UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LETÍCIA OLIVEIRA NERI DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO QUALITATIVA E MORFOMETRICA DO
NERVO VAGO EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS:
ALTERAÇÕES SEGUNDO A EVOLUÇÃO DA IDADE E DA
HIPERTENSÃO.**

Ribeirão Preto
2018

LETÍCIA OLIVEIRA NERI DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO QUALITATIVA E MORFOMETRICA DO
NERVO VAGO EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS:
ALTERAÇÕES SEGUNDO A EVOLUÇÃO DA IDADE E DA
HIPERTENSÃO.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Neurologia
Sub-area: Neurociencia

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Letícia Oliveira Neri

Investigação qualitativa e morfométrica do nervo vago em ratos espontaneamente hipertensos: alterações segundo a evolução da idade e da hipertensão. Leticia Oliveira Neri da Silva/ orientadora Valéria Paula Sassoli - Ribeirão Preto, 2018.

97p.

Tese (Doutorado), apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

1. Nervo vago.
2. Rato SHR.
3. Rato WKY
4. Morfometria.
5. Morfologia.
6. Hipertensão

FOLHA DE APROVAÇÃO

SILVA, L. O. N. Investigação qualitativa e morfométrica do nervo vago em ratos espontaneamente hipertensos: alterações segundo a evolução da idade e da hipertensão. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, Subárea. Neurociências.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

O tempo se move em uma direção

e a memória na outra.

*À minha família que, mesmo com minhas ausências soube compreender a importância deste trabalho. Meus pais, **Osvaldo e Evalda**, que nunca mediram esforços para a realização de meus sonhos. Com todo amor e carinho, sou grata, por todo apoio e incentivo. As minhas irmãs **Fernanda e Renata**, doces luzes que iluminam meu caminho. São meus anjos na minha vida. As minhas filhas **Yasmin e Nyara**, pela paciência, companheirismo durante as madrugadas. Ao meu marido **Disvaldo**, eterno namorado, por todo companheirismo, apoio e amor. Obrigado por me permitir sonhar e lutar por tudo que almejo. Te amo.*

*A minha orientadora e amiga **Prof.^a Dra. Valéria**, por todo acolhimento, carinho, atenção, dedicação e sabedoria. Agradeço também pelos bons momentos vividos, e por todas as comemorações e risadas compartilhadas.*

Obrigada por tudo!!!!

A maior habilidade de um líder é desenvolver habilidades extraordinárias em pessoas comuns. Abraham Lincoln

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente agradeço a **Deus** por me dar forças e fé para acreditar e alcançar meus sonhos, saúde para minha família e colocando pessoas maravilhosas e iluminadas em meu caminho.*

***Maria Angelina Lazara Castilho** (segunda mãe), **André** e **Mainha**, agradeço toda a compreensão, acolhimento, carinhos, ensinamentos, orientações e apoio nesse longo caminho trilhado, sem os quais não seria possível chegar até aqui. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram por mim! Obrigada pela oportunidade ímpar de conviver ao lado de vocês!! Obrigada por tudo!!!!*

*À querida **Ana Maria Norberto** e família, pelos momentos compartilhados, companhia, alegria, amizade, incentivo, carinho. Obrigada por tudo!!!!*

*Aos amigos **Marcelo**, **Gean** pelo companheirismo e por proporcionar momentos de necessária desconexão com a realidade.*

Aos meus queridos amigos do laboratório de Morfologia e Morfometria, amigas de pesquisa e laboratório, que sempre foram solidários em todas as horas, que dividiram as angústias da vida acadêmica e os bons momentos, frutos de muitos trabalhos.

*Ao **Antônio Renato Meirelles**, agradeço os ensinamentos, orientações, dedicação e companheirismo. Muito Obrigada!!!*

*A **Sandra Balero Penharvel Martins** e ao **Jorge Forjaz**, do laboratório de Histologia e Imuno-histoquímica, pelos momentos compartilhados.*

*Aos funcionários e técnicos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, **Jaci Airton Castania** pelo auxílio e orientação laboratorial.*

*Às funcionárias da Neurologia **Sandra Elisabete, Silvia Helena A. Scarso, Daiana Oliveira Souza, Thaísa Tognoti Schiavoni e Guiliana França Grossi**, pessoas tão queridas, que me acompanharam diariamente nesta trajetória, sempre carinhosas e atenciosas!*

*À técnica **Maria Teresa Picinato Maglia**, a qual realizou todo o preparo das minhas lâminas.*

*Ao **Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira**, por ceder seu laboratório para análise de imagens.*

Ao coordenador da Pós-Graduação em Neurociências e Ciências do Comportamento.

Aos membros da banca examinadora.

*A **CAPES**, pela bolsa de pesquisa concedida.*

*A todos que compartilharam direto ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado e aqueles que mesmo sem serem citados, contribuíram de alguma maneira para realização do estudo. **MUITO OBRIGADA!!!!!!!!!!!!!!***

RESUMO

SILVA, L. O. N. INVESTIGAÇÃO QUALITATIVA E MORFOMETRICA DO NERVO VAGO EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS: ALTERAÇÕES SEGUNDO A EVOLUÇÃO DA IDADE E DA HIPERTENSÃO. 2018. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Brasil.

O nervo vago (X nervo craniano) está formado por fibras motoras somáticas e viscerais e por fibras sensitivas e possui um trajeto e distribuição mais extensos do que qualquer outro nervo craniano. Nos seres humanos, o nervo vago tem sua origem craniana pelo forame jugular e possui dois gânglios no seu trajeto: o gânglio superior e o gânglio inferior. Em ratos, o nervo vago emerge pelo forame lacerado posterior, apresenta o gânglio nodoso e se estende posteriormente, em frente a coluna vertebral, por todo o pescoço, tórax até o abdome. Na literatura são escassas informações sobre as diferenças morfométricas e morfológicas dos nervos vagos em ratos normotensos (WKY) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR). O objetivo do presente estudo foi comparar os aspectos morfológicos e morfométricos dos diferentes segmentos e lados do nervo vago de ratos das linhagens WKY e SHR, machos e fêmeas. Os animais (n =4 em cada grupo) foram pesados, anestesiados e sua pressão arterial aferida. Após o preparo com técnicas histológicas convencionais, secções transversais dos segmentos proximal e distal foram obtidas para análise de microscopia de luz e através de um sistema de imagem computacional. O peso corporal dos animais mais velhos acompanhou o crescimento, sendo maior nos machos do que nas fêmeas. Não foram observadas diferenças estatísticas na morfologia e morfometria entre os lados e segmentos tanto em fêmeas como machos. Quando comparados os animais entre as idades foi possível gerar alterações na área fascicular, número de fibras, diâmetro mínimo da fibra, área da bainha, área da fibra e diâmetro do axônio.

