



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ANDRÉ SANTOS LEONARDO

DESCRIÇÃO MORFOQUANTITATIVA E MICROESTRUTURAL DA GLÂNDULA
PINEAL DE BOVINOS

Monografia apresentada para a conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Brasília- DF
Dezembro, 2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ANDRÉ SANTOS LEONARDO

DESCRIÇÃO MORFOQUANTITATIVA E MICROESTRUTURAL DA GLÂNDULA
PINEAL DE BOVINOS

Monografia apresentada para a conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Orientador
Eduardo Maurício Mendes de Lima

Brasília- DF
Dezembro, 2013

Santos-Leonardo, André

DESCRIÇÃO MORFOQUANTITATIVA E MICROESTRUTURAL DA
GLÂNDULA PINEAL DE BOVINOS / André Santos Leonardo; orientação
de Eduardo Maurício Mendes de Lima. – Brasília, 2013.

14 p. : il.

Monografia – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária, 2013.

1. Células da glia. 2. Concreções calcárias. 3. Mastócitos. 4. Microscopia quantitativa. 5. Pinealócitos.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: André Santos Leonardo

Título da Monografia de Conclusão de Curso: **DESCRIÇÃO MORFOQUANTITATIVA E
MICROESTRUTURAL DA GLÂNDULA PINEAL DE BOVINOS**

Ano: 2013

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: André Santos Leonardo.

Título: DESCRIÇÃO MORFOQUANTITATIVA E MICROESTRUTURAL DA
GLÂNDULA PINEAL DE BOVINOS (*Bos taurus*)

Monografia de conclusão do Curso de Medicina
Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Professor Doutor Eduardo Maurício Mendes de Lima

Professor Doutor Marcelo Ismar Santana

Médico veterinário André Rodrigues da Cunha Barreto-Vianna

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos pelo incentivo, cooperação, apoio, paciência, sacrifícios e amor incondicional que sempre me dedicaram.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria do Carmo e Marivaldo, e irmãos, Alynne e Tiago, por me amarem de tal maneira a ponto de me fazer crer ser capaz de fazer qualquer coisa que queira. A minha mãe que me fez admirá-la pela coragem e sabedoria de se manter firme, apesar de todas as adversidades da vida, agradeço pelo carinho, conversas, atenção, pelo amor, incentivo, pela confiança, pelo exemplo de vida, pela alegria e pelo apoio incondicional. Obrigado por me fazerem chegar até aqui.

Sem uma pessoa, em especial, o caminho teria sido difícil. Ao Guilherme, pela dedicação, por estar ao meu lado fazendo com que a passagem pelos obstáculos se tornasse mais amena e possível, pelas conversas que me fizeram manter os pés no chão quando tive vontade de jogar tudo para o alto, por me ajudar nas provas estudando coisas que você nunca vai usar na sua vida. Obrigado, muito obrigado.

Aos meus amigos da graduação, que levarei comigo para aonde for, Karina, Yonara, André, Keila, Veronica, Pedro, Saulo, Luana, Beatrice, Maryna, Cristiano e Susy, vocês tem o meu respeito e apreço. Obrigado pelos conselhos, incentivos, por me fazerem rir e continuar em frente. Muito obrigado pelo companheirismo, pela amizade, pelos momentos de aprendizado, que não foram poucos, pelos almoços, idas ao cinema, programas de índio, por suportarem meu mau-humor nas saídas a campo ou nas aulas “divertidas e didáticas”. Agradeço profundamente e espero continuarmos juntos por um bom tempo.

Ao pessoal da Casa da Mãe Joana, popularmente conhecida como Senzala ou Laboratório de Anatomia, por todo apoio e preocupação não só comigo, mas com minha família. Aos desorientados por tornarem os dias na Senzala mais divertidos, aos pós-graduandos pela confiança, ao Marcelo pelos comentários e incentivo e a Fabieni e Cínthia por tentarem me ensinar a viver em um ambiente bagunçado, embora não tenha dado muito certo. Eduardo, obrigado por ser meu mestre, amigo e espelho, pela grande dedicação, por sanar dúvidas e medos, pelos conselhos e broncas, por estar sempre pronto para me ajudar, por cuidar da minha formação profissional e pessoal, por depositar em mim toda a confiança necessária para que eu seguisse me frente.

