de 20x em microscópio óptico, nas diferentes áreas corticais cerebrais - São Paulo - 2003

Áreas	Dados	Médias	Comparações *
Visual	40	19,77	A
Comportamental	40	18,37	A B
Olfatória	40	16,50	B
Auditiva	40	15,53	B
Táctil	40	15,31	B
Gustativa	40	15,18	B
Motora	40	15,00	B

Médias das comparações em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 4

Comparação das médias entre os sexos e entre os dois antímeros cerebrais – São Paulo – 2003

Comparação *	Sexo	Antímero	N	Média	Desvio Padrão
A	M	D	65	16,71	6,44
B	M	E	65	13,40	5,38
B	F	D	65	15,62	4,54
A	F	E	65	17,46	4,79

Médias das comparações em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade

corpos de neurônios das diferentes áreas, entre os dois sexos pela Análise de variância. Entretanto os efeitos comparativos entre os animais e a interação sexo x antímero cerebral revelou diferenças estatísticas altamente significativas na quantidade de corpos de neurônios, tabela 2.

Através de comparações pelo Teste de Tukey observamos que nas áreas visual, comportamental ou límbica foram contados os maiores números de corpos de neurônios. Entre estas duas áreas não houveram diferenças significativas estatisticamente. Porém, quando comparadas com as demais áreas (motora, auditiva, táctil e gustativa) houve diferença estatística significativa.

Estes achados evidenciam que a área visual do cão é a que possuiu o maior número de corpos de neurônios (19,77) não diferindo da área comportamental ou límbica (18,37), as quais diferem das demais áreas do córtex cerebral, tabela 3.

Entre os hemisférios cerebrais (antímeros) direito e esquerdo houve diferença estatística significativa entre médias do número de corpos de neurônios. Nos machos ocorreu um maior número de corpos de neurônios no antímero direito do que no antímero esquerdo ao contrário das fêmeas cujas relações se invertem, tabela 4.

Discussão

Vários estudos morfométricos foram realizados nos últimos anos, visando obter respostas sobre os segredos do sistema nervoso central relacionado com comportamento, especialmente na medicina humana^{8,9,10}, o que nos embasou para trabalharmos da mesma maneira, porém com animais domésticos, mais especificamente o cão sugerindo correlações entre o comportamento animal e dados morfométricos relacionados ao sistema nervoso central.

Freeman e Tancred⁴; Hughes¹²; Peterson e Ulinski¹³ analisaram o número e distribuição de células ganglionares na retina do gambá rabo de escova, gato e tartaruga,

respectivamente, seguindo a metodologia de fixação e coloração já descritas. Em nossos estudos, em relação às colorações utilizadas, pudemos observar, empiricamente, que os corpos de neurônios de cães se coraram mais facilmente pela técnica de violeta cresil modificada, diferindo da técnica empregada por estes autores. Tal fato se deva que os Corpúsculos de Nissl presentes no corpo de neurônio seja mais facilmente corado pelo violeta cresil que pelas outras técnicas de coloração.

Pakkenberg e Gundersen¹⁴ compararam o número de neurônios em neocórtex de humanos, relacionando com as variáveis sexo e idade e observaram que há uma perda na quantidade de neurônios em indivíduos com idade acima de 70 anos; diferenças entre os sexos também foram pesquisadas, sendo que os homens apresentaram quantidades maiores de neurônios e maior peso encefálico que as mulheres. Em nosso estudo, ao analisarmos o número de corpos de neurônios das diferentes áreas corticais e o relacionarmos ao sexo, observamos diferença no número de neurônios entre os hemisférios cerebrais direito e esquerdo e não no número total de corpos de neurônios contados, ou seja, observamos que cães machos apresentam maior quantidade de neurônios no hemisfério cerebral direito e cães fêmeas apresentam uma maior quantidade de neurônios no hemisfério cerebral esquerdo. Esses dados podem sugerir de que cães machos utilizam mais do que se esperava, as funções emocionais, enquanto as fêmeas também mais do que se esperava, o contingente racional. Podemos também sugerir que este comportamento esteja relacionado com as tarefas que cada sexo desempenha, como exemplo cuidar dos filhotes, caçar para se alimentar e alimentar os filhotes (fêmeas), conquista da parceira para o acasalamento, defesa do seu território e de proteção e defesa da matilha (machos).

Rabinowicz et al.¹⁰ estudaram as estruturas do córtex cerebral de homens e mulheres. Neste trabalho eles utilizaram seis

encéfalos de homens e cinco de mulheres, sendo que em cada encéfalo foram considerados 86 locais escolhidos para contagem e então foram analisados em oito campos ao microscópio óptico. Os dados confirmaram que há maior número de neurônios nos homens que nas mulheres. Foi também observado que a quantidade de neurônios no hemisfério cerebral esquerdo no grupo das mulheres é maior, pois foram achados indicativos que existem diferenças na estrutura do córtex cerebral humano, mostrando que no grupo dos homens os neurônios são menores, enquanto nas mulheres os neurônios são maiores. Neste presente estudo pudemos indicar que não há diferenças nas quantidades totais de neurônios, entretanto quando relacionamos as diferentes áreas cerebrais de cada animal pudemos observar que também há uma diferença na quantidade de neurônios. Esta diferença pode ser apresentada por várias causas dentre elas: diferenças de idade entre os animais aqui estudados, parentesco com alguma raça e até mesmo diferenças individuais que cada animal tem, ou seja, podemos inferir então que cada animal tem sua personalidade e “inteligência”, ou seja, que os animais não são todos iguais. Foram feitas análises entre as diferentes áreas (visual, auditiva, olfatória, motora, tátil, gustativa e comportamental ou límbica) a fim de obtermos qual seria a área com maiores quantidades de corpos de neurônios, o que, nos indicaria que os cães, indiferente de sexo apresentaram maiores quantidades na área visual seguidas da comportamental ou límbica. Isso nos levou a acreditar que o cão utilize a visão como meio de detectar o que se passa à sua volta, para então posteriormente utilizar o comportamento na sua orientação/reorientação e a partir daí, abrir mão de outros órgãos do sentido. A área comportamental ou límbica mostrou ser a segunda região com maior número de corpos de neurônios, o que nos sugere que o animal utilize a área comportamental com maior frequência do que imaginamos e sem dúvida alguma consiga interpretar tudo o que