Palavras chaves: Nervo vago, WKY, SHR, hipertensão, morfologia e morfometria

ABSTRACT

SILVA, L. O. N. QUALITATIVE AND MORPHOMETRIC INVESTIGATION OF THE VAGUE NERVE IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS: CHANGES ACCORDING TO THE EVOLUTION OF AGE AND HYPERTENSION. 2018. Thesis (PhD) - School of Medical of Ribeirão Preto. University of São Paulo, Brazil.

The vagus nerve (X cranial nerve) is formed by somatic and visceral motor fibers and by sensory fibers and has a more extensive path and distribution than any other cranial nerve. In humans, the vagus nerve has its cranial origin through the jugular foramen and has two ganglia in its path: the superior ganglion and the inferior ganglion. In rats, the vagus nerve emerges through the posterior lacerated foramen, presents the nodous ganglion and extends posteriorly, in front of the vertebral column, throughout the neck, thorax to the abdomen. In the literature, there is scarce information about the morphometric and morphological differences of the vagus nerves in normotensive rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). The objective of the present study was to compare the morphological and morphometric aspects of the different segments and sides of the vagus nerve of rats of WKY and SHR, both male and female. The animals (n = 4 in each group) were weighed, anesthetized and their blood pressure measured. After preparation with conventional histological techniques, cross sections of the proximal and distal segments were obtained for light microscopy analysis and through a computer imaging system. The body weight of the older animals followed the growth, being higher in the males than in the females. No statistical differences were observed in morphology and morphometry between the sides and segments in both females and males. When comparing the animals between the ages it was possible to generate changes in the fascicular area, number of fibers, minimum diameter of the fiber, area of the sheath, area of the fiber and diameter of the axon.

Key words: Vacant Nevus, WKY, SHR, hypertension, morphology and morphometry

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Hipertensão Arterial	21
1.2 Modelo de Hipertensão Espontânea	22
1.3 Anatomia do Nervo Vago.....	25
1.4 Dimorfismo Sexual e Hipertensão.....	28
 2. OBJETIVOS	 30
2.1 Objetivos Gerais	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
 3 MATERIAL E MÉTODOS	 33
3.1 Animais	33
3.2 Grupos Experimentais	33
 4 RESULTADOS	 43
4.1 Dados Ponderais e Fisiológicos.....	43
4.1.1 Animais com 5 semanas de vida	43
4.1.2 Animais com 20 semanas de vida	46
4.1.3 Animais com 50 semanas de vida	49
4.2 Análise Morfológica do Nervo Vago	52
4.3 Análise Morfométrica dos Fascículos e das Fibras Mielínicas	59
4.3.1 Morfometria do Nervo Vago de WKY	59
4.3.1.1 Morfometria do Nervo Vago de WKY com 5 semanas de vida	59
4.3.1.2 Morfometria do Nervo Vago de WKY com 20 semanas de vida	62

4.3.1.3	Morfometria do Nervo Vago de WKY com 50 semanas de vida	64
4.3.1.4	Comparação de dados morfométricos dos Fascículos e Fibras Mielínicas entre Fêmeas e Machos de WKY.	67
4.3.2	Morfometria do Nervo Vago de SHR	67
4.3.2.1	Morfometria do Nervo Vago de SHR com 5 semanas de vida	67
4.3.2.2	Morfometria do Nervo Vago de SHR com 20 semanas de vida	70
4.3.2.3	Morfometria do Nervo Vago de SHR com 50 semanas de vida	73
4.3.2.4	Comparação de dados morfométricos dos Fascículos e Fibras Mielínicas entre Fêmeas e Machos de SHR.	76
4.4	Comparação de dados morfométricos dos Fascículos e Fibras Mielínicas entre gêneros e linhagens.	76
5.	DISCUSSÃO	79
5.1	Dados Ponderados e Fisiológicos.....	79
5.2	Morfologia do Nervo Vago	80
5.3	Morfometria do Nervo Vago	81
6.	CONCLUSÃO.....	85
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8.	ANEXOS	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bpm	Batimentos por minuto
°C	Celsius
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
Cm	Centímetro
D	Direito
DDSA	Dodeny succinic Anhydride
DMP-30	2-4-6-tri(dimethylaminoethyl) phenol
DPM	Desvio Padrão da Média
E	Esquerdo
EMBED	Electron Microscopy Sciences
EPM	Erro Padrão de Média
FC	Frequência Cardíaca
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
g	Gramma
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$	Ferrocianeto de potássio aquoso
LNAE	Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental.
M	Molar
mg/Kg	Miligramma por Quilograma
mm ²	Milímetro Quadrado
mmHg	Milímetros de Mercúrio
ml	Mililitro