Aos técnicos e ex-técnicos dos laboratórios por onde passei. Lícia e Lili, que sempre responderam minhas perguntas sobre as colorações e processamento de material, me ajudaram com minhas lâminas intermináveis e por confiarem tanto em mim mesmo sabendo que a qualquer momento posso explodir o laboratório. César, sempre pronto para me ajudar com as peças e a "torturar" os alunos durante as provas. Paulo por ter aturado o meu mau-humor, principalmente, nas segundas de manhã!

Aos meus demais professores e orientadores, obrigado pela oportunidade e aprendizado. Entre eles gostaria de agradecer especialmente ao Márcio e Luciana pela disponibilidade, estímulo e sobretudo por terem acompanhado de perto e com entusiasmo os meus primeiros passos durante as padronizações das imuno-histoquímicas, pelas dicas preciosas, além de serem sempre solícitos. Obrigado por terem despertado em mim o interesse por técnicas moleculares, fazendo com que meu horizonte se ampliasse.

SUMÁRIO

1. Resumo.....	8
2. Abstract.....	9
3. Introdução.....	10
4. Materiais e Métodos.....	10
5. Resultados.....	11
6. Discussão.....	12
7. Conclusão.....	13
8. Referências Bibliográficas.....	13

RESUMO

Pesquisadores acreditavam que a pineal, em vertebrados superiores, era um órgão que atrofiou durante a evolução, originando um apêndice epitalâmico sem muita função até a descoberta do efeito regulador que essa glândula exerce em diversos órgãos e sistemas através da produção de melatonina. Devido à relação deste órgão com ciclos circadiano e reprodutivo, a atuação da glândula pineal sobre o comportamento sexual e maturação gonadal é bastante estudada, porém estes estudos são direcionados para o aspecto funcional da glândula abordando assuntos relacionados a bioquímica, fisiologia e farmacologia da glândula. O presente estudo avaliou os aspectos morfoquantitativos e qualitativos da glândula pineal em bovinos adultos. Seis bovinos, de ambos os sexos e sem sinais clínicos relacionados a afecções do sistema nervoso participaram deste estudo. O encéfalo teve a meninge rebatida permitindo assim que as glândulas pineais fossem isoladas e removidas por meio de secção sagital, sendo posteriormente acondicionadas em solução aquosa de formol a 10% por 48 horas e submetidas à técnica histológica convencional. Para a avaliação morfoquantitativa foram empregadas as colorações Hematoxilina -Eosina, Azul de Toluidina e *Picrosirius red*. Os dados obtidos foram submetidos à estatística descritiva para obtenção da média e desvio-padrão, seguido da aplicação de um teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*, análise de variância (ANOVA) “one way” e pós-teste Holm Sidask's. Em todos os casos o nível de significância $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As glândulas pineais mostraram-se constituídas fundamentalmente por pinealócitos ($71,52 \pm 3,39\%$), células da glia ($20,6 \pm 4,51\%$), vasos sanguíneos ($5,65 \pm 0,98\%$) e tecido conjuntivo ($2,23 \pm 0,14\%$) havendo diferença estatística ($p < 0,05$) entre todos os tecidos analisados e não sendo observadas a presença de mastócitos ou concreções calcárias.

PALAVRAS-CHAVE: Células da glia. Concreções calcárias. Mastócitos. Microscopia quantitativa. Pinealócitos.

ABSTRACT

The present study evaluated the morphoquantitative and qualitative aspects of the pineal gland in adult cattle. Six cattle of both sexes and without clinical signs related to diseases of the nervous system participated in this study. The brain had the meninges removed thus allowing that we isolated and removed the pineal glands through of a sagittal section, and after placed in an aqueous solution of 10% formalin for 48 hours and subjected to conventional histological technique. For morphoquantitative evaluation, we employed the colorations Hematoxilin-eosin, Toluidine blue and Picrosirius red. To evaluate the data, we used descriptive statistics to get the mean and standard deviation, followed by the application of a test of Kolmogorov-Smirnov test, analysis of variance (ANOVA) "one way" and and post-hoc Holm-Sidak test. In all cases, we considered the significance level of $p \leq 0.05$ statistically significant. The pineal glands were constituted mainly of pinealocytes ($71.52 \pm 3.39\%$), glial cells ($20.6 \pm 4.51\%$), blood vessels ($5.65 \pm 0.98\%$) and connective tissue ($2.23 \pm 0.14\%$) with statistical difference ($p < 0.05$) in all tissues analyzed and the presence of mast cells or calcareous concretions not being observed.

KEY WORDS: Calcareous concretions. Glial cells. Pinealocytes Quantitative microscopy.