o margêa. Isto também nos leva a crer que os animais apresentam quantidades expressivas nesta área devido à função que cada raça desempenha na natureza animal, as diferenças comportamentais e as características das funções reprodutivas que cada sexo apresenta.

Conclusões

A análise crítica do nosso estudo nos leva a concluir que há diferença significativa na quantidade de corpos de neurônios nos diferentes sexos estudados em relação aos antímeros cerebrais e entre as áreas cerebrais; ou seja, a quantidade de corpos de neurônios nos machos é maior no hemisfério cerebral direito (antímero); entretanto, nas fêmeas, a

quantidade de neurônios é mais expressiva no hemisfério cerebral esquerdo; quando comparamos as diferentes áreas cerebrais de ambos os sexos (visual, auditiva, olfatória, tátil, motora, gustativa e comportamental ou límbica), observamos que há diferença significativa de área para área, sendo que a área visual é a área com maior número de corpos de neurônios, seguida da área comportamental ou límbica; quando comparamos as diferentes áreas do córtex cerebral de ambos os sexos dos cães estudados também concluímos que há diferença significativa de animal para animal; não observamos diferença significativa na quantidade de corpos de neurônios entre área cerebral e sexo, ou seja, não há diferença entre os sexos na quantidade total de corpos de neurônios.

Abstract

For this study, 10 brain of mongrel dogs, 5 males and 5 females, weighing between 8-12 Kg, with constitutional characteristics of cranium similar (mesocephalus), were collected. They were prepared according to conventional histological technique and stained by modified violet cresil, for becoming evident the neurons bodies. Through the morphometric analysis, comparative data were reached, mainly between the different bodies areas; brain right and left hemisphere and between the sex, for the knowledge of the arrangement and the quantity of the neuron bodies. The slides were analyzed with the aid of Axioscópico Zeiss®. The results showed that males had major quantity of the neuron bodies in brain right hemisphere (16,71). Once in females the rate were contrary, showing major quantity of neuron bodies in brain left hemisphere (17,46), when compared the different brain areas. The dogs showed major quantity of the neuron bodies in the visual area (19,77), following by the comportamental or limbic area (18,37) and between others areas did not show significant difference.

Key-words:
Dogs.
Brain cortex.
Neurons.
Comparison.
Morfometric.

Referências

1. RABINOWICZ, T.; DEAN, D. E.; PETETOT, J. M. C.; MYERS, G. M. C. Gender differences in the human cerebral cortex: more neurons in males; more processes in fema. *Journal of Child Neurology*, v. 14, n. 2, p. 98-107, 1999.
2. MACHADO, C. R. S. Tecido nervoso. In: MACHADO, A. *Neuroanatomia funcional*. 2. ed. São Paulo: Ateneu, 2000. p. 7-12.
3. BÖHME, G. *Lehrbuch der anatomie der haustiere: nervensystem, sinnesorgane endokrine drüsen*. Berlin: Verlag Paul Parey, 1984. p. 149-150.
4. VON ECONOMO C.; KOSKINAS G. N. *Die cytoarchitectonik der hirnrinde des erwachsenen menschen*. Vienna: Verlag Julius Springer, 1925.
5. BEHMER, O. A.; TOLOSA, E.; FREITAS, A. G. N. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: EDART, 1976. p. 241.
6. MICHON, J. J. et al. A comparative study of methods of photoreceptor morphometry. *Investigative Ophthalmology e Visual Science*, v. 32, n. 2, p. 280-284, 1991.
7. SAS INSTITUTE. *SAS user's guide: basic and statistic*, Version 6.12. Cary: SAS, 1995. 1686 p.

8. HUGHES, C. C. W.; LANTOS, P. L. A morphometric study of blood vessel, neuron and glial cell distribution in young and old rat brain. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 79, p. 101-110, 1986.
9. PETITE, D.; CALVET, M. C. Morphometric characteristics of cryopreserved mesencephalic dopan neurons in culture. **Brain Research**, v. 769, n. 1, p. 1-12, 1997.
10. RABINOWICZ, T. et al. Structure of the cerebral cortex in men and women. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 61, n. 1, p. 46-67, Jan 2002.
11. FREEMAN, B; TANCREDE, E. The number and distribution of ganglion cells in the retina of the Brush tailrd Possum, *Trichosurus Vulpecula*. **Journal of Comparative Neurology**, Philadelphia, v. 177, p. 557-568, 1978.
12. HUGHES, A. A quantitative analysis of the cat retinal ganglion all topograph. **Journal of Comparative Neurology**, v. 163, p. 107-128, 1979.
13. PETERSON, E. H.; ULINSKI, P. S. Studies of retinal ganglion cells in a turtle *Pseudemys Scripta elegans*. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 186, p. 17-41, 1979.
14. PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H. J. G. Neocortical neuron number in humans: effects of sex and age. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 384, p. 312-320, 1997.
15. ESTEVES, A. Análise morfológica comparativa do número de corpos de neurônios em áreas do córtex cerebral de cães. 2003. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.