n	Número de Animais Analisados
NMA	Nadic Methyl Anhydride
OsO ₄	Tetróxido de Ósmio
PA	Pressão Arterial
PAM	Pressão Arterial Media
PBS	Solução Salina Tamponada
p	Nível de significância
pH	Potencial Hidrogeniônico da Solução
SHR	Rato Espontaneamente Hipertenso
Razão g	Razão entre o Diâmetro do Axônio e o Diâmetro da Fibra
®	Marca Registrada
USP	Universidade de São Paulo
RGB	Red-Green-Blue
WKY	Wistar-Kyoto
μm	Micrômetro
μm ²	Micrômetro Quadrado
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da origem, ramificação e trajeto do nervo vago direito no rato.	27
Figura 2 - Fotografia ilustrativa da localização do nervo vago cervical	35
Figura 3 - Comparação dos valores médios de peso corporal entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 5 semanas de vida..	43
Figura 4: Comparação dos valores médios da frequência cardíaca entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 5 semanas de vida	44
Figura 5: Comparação dos valores médios da pressão arterial média entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 5 semanas de vida.	45
Figura 6: Comparação dos valores médios de peso corporal entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 20 semanas de vida.	46
Figura 7: Comparação dos valores médios de frequência cardíaca entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 20 semanas de vida.	47
Figura 8: Comparação dos valores médios de Pressão arterial média entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 20 semanas de vida..	48
Figura 9: Comparação dos valores médios de peso corporal entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 50 semanas de vida.	49
Figura 10: Comparação dos valores médios de frequência cardíaca entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 50 semanas de vida.	50
Figura 11: Comparação dos valores médios de pressão arterial média entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 50 semanas de vida.....	51
Figura 12: Secções transversais semifinas dos nervos vagos de fêmeas em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e WKY com 5 semanas de vida.....	53
Figura 13: Secções transversais semifinas dos nervos vagos.....	54
Figura 14: Secções transversais semifinas dos nervos vagos de machos, linhagem SHR segmentos distal e proximal	55

Figura 15: Detalhe do espaço endoneural dos fascículos dos nervos vagos WKY fêmeas utilizadas no presente estudo.....	56
Figura 16: Secção transversal semifina de um fascículo do nervo vago distal de SHR machos com um paragânglio no interior do endoneuro.....	57
Figura 17: Detalhe do espaço endoneural dos fascículos dos nervos vagos SHR fêmeas utilizadas no presente estudo.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de WKY fêmeas, com 05 semanas de vida.....	59
Tabela 2: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de WKY machos, com 05 semanas de vida.....	60
Tabela 3: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e axônios mielinizados dos nervos vagos de WKY fêmeas, com 05 semanas de vida.....	61
Tabela 4: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e axônios mielinizados dos nervos vagos de WKY machos, com 05 semanas de vida.....	61
Tabela 5: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de WKY fêmea, com 20 semanas de vida.....	62
Tabela 6: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de WKY machos, com 20 semanas de vida.....	63
Tabela 7: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e axônios mielinizados dos nervos vagos de WKY fêmeas, com 20 semanas de vida.....	63
Tabela 8: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e axônios mielinizados dos nervos vagos de SHR machos, com 20 semanas de vida.....	64
Tabela 9: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de WKY fêmeas com 50 semanas de vida.....	65
Tabela 10: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de WKY machos, com 50 semanas de vida.....	65
Tabela 11: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e axônios mielinizados dos nervos vagos de WY fêmeas, com 50 semanas de vida.....	66
Tabela 12: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e axônios mielinizados dos nervos vagos de WKY machos, com 50 semanas de vida.....	66

Tabela 13: Paramentos morfométricos fasciculares dos nervos vagos de SHR fêmeas, com 05 semanas de vida.....68

Tabela14: Paramentos morfométricos fasciculares dos nervos vagos de SHR machos, com 05 semanas de vida.....68

Tabela 15: Paramentos morfométricos das fibras mielínicas e axônios mielinizados dos nervos vagos de SHR fêmeas, com 05 semanas de vida.....69

Tabela 16: Paramentos morfométricos das fibras mielínicas e axônios mielinizados dos nervos vagos de SHR machos, com 05 semanas de vida.....70

Tabela 17: Paramentos morfométricos fasciculares dos nervos vagos de SHR fêmeas, com 20 semanas de vida.....71

Tabela 18: Paramentos morfométricos fasciculares dos nervos vagos de SHR machos, com 20 semanas de vida.....71

Tabela 19: Paramentos morfométricos das fibras mielínicas e axônios mielinizados dos nervos vagos de SHR fêmeas, com 20 semanas de vida.....72

Tabela 20: Paramentos morfométricos das fibras mielínicas e axônios mielinizados dos nervos vagos de SHR machos, com 20 semanas de vida.....72

Tabela 21: Paramentos morfométricos fasciculares dos nervos vagos de SHR fêmeas com 50 semanas de vida.....73

Tabela 22: Paramentos morfométricos fasciculares dos nervos vagos de SHR machos, com 50 semanas de vida.....74

Tabela 23: Paramentos morfométricos das fibras mielínicas e axônios mielinizados dos nervos vagos de SHR fêmeas, com 50 semanas de vida.....75

Tabela 24: Paramentos morfométricos das fibras mielínicas e axônios mielinizados dos nervos vagos de SHR machos, com 50 semanas de vida.....75

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial

Hipertensão arterial (HA) é condição clínica multifatorial caracterizada por elevação sustentada dos níveis pressóricos ≥ 140 e/ou 90 mmHg (GOIT, ANSAR; 2016; Arq Bras. Cadiol., 2016).

A hipertensão é o maior fator de risco para doenças cardiovasculares, falência cardíaca e renal, ocasionando milhares de mortes prematuras (SMITH et. al.; 2016; WIDIMSKÝ, 2015). Estima-se que mais de um bilhão de adultos são hipertensos em todo o mundo e este número deverá aumentar para 1,56 bilhões no ano de 2025, o que representa um aumento de 60% em relação a 2000 (JARARI et. al.; 2016)

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) apresenta maior incidência com o avançar da idade, sendo mais evidente em homens do que em mulheres com idade igual ou superior a 65 anos, atingindo cerca de 66% da população idosa (KOVELL et. al.; 2015). Estudos demonstram que indivíduos normotensos filhos de pai e/ou mãe hipertensos possuem risco aumentado para o desenvolvimento de HAS (SHOOK, 2012; MITSUMATA, 2012). Wang et al. 2008, investigaram o impacto do histórico familiar para HAS no risco de desenvolvimento desta doença em 1160 homens normotensos durante 54 anos de seguimento. No estudo, os riscos relativos de desenvolvimento de HAS foram de 1,5, 1,8 e 2,4 entre indivíduos que possuíam, respectivamente, somente a mãe, somente o pai e ambos os progenitores hipertensos comparativamente aos indivíduos cujos pais eram normotensos.

No Brasil, a HAS é um problema de saúde pública. Logo, a preocupação crescente com a sua prevenção é justificada, principalmente numa população que experimenta o aumento da sua longevidade (SINGH et. al.; 2000). Atinge 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos, mais de 60% dos idosos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por doença cardiovascular (DCV) (SCALA et. al.; 2015).