INTRODUÇÃO

A glândula pineal tem origem no tubo neural e está localizada no diencéfalo, sendo descrita como parte do epitalamo. Na maioria dos mamíferos apresenta uma forma piramidal, situando-se dorsalmente ao tronco encefálico e rostralmente aos corpos quadrigêmeos (Moller e Baeres, 2002). Microscopicamente, a glândula pineal de mamíferos possui dois tipos de células no parênquima- os pinealócitos, que correspondem a maioria das células do parênquima e são responsáveis pela secreção de melatonina, e as células da glia que atuam como células de suporte, moderada quantidade de tecido conjuntivo, além de um estroma onde se localizam os vasos sanguíneos e fibras simpáticas pós-ganglionares (Hullinger,2012).

Pesquisadores acreditavam que a pineal, em vertebrados superiores, era um órgão que atrofiou durante a evolução, originando um apêndice epitalâmico sem muita função até a descoberta do efeito regulador que essa glândula exerce em diversos órgãos e sistemas através da produção de melatonina (Lenner et al., 1958). Nos mamíferos, a glândula pineal está envolvido na regulação fotoperiódica do ritmos biológicos endógenos, funcionando como um relógio biológico juntamente com o núcleo supraquiasmático modulando o ritmo de funções neuroendócrinas relacionadas, por exemplo, com o ciclo sono-vigília e atividades reprodutivas e metabólicas de várias espécies (Chattoraj et al.,2009).

Devido à relação deste órgão com ciclos circadiano e reprodutivo, a atuação da glândula pineal sobre o comportamento sexual e maturação gonadal é bastante estudada, porém estes estudos são direcionados para o aspecto funcional da glândula abordando assuntos relacionados a bioquímica, fisiologia e farmacologia da glândula (Silvino et al., 2000). Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a microestrutura da glândula pineal de bovinos determinando de modo quantitativo a presença dos pinealócitos, gliócitos, vasos e tecido conjuntivo, bem como de modo qualitativo a presença de mastócitos e concreções calcárias.

MATERIAL E MÉTODOS

Seis bovinos adultos, de ambos os sexos e hígidos participaram deste estudo. O encéfalo, obtidos a partir de necropsias de interesse didático, teve a meninge rebatida permitindo assim que as glândulas pineais fossem isoladas e removidas por meio de secção sagital, sendo posteriormente acondicionadas em solução aquosa de formol a 10%

por 48 horas e submetidas à técnica histológica convencional. Com uso do micrótomo manual (Leica RM 2125RT) foram produzidos cortes histológicos com 4µm de espessura, posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina para quantificar os vasos sanguíneos, gliócitos e pinealócitos e *Picrosirius red* para quantificar o tecido conjuntivo. Na avaliação da presença de concreções calcárias e mastócitos foram utilizados Hematoxilina-Eosina e Azul de Toluidina, respectivamente.

Utilizando um microscópio óptico *BX51 Olympus*[®] acoplado ao programa de captura e análise de imagens *ProgRes*[®] *Capture Pro 2.5* foram obtidas fotomicrografias de campos distintos e aleatórios. Através do programa *STEPanizer*[®], usando um sistema teste de pontos, foram determinadas as proporções do número de vasos, pinealócitos e células da glia e para a quantificação do tecido conjuntivo foi empregado o programa de análise de imagens *Image Pro Plus.6.0*[®].

Os dados obtidos foram submetidos à estatística descritiva para obtenção da média e desvio-padrão, seguido da aplicação de um teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*, análise de variância (ANOVA) “one way” e pós-teste Holm Sidask, utilizando-se para isto o programa de análise estatística *GraphPad Prism*[®] 6. Em todos os casos o nível de significância $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

A glândula pineal esteve envolvida por uma fina cápsula de tecido conjuntivo que emitia septos incompletos para o interior do parênquima, sem a formação de um padrão lobular, que foram acompanhados por estruturas vasculares (Figura 1B). O parênquima foi formado por células da glia e pinealócitos, não sendo observadas a presença de mastócitos ou concreções calcárias. A distinção entre essas células foi realizada de acordo com as características de coloração de seus núcleos. Pinealócitos foram caracterizados como células arredondadas, com citoplasma claro, abundante e acidófilo e um grande núcleo redondo enquanto as células da glia foram caracterizadas por seus núcleos pequenos com uma coloração escura (Figura 1A). As células estiveram distribuídas uniformemente por toda a glândula pineal e grandes vasos sanguíneos foram observados na cápsula do órgão, sendo a maior parte dos vasos sanguíneos encontrados nas trabéculas do tecido conjuntivo e capilares sanguíneos entre pinealócitos e células glias.