As diretrizes que estabelecem valores ideais de PA mais comentadas e discutidas são a brasileira (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão – DBH VI) , a americana (The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure – JNC) , a da Sociedade Europeia de Hipertensão (The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension and of the European Society of Cardiology – ESH-ESC 2007) e as recomendações publicadas anualmente pelo Programa Canadense de Educação em Hipertensão (The Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension – CHEP 2010).

De maneira geral, existem dois valores de PA reconhecidos por todas as diretrizes: abaixo de 140/90 mmHg para a população de hipertensos em geral e abaixo de 130/80 mmHg para pacientes diabéticos ou com doença renal (NEVES, KASAL; 2010). Além disso, estes valores alvos são muito difíceis de alcançar devido a inúmeros fatores, tais como, tratamento ou diagnóstico ineficaz, baixa adesão do paciente ao tratamento clínico ou hipertensão resistente (ausência de resposta ao tratamento convencional) (PAULIS; UNGER, 2010; THE ACCORD, 2010).

1.2 Modelo de Hipertensão Espontânea

Okamoto e Aoki (1967) desenvolveram um modelo experimental de hipertensão animal, sem que nenhum recurso fisiológico, farmacológico ou cirúrgico fosse utilizado. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR- *Spontaneously Hypertensive Rats*) foram desenvolvidos, a partir do cruzamento entre irmãos e irmãs da linhagem Wistar-Kyoto (WKY). Esse cruzamento resultou em animais portadores de doença hipertensiva em 100% dos descendentes (OKAMOTO et.al., 1996). O SHR é um modelo adequado para estudar o desenvolvimento da hipertensão, por que é muito similar ao ser humano com hipertensão essencial. Essas similaridades incluem uma predisposição genética à hipertensão arterial sem etiologia específica, aumento da resistência vascular periférica sem expansão de volume e respostas similares ao tratamento medicamentoso (FROHICH, 1986).

DICKHOUT & LEE (1998) relatam que a pressão arterial de SHR apresenta níveis similares à dos WKY nas 2ª e 3ª semanas de vida, começando a divergir na 4ª semana, apresentando valores significativamente maiores nos SHR na 6ª semana de idade, quando comparados aos normotensos WKY. Amenta et. al. (2003), descreve o desenvolvimento da

hipertensão nas primeiras 6 semanas de vida. Em 1981, Tripoddo e Frohlich, verificaram que o período de maior aumento da pressão arterial sistólica nos SHR ocorre entre a 3ª e a 10ª semana, atingindo um platô por volta da 20ª semana.

A hipertensão arterial em SHR desenvolve-se inicialmente sem qualquer lesão orgânica óbvia. Contudo, alterações hemodinâmica ocorrem devido ao aumento da resistência vascular periférica tardia associada a várias complicações cardiovasculares. Esses fatos sugerem que a hipertensão espontânea em SHR pode ser similar a hipertensão essencial humana (TRIPPODO; FROHLICH, 1981; YAMORI, 1999). No entanto, Trippodo e Frohlich (1981) ressaltaram que, embora o SHR seja um excelente modelo da hipertensão essencial humana, existem algumas ressalvas, principalmente com relação aos fatores genéticos envolvidos na determinação de ambas as formas (SHR e humana) da doença hipertensiva, além dos fatores ambientais envolvidos e dos diferentes mecanismos de adaptação destas formas.

A hipertensão causa danos em outros tecidos e órgãos, que culminam em uma série de eventos patológicos renais, pulmonares e cerebrais, além de outras doenças (ZICHA; KUNES, 1999), as quais sustentam a elevação da pressão sanguínea, aumento dos batimentos cardíacos e aumento da resistência vascular periférica (DICKHOUT; LEE, 1998). Esse aumento da resistência vascular produz importantes mudanças cerebrovasculares, tornando o cérebro propenso a infartos, microneurismas e isquemias. As mudanças básicas causadas no cérebro pelo aumento da pressão arterial são: diminuição do volume cerebral, aumento no volume dos ventrículos e perda neuronal, sendo a hipertensão, portando, o principal fator de risco pra o acidente vascular encefálico, bem como da demência vascular (TOMASSONI et. al., 2004).

Em 1996 foi realizado o primeiro estudo sobre mudança vasculares no nervo isquiático de SHR e WKY relatou que o aumento da resistência dos vasos é a principal consequência de alterações estruturais nas artérias, relacionada a hipertensão. Os autores mostraram espessamento da parede da artéria e o estreitamento do lúmen. Esse fenômeno, se não compensado, determina uma hipoperfusão e uma redução no suprimento de oxigênio para os tecidos. Os autores demonstraram que as artérias interfasciculares e os vasos capilares intrafasciculares apresentam comportamentos diferentes entre si nos SHR. Mediante a hipertensão, as artérias interfasciculares (epi e perineurais) reagem primeiramente, ambas sofrem, em SHR e WKY, espessamento de parede e diminuição da contratilidade, pela redução do lúmen. Já os capilares intrafasciculares (endoneurais) reagem, sofrendo mudanças na contratilidade (em vasos com diâmetros menores que 35 μ m), porém não desenvolvem espessamento de parede (SABBATINI et.al., 1996).

Com interesse nos efeitos da hipertensão sobre o sistema nervoso periférico, pouco tempo depois, Fazan et. al.(1999) estudaram o nervo depressor aórtico (alça aferente do barorreflexo) levando em consideração aspectos morfológicos das fibras mielínicas desse nervo em SHR e em seus controles, ratos WKY. Os autores demonstraram que tanto as dimensões fasciculares quanto as das fibras mielínicas são maiores nos normotensos WKY quando comparados aos SHR.

Posteriormente, os mesmos autores (FAZAN et al., 2001) descrevem uma redução no número de fibras amielínicas nos SHR, bem como do tamanho dessas fibras, comparados aos WKY. Esse achado explica a redução das dimensões fasciculares sem redução no número de fibras mielínicas, descrita anteriormente (FAZAN et. al.,1999).