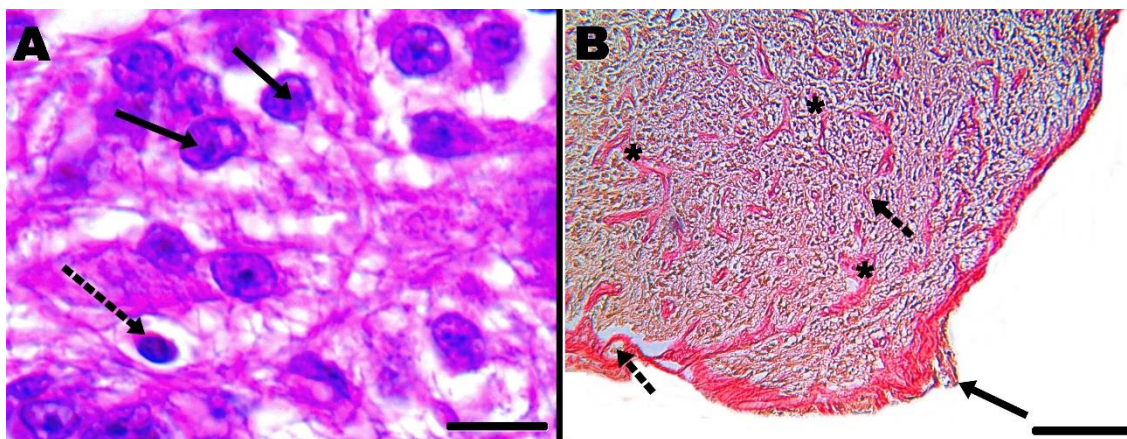


Figura 1. Fotomicrografias do parênquima da glândula pineal de bovinos. A- Pinealócitos (setas) e célula da glia (seta incompleta) corados por Hematoxilina-eosina; B- cápsula de tecido conjuntivo (seta) emitindo septos irregulares e incompletos (asteriscos) para o interior do parênquima e vaso sanguíneo (seta incompleta) corados *Picrosirius red*. Barra 100µm.

Histomorfometricamente, as glândulas pineais mostraram-se constituídas fundamentalmente por pinealócitos ($71,52 \pm 3,39\%$), células da glia ($20,6 \pm 4,51\%$), vasos sanguíneos ($5,65 \pm 0,98\%$) e tecido conjuntivo ($2,23 \pm 0,14\%$) havendo diferença estatística ($p < 0,05$) entre todos os tecidos analisados.

DISCUSSÃO

O parênquima da glândula pineal nos mamíferos é constituído por cordões de células separadas por capilares com espaços perivasculares bastante largo e em algumas espécies, por exemplo nos humanos, há formação de septos de tecido conjuntivo frouxo provenientes da cápsula que dividem o parênquima em lóbulos (Moller e Baeres, 2002). Neste estudo foi observado que o tecido conjuntivo formou septos irregulares, não ocorrendo formação de lóbulos, e que os pinealócitos estavam distribuídos de maneira aleatória e homogênea e arranjados em diferentes formas pelo parênquima da glândula. Este mesmo padrão de distribuição aleatória dos pinealócitos pelo parênquima foi relatado em *Bubalus bubalis* (Carvalho et al., 2009) e *Procyon cancrivorus* (Marques et al., 2010) e difere do encontrado em outras espécies, como os cães, onde essas células apresentaram maior concentração no centro da glândula e estavam organizadas em lóbulos ou cordões (Gomes, 2008).

Neste estudo não foi observada a presença de concreções calcárias coincidindo com o relatado em cães (Gomes, 2008). A ausência desta estrutura também foi relatada em *Cercopithecus aethiops* (Simmons, 1977) e *Procyon cancrivorus* (Marques et al., 2010). Em suínos da raça Landrace, as concreções calcárias formam aglomerados no formato de mórula (Lima et al., 2003) enquanto no *Nasua nasua* apresentam diversos tamanhos e formatos (Favaron et al., 2008). A presença de concreções calcárias também foi relatada em búfalos (Carvalho et al., 2009) e em ovelhas da raça Santa Inês (Lima et al., 2011), entretanto os autores não relataram o formato destas.

Os mastócitos não foram observados em nenhum animal deste estudo. A presença de mastócitos foi descrita em outras espécies como *Didelphis sp* (Mançanares et al., 2007), búfalos (Carvalho et al., 2009), *Procyon cancrivorus* (Marques et al., 2010) que caracterizaram essas células como estruturas globosas, grandes, sem prolongamento visível, repletas de grânulos metacromáticos, dispostas de forma aleatória ou em pequenas aglomerações presentes na periferia. Mastócitos também estiveram presentes na pineal de ovinos da raça Santa Inês, mas a baixa frequência impediu que se fosse caracterizado um arranjo padrão em relação à distribuição dessas células no parênquima da glândula pineal (Lima et al., 2011). Em relação a quantificação dos vasos, não foi possível comparar com os resultados de outros autores, pelo fato de não terem realizado esse tipo de quantificação em seus estudos.

CONCLUSÃO

Observou-se a presença dos pinealócitos por todo o parênquima da glândula e gliócitos principalmente próximos aos vasos. O tecido conjuntivo esteve presente principalmente ao redor da glândula, formando uma cápsula que emitia septos e projeções que não chegaram a formar lóbulos. Foi possível verificar a ausência de concreções calcárias e mastócitos nas glândulas pineais analisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, A. F.; AMBROSIO, C. E.; MIGLINO, M. A.; MANCANARES, C. A.; BLAZQUEZ F. J. Macro-Microscopical aspects of the buffalo (*Bubalis bubalis*, Linnaeus, 1758) pineal gland. **Biotema**, v.22, n.2, p. 127-135, 2009.

CHATTORAJ, A.; LIU, T.; ZHANG, L. S.; HUANG, Z.; BORIGIN, J. Melatonin formation in mammals: in vivo perspectives. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v.10, p. 237–243, 2009.

FAVARON, P. O.; MANÇANARES C. A. F.; de CARVALHO, A. F.; AMBRÓSIO, C. E.; LEISER, R.; MIGLINO, M. A. Gross and microscopic anatomy of the pineal gland in *Nasua nasua* -coati (Linnaeus, 1766). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.37, n.6, p.464-468, 2008

GOMES, L. A.; PRADA, I. L. S.; FARIAS, E. C.; ZANANON, J. P.; HEADLEY, S. A.; BLAZQUEZ, F. X. H. Estudo morfológico da glândula pineal do cão. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 137-150, 2008.

HULLINGER, D. L. The Endocrine System. In: EVANS, H. E.; MILLER, M. E. **Evans-Miller's anatomy of the dog**. 4th ed. Philadelphia, W. B. Saunders, p.572-573, 2012.

KUS, I.; SARSILMAZ, M.; OZEN, O. A.; TURKOGLU, A. O.; PEKMEZ, H.; SONGUR, A. AND KELESTIMUR, H. Light and electron microscopic examination of pineal gland in rats exposed to constant light and constant darkness. **Neuroendocrinology Letters**, v.25, n.1/2, p. 102-108, 2004.

LERNER, A. B.; CASE, J.D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T.H.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **Journal of American Chemical Society**, n. 80, p. 2587, 1958.

LIMA, E. M. M.; SANTANA, M. I. S.; CASTRO, M. B.; BENEDICTO, H. G.; FERREIRA, P. M.; VIANNA, A. R. C. B. Estudo morfoquantitativo e da microestrutura da glândula pineal em ovinos Santa Inês. **ARS VETERINARIA**, v.27, n.3, p.186-191, 2011.

LIMA, L. C. M.; PEREIRA, K. F.; CONEGERO, C. I. Estudo da glândula pineal de suíno por meio de microscopia de luz. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, v.25, n.2, p.453-458, 2003.

MANÇANARES, C. A. F.; PRADA, I. L. S.; CARVALHO, A. F.; MIGLINO, M. A.; MARINS, J. F. P.; AMBRÓSIO, C. F. Morfologia da glândula pineal em gambás

(*Didelphis sp.*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.3, p.222-229, 2007.

MARQUES, L. O.; CARVALHO, A. F.; MANÇANARES, A. C. F.; MANÇANARES, C. A. Estudo morfológico da glândula pineal de *Procyon cancrivorus* (Cuvier, 1798) (mão -pelada). **Biotemas**, v.23, n.2, p.163-171, 2010.

MOLLER, M.; BAERES, F. M. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. **Cell Tissue Research**, n. 309, p. 139 – 150, 2002.

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

SIMMONS, R. M. T. The diencephalon of the vervet Monkey (*Cercopithecus aethiops*) Part II: Epithalamus, subthalamus and hypothalamus. **South African Journal of Medical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 139-163, 1977.