Na sequência dos estudos em nervos de SHR, Alcântara et al (2008) demonstrou ausência de diferenças morfológicas e morfométricas em nervos vagos de SHR adultos com hipertensão bem estabelecida, quando comparados machos e fêmeas, apesar da importante diferença nos níveis de pressão arterial entre gêneros. Esse é o único estudo sobre a morfologia e morfometria das fibras mielínicas do nervo vago em SHR disponível na literatura até o momento.

Posteriormente, autores do mesmo grupo anterior (RODRIGUES et al., 2011) demonstraram que os nervos frênicos de animais WKY são maiores e apresentam um número maior de fibras mielínicas quando comparados aos SHR, em ambos os gêneros. Ainda, fêmeas apresentaram menos alterações que machos SHR. Mais uma vez, os autores estudaram animais adultos, com hipertensão bem estabelecida.

Em 2012, Sanada et al. (2012) investigaram o nervo sural em SHR e WKY e demonstraram que a hipertensão bem estabelecida alterou parâmetros morfométricos importantes para a velocidade de condução ideal das fibras mielínicas nesses nervos, sem, entretanto, demonstrar diferenças entre gêneros. Os autores confirmaram a presença de uma neuropatia de fibras finas em decorrência da hipertensão.

Por fim, em 2016, Silva et al. (2016) realizaram um estudo do nervo laríngeo recorrente de SHR em idades jovens e demonstraram que o desenvolvimento da hipertensão interfere com o desenvolvimento axonal, afetando particularmente as fibras mielínicas finas, afetando machos e fêmeas igualmente.

1.3 Anatomia do Nervo Vago

O nervo vago (X nervo craniano) está formado por fibras motoras somáticas e viscerais e por fibras sensitivas e possui um trajeto e distribuição mais extensos do que qualquer outro nervo craniano (WARWICK; WILLIAMS, 1979).

O nervo vago foi descrito por Marinus, no ano 100 d.C., entretanto a denominação de *vagus* foi dada por Domenico de Marchetti (1626-1688), da Universidade de Pádua, que o reescreveu, dividindo-o em 16 partes. Tudo indica que Marchetti teve sua atenção despertada para as variações de trajeto de seus ramos e inspirou-se neste fato para batizá-lo com o nome de *vagus* (SKINNER, 1961). Após a descrição de Domenico de Marchetti, Johann Meckel (1724-1774), anatomista alemão, referiu-se ao vago como o nervo do pulmão e do estômago. Com isso, o anatomista francês François Chaussier, em 1807, transpôs o termo vago para o francês, denominado esse nervo de “pneumogastrique” (pneumogástrico, em português) (MARCOVECCHIO, 1993). Desde então, a denominação de pneumogástrico, mais erudita, passou a competir com o nome mais antigo de vago, até que a Nomina Anatômica manteve a denominação latina de *nervus vagus*, desde a BNA (Basle Nomina Anatomica), de 1895 (PROVENZANO, 1951), até a atual Terminologia Anatômica, da Federação Internacional de Associações de Anatomistas (FEDERATIVE COMMITTEE ON ANATOMICAL TERMINOLOGY, 1998).

Nos seres humanos, o nervo vago tem sua origem craniana pelo forame jugular e possui dois gânglios no seu trajeto: o gânglio jugular (superior) e o gânglio nodoso (inferior). Esse nervo é responsável pela inervação parassimpática de praticamente todos os órgãos abaixo do pescoço (pulmão, coração, estômago, intestino delgado, fígado e vias biliares), exceto parte do intestino grosso (a partir do segundo terço do cólon transversal) e os órgãos sexuais.

O gânglio jugular é arredondado e com cerca de 4mm de diâmetro. O gânglio inferior é maior e alongado, medindo cerca de 25mm de comprimento e cerca de 5mm de largura em seres humanos normais (WILLIAMS et.al., 1995).

O nervo vago apresenta um trajeto descendente vertical no pescoço, dentro da abainha carótida, localizado entre a artéria carótida interna e a veia jugular interna, até alcançar a raiz do pescoço. No lado direito, o vago continua descendo posteriormente a veia jugular interna e cruza a primeira parte da artéria subclávia, para penetrar no tórax. Do lado esquerdo, o vago penetra no tórax entre as artérias carótida comum esquerda e subclávia esquerda, por trás da veia braquiocefálica esquerda. Os ramos do nervo vago ao longo do seu trajeto cervical são

ramos faríngeo, ramo para o corpo carotico, o nervo laríngeo superior e o ramo laríngeo recorrente direito (WARWICK; WILLIAMS, 1979). O vago é ainda um nervo motor para a laringe, onde é importante para os mecanismos da fonação (COSENZA, 1990).

Em ratos, o nervo vago emerge pelo forame lacerado posterior, apresenta o gânglio nodoso e se estende posteriormente, em frente a coluna vertebral, por todo o pescoço, tórax até o abdome, onde termina no plexo simpático (Figura 1).

O gânglio nodoso emite dois ramos. O mais anterior é o ramo faríngeo, o qual se une ao ramo faríngeo do nervo glossofaríngeo para formar o plexo faríngeo. Da face posterior do gânglio nodoso emerge o nervo laríngeo superior, para a laringe e o timo (GREENE, 1955).

No pescoço, o nervo vago emite os ramos cardíacos e o nervo laríngeo recorrente. A direita, o ramo laríngeo recorrente faz uma alça ao redor da origem da artéria subclávia. Do lado esquerdo, esse ramo tem início no interior do tórax, fazendo uma curvatura em frente ao arco aórtico, ascendendo no espaço entre o esôfago e a traqueia, para os quais emite ramos, terminando como nervo laríngeo inferior, para a musculatura intrínseca da laringe (GREENE, 1955).

O nervo vago de ratos tem sendo utilizado recentemente em estudos que envolvem sua estimulação elétrica para investigações de diversos modelos experimentais de doenças tais como Parkinson (FARRAND et al., 2017), stress pós-traumático (NOBLE et al., 2017), epilepsia (RIJKERS et al., 2017), doença inflamatória intestinal (BONAZ et al., 2017) entre outros.

Os estudos morfológicos e funcionais desse nervo datam de várias décadas atrás (LEGROS e GRIFFITH, 1969; CLARKE e BEARN, 1972; GABELLA e PEASE, 1973; DEANE et al., 1975; GRUBER, 1978; CROCKET et al., 1980; KARIM e LEONG, 1980; HOYES e BARBER, 1981), sendo que a maior parte das descrições morfológicas disponíveis diz respeito às porções abdominais do nervo vago em ratos, sendo raros os estudos morfológicos da porção cervical desse nervo (FAZAN e LCHAT, 1997, SCHIAVONI e FAZAN, 2006; ALCANTARA et al, 2008).

Embora o nervo vago seja considerado como um importante nervo para regulação parassimpática do coração (SAYIN et al., 2015), estudos morfológicos desse nervo em animais hipertensos são raros (ALCANTARA et al., 2008). Mais ainda, um estudo que investigasse a morfologia desse nervo em diferentes idades ainda não foi descrito.

Figura 1: Representação esquemática da origem, ramificação e trajeto do nervo vago direito no rato (GREENE, 1955).

1.4 Dimorfismo Sexual e Hipertensão

Uma das revisões mais completas sobre as diferenças entre os gêneros no desenvolvimento e manutenção da hipertensão, bem como suas complicações foi publicada por Reckelhoff em 2001. A autora descreve que os homens apresentam maior risco de doença cardiovascular e renal que as mulheres pré-menopausa de mesma idade. O monitoramento ambulatorial da pressão arterial (PA) indica claramente que a PA média aumenta com a idade em ambos os gêneros mas é mais elevada em homens (6 a 10 mmHg) que mulheres de mesma idade, atingindo níveis semelhantes após as mulheres atingirem a menopausa (WIINBER et al., 1995). Um outro dado importante conhecido por décadas é de que a hipertensão de difícil controle é mais comum em homens que em mulheres (ANASTOS et al., 1991). Depois da menopausa, entretanto, os níveis pressóricos aumentam nas mulheres, atingindo os mesmos níveis dos homens nas idades entre 60-70 anos (BURL et al., 1995).

Modelos animais têm sido investigados e já foi demonstrado por vários autores que eles se comportam como os seres humanos em relação às diferenças de gêneros e comportamento da PA. O SHR é um modelo muito investigado por ser similar a hipertensão essencial humana, como já mencionado anteriormente. Nesses animais, muitos investigadores já encontraram que machos apresentam PA maior que fêmeas de mesma idade (GANTEN et al., 1989; MASUBUCHI et al., 1982; IAMS et al., 1979; CHEN et al., 1991; FAZAN et al, 1999; FAZAN et al 2001; FAZAN et al 2005; ALCANTARA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2011; SANADA et al., 2012; da SILVA et al., 2016)

Masineni et. al., (2005) observaram em SHR de aproximadamente 53 semanas de vida que, apesar de não haver diferença significativa na pressão arterial sistólica entre os gêneros nessa idade, os machos apresentam, em relação as fêmeas, maior mortalidade e co-morbidades relacionadas a hipertensão, como por exemplo, o acidente vascular encefálico, as alterações renais e cardiovasculares. Estes autores concluem que o dimorfismo sexual parece estar relacionado aos danos múltiplos nos órgãos internos dos animais, sendo os machos mais susceptíveis a estes, quando comparados as fêmeas de mesma idade.

Embora o nervo vago faça parte da alça eferente do barorreflexo, e portanto apresente um papel fundamental na regulação da pressão arterial, até o momento, não foram investigadas eventuais diferenças morfológicas e morfométricas, nem entre diferentes idades nem entre gêneros no nervo vago de SHR, justificando, assim, a necessidade do presente estudo.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral desse estudo foi descrever as características morfológicas e morfométricas dos nervos vagos de animais espontaneamente hipertensos (SHR) em diferentes fases do desenvolvimento da hipertensão (5, 20 e 50 semanas de vida) bem como comparar as eventuais alterações decorrentes do desenvolvimento da hipertensão entre os gêneros bem como com animais normotensos WKY.

2.2 Objetivos Específicos

1. Descrever a morfologia e a morfometria, através da microscopia de luz, dos nervos vagos de ratos da linhagem SHR e WKY, machos e fêmeas, com 5, 20 e 50 semanas de vida, em diferentes segmentos do mesmo nervo (simetria longitudinal).
2. Descrever a morfologia e a morfometria, através da microscopia de luz, dos nervos vagos de ratos da linhagem SHR e WKY, machos e fêmeas, com 5, 20 e 50 semanas de vida, nos lados direito e esquerdo do mesmo animal (simetria lateral).
3. Comparar os aspectos morfológicos e morfométricos dos nervos vagos de ratos da linhagem SHR e WKY, com 5 semanas de vida, nos diferentes gêneros, segmentos e lados.
4. Comparar os aspectos morfológicos e morfométricos dos nervos vagos de ratos da linhagem SHR e WKY, com 20 semanas de vida, nos diferentes gêneros, segmentos e lados.
5. Comparar os aspectos morfológicos e morfométricos dos nervos vagos de ratos da linhagem SHR e WKY, com 50 semanas de vida, nos diferentes gêneros, segmentos e lados.
6. Comparar os aspectos morfológicos e morfométricos dos nervos vagos de ratos da linhagem SHR, em diferentes idades (5, 20 e 50 semanas de vida), para cada um dos gêneros, segmentos e lados.
7. Comparar os aspectos morfológicos e morfométricos dos nervos vagos de ratos da linhagem WKY, em diferentes idades (5, 20 e 50 semanas de vida), para cada um dos gêneros, segmentos e lados.

8. Comparar os aspectos morfológicos e morfométricos dos diferentes lados dos nervos vagos de ratos da linhagem SHR e WKY.
9. Comparar os aspectos morfológicos e morfométricos dos diferentes segmentos dos nervos vagos de ratos da linhagem SHR e WKY.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem SHR (n = 24) e WKY (n = 24), machos (12 de cada linhagem) e fêmeas (12 de cada linhagem) com 5, 20 e 50 semanas de idade (n= 4 para cada linhagem e cada gênero, totalizando 16 animais para cada idade). Os animais foram criados a partir de matrizes provenientes do Biotério do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Os animais foram mantidos aos pares ou trios, em gaiolas plásticas grandes (34x42x37cm), em ambiente com ventilação forçada, temperatura controlada entre 21 e 23°C, umidade relativa do ar entre 40 e 70% e ciclo claro/escuro de 12 horas. Até o dia do experimento, tiveram livre acesso à água e a ração padrão para pequenos roedores (Nuvilab CR1 – Nuvital ®). A composição da ração encontra-se em anexo.

Os procedimentos experimentais aqui descritos estão de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-FMRP) n ° 094/2006 (Anexo). Todos os esforços foram realizados nos sentidos de reduzir o número de animais utilizados.

3.2 Grupos Experimentais

Os animais (n = 48) foram separados em grupos de acordo com a linhagem, idade e gênero, divididos em 12 grupos experimentais:

- Grupo 1: Animais SHR fêmeas, com idade de 5 semanas (N=4).
- Grupo 2: Animais SHR machos, com idade de 5 semanas (N=4).
- Grupo 3: Animais SHR fêmeas, com idade de 20 semanas (N=4).
- Grupo 4: Animais SHR machos, com idade de 20 semanas (N=4).
- Grupo 5: Animais SHR fêmeas, com idade de 50 semanas (N=4).

- Grupo 6: Animais SHR machos, com idade de 50 semanas (N=4).
- Grupo 7: Animais WKY fêmeas, com idade de 5 semanas (N=4).
- Grupo 8: Animais WKY machos, com idade de 5 semanas (N=4).
- Grupo 9: Animais WKY fêmeas, com idade de 20 semanas (N=4).
- Grupo 10: Animais WKY machos, com idade de 20 semanas (N=4).
- Grupo 11: Animais WKY fêmeas, com idade de 50 semanas (N=4).
- Grupo 12: Animais WKY machos, com idade de 50 semanas (N=4).

3.3 Procedimentos Cirúrgicos

No dia do experimento, os animais foram pesados e anestesiados com tiopental sódico (Thionembutal, Abbott, S.A.- 40 mg/Kg). Os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com as patas fixadas em abdução e tiveram a artéria femoral esquerda dissecada. Essa artéria foi canulada com tubo de polietileno PE-10 preenchido com solução salina isotônica (0,9%), o qual foi introduzido até a aorta abdominal, para a medida direta da pressão arterial. Esse cateter foi conectado a um transdutor de pressão (Statham, Pb23Db) e a pressão arterial foi registrada (por aproximadamente 5 minutos) em um microcomputador IBM/PC, equipado com uma interface analógico-digital (CAD 12/36 Lynx Tecnologia Eletrônica). Os valores da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), bem como a frequência cardíaca (FC), foram obtidos “off line” a partir dos registros de pressão arterial pulsátil.

Após o termino do registro, da pressão arterial (PA) e da FC, foi realizada uma ampla abertura da cavidade abdominal para a exposição do diafragma e, após a secção do mesmo, junto da sua origem esternocostal, a cavidade torácica foi aberta lateralmente, através da secção das costelas, para exposição do coração. Em seguida foi realizada a punção do ventrículo cardíaco esquerdo e a secção do átrio direito e os animais foram perfundidos sistemicamente, com o auxílio de uma bomba de perfusão.

Inicialmente, o leito vascular foi lavado com solução salina tamponada (PBS 0,05 M, pH 7,4), para a remoção do sangue do interior dos vasos. A seguir foi injetada a solução fixada, composta de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4. Tanto a

solução salina tamponada (PBS 0,05M) quanto a solução fixadora (glutaraldeído a 2,5%) foram perfundidas na proporção de 1 mL de solução para cada 1 g de peso do animal.

Após a perfusão, foi realizada uma ampla cervicotomia mediana, com afastamento lateral da musculatura pre-traqueal para identificação das artérias carótidas comuns. A seguir, a bainha desses vasos (bainha carótica) foi cuidadosamente dissecada e os segmentos cervicais dos nervos vagos direito e esquerdo foram identificados, dissecados e retirados em um único fragmento, sempre abaixo da emergência de nervo laríngeo superior e acima da emergência do ramo laríngeo recorrente (Figura 2). Estes nervos foram esticados sobre uma tira de papel filtro, para que não houvesse retração tecidual e também para manter a posição de orientação nas suas porções proximais e distais.

Figura 2 - Fotografia ilustrativa da localização do nervo vago cervical do lado direito em ratos após a perfusão e dissecação.

3.4 Procedimentos Histológicos

Após a dissecação e retirada, os nervos estirados em papel filtro foram pós-fixados por imersão em frascos plásticos transparentes, preenchidos com a mesma solução fixadora utilizada na perfusão, por pelo menos 12 horas, a 4°C. Após este período, foram lavados com solução tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,4 e dissecados os segmentos proximais e distais utilizados no presente estudo. O restante dos nervos foi estocado a 4°C, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, como material de reserva.

Os segmentos proximais e distais dos nervos vagos direito e esquerdo foram pós-fixados em solução composta de tetróxido de ósmio (OsO_4) aquoso a 4%, tampão cacodilato de sódio a 0,2 M, pH 7,2 e ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) aquoso a 6% na proporção 1:2:1, por 2 horas em temperatura ambiente e agitação orbital contínua.

Em seguida, os segmentos foram lavados por uma hora, em temperatura ambiente, com tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,2 e desidratados em concentrações crescentes de etanol (etanol a 25%, 35%, 50%, 70%, 80%, 95%, por 5 minutos cada concentração, e duas vezes em etanol a 100%). Após a desidratação, os segmentos passaram pelo processo de infiltração em resina epóxi EMBed 812® (Electron Microscopy Sciences) e etanol a 100% na proporção 1:2, por 1 hora e na proporção 2:1, por duas horas. A resina foi preparada na proporção de 13 ml de EMBed 812® (Resina), 7 ml de NMA (plastificador), 13 ml de DDSA (endurecedor) e 0,6 ml de DMP-30 (catalisador).

Após um período aproximado de 18 horas de imersão em resina plena, em temperatura ambiente, os segmentos foram orientados, sob lupa estereoscópica, em moldes de silicone devidamente identificados e preenchidos com resina para futura obtenção de secções transversais. Os moldes preenchidos com a resina e com os segmentos dos nervos foram aquecidos em estufa seca (60°C) por 72 horas, para a polimerização de resina. Após a polimerização, os blocos foram removidos dos moldes e trimados manualmente com lâminas descartáveis, para a remoção do excesso de resina, antes da realização da microtomia.

Os segmentos proximais e distais dos nervos estudados tiveram secções transversais semifinas (0,5 µm de espessura) obtidas com navalhas de vidro através de um ultramicrotomo MT 6000 – XF (RMC Inc.), transferidas para lâminas de vidro com uma gota de água destilada, secadas em placa aquecedora a 60 °C e coradas com azul de toluidina a 1% em ácido bórico saturado. Tais secções foram utilizadas para estudos de microscopia de luz.

Os procedimentos histológicos utilizados nesse trabalho são aqueles utilizados de rotina no laboratório de microscopia e morfometria, do setor de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP, para o preparo de espécimes de nervos tanto para estudos de microscopia de luz (JERONIMO et al., 2008; ALCANTARA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2011; SANADA et al., 2012; Da SILVA et al., 2016) quanto de microscopia eletrônica de transmissão (SATO et al., 2006; FAZAN et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012).

3.5 Análise Morfológica e Morfométrica

As secções transversais semifinas dos segmentos proximais e distais dos nervos retirados foram observadas em um fotomicroscópio (Axiophot II, Carl Zeiss) usando as objetivas 100 vezes, com imersão em óleo. Quando necessário, lentes auxiliares (optovar de 1,25 ou 1,6 vezes) foram utilizadas para proporcionar uma ampliação adicional das imagens. As imagens dos fascículos foram digitalizadas com o auxílio de uma câmara de alta resolução AxioCam MRc acoplada a um microcomputador.

A partir das imagens dos fascículos, as medidas da área e diâmetro mínimo, foram obtidas com o auxílio de um programa analisador de imagens Image J (SCHNEIDER et al., 2012). O diâmetro mínimo é o menor diâmetro obtido de uma estrutura de forma aparentemente circular. Após a obtenção da imagem dos fascículos, com o auxílio de uma platina motorizada acoplada ao microscópio, campos microscópicos adjacentes, da área endoneural dos mesmos, foram digitalizados. Essa platina motorizada proporcionou o deslocamento automático das lâminas, em campos microscópicos sem sobreposição dos mesmos.

Essas imagens adjacentes da área endoneural geraram um número entre 30 e 99 quadros (dependendo do tamanho do fascículo), que foram digitalizados com objetiva de 100 vezes com imersão em óleo, lente auxiliar (optovar) de 1,6 vezes e fator de ampliação da câmera de 1 vez. A montagem sequencial desses campos microscópicos (quadros) gera a imagem da secção transversal do fascículo correspondente. Em cada campo microscópico digitalizado, as fibras mielínicas foram contadas na sua totalidade e, ao término desse processo, o número total e a densidade (número/mm²) de fibras mielínicas foram obtidos. Todas essas imagens foram digitalizadas em cores, no formato RGB (vermelho, verde e azul).

Para as medidas das fibras mielínicas, as imagens dos campos microscópicos obtidos como descrito acima passaram por um processo de identificação da bainha de mielina, através de uma ferramenta do programa computacional, capaz de identificar, por seleção de cores, as estruturas desejadas. As estruturas marcadas, especificamente a bainha de mielina, foram então transformadas em uma imagem binária em preto e branco, para que pudessem ser identificadas de maneira automática.

Durante esse processo, as fibras irregulares, as que se apresentaram seccionadas no nível do nó de Ranvier ou nas incisuras de Schmidt-Lanterman e as que tocam as bordas dos quadros são automaticamente eliminadas. Neste estudo foram medidas 74 a 90% de todas as fibras mielínicas presentes no espaço endoneural. Após esse processo, o programa ainda permite um ajuste manual da imagem para que pequenas irregularidades e/ou artefatos possam ser eliminados antes da realização das medidas automáticas.

Concluído o ajuste, foram obtidos, automaticamente, tanto do diâmetro mínimo axonal, definido pelo limite externo do axolema, quanto o diâmetro mínimo da fibra, definido pelo limite externo das lamelas de mielina. A razão entre ambos os diâmetros, conhecida como razão G, que é uma medida indicativa do grau de mielinização (SCHMITT e BEAR, 1937; RUSHTON, 1951; SMITH e KOLES, 1970), a área da fibra, do respectivo axônio e a área da bainha de mielina foram então calculadas. Os resultados dessas medidas possibilitaram a elaboração de planilhas eletrônicas utilizadas na representação gráfica e na análise estatística dos dados. A porcentagem da área fascicular total, ocupada pelas fibras mielínicas foi também calculada.

Todos os procedimentos morfológicos e morfométricos descritos no presente estudo, foram realizados no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

3.6 Análise Estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para testar a normalidade da distribuição de todos os dados obtidos (ponderais, pressóricos e morfométricos), através do aplicativo Sigma Plot 11.0. Na sequência o programa aplica automaticamente o teste de equivalência das variâncias de Levene.

A análise estatística dos dados ponderais e pressóricos seguiu o fluxograma apresentado abaixo. Os dados que passaram no teste de normalidade e no teste de equivalência das variâncias foram comparados seguindo o fluxograma na coluna da esquerda. Os dados que passaram no teste de normalidade mas não passaram no teste de equivalência das variâncias ou os dados que não passaram no teste de normalidade foram comparados seguindo o fluxograma da coluna da direita.

A análise estatística dos dados morfométricos médios quando realizada a comparação entre dois grupos, seguiu o fluxograma apresentado abaixo. Os dados que passaram no teste de normalidade e no teste de equivalência das variâncias foram comparados seguindo o fluxograma na coluna da esquerda. Os dados que passaram no teste de normalidade mas não passaram no teste de equivalência das variâncias ou os dados que não passaram no teste de normalidade foram comparados seguindo o fluxograma da coluna da direita.

Dados Morfométricos de Fascículos e Fibras

A análise estatística dos dados morfométricos médios quando realizada a comparação entre as idades, em uma mesma linhagem, seguiu o fluxograma apresentado abaixo. Os dados que passaram no teste de normalidade e no teste de equivalência das variâncias foram comparados seguindo o fluxograma na coluna da esquerda. Os dados que passaram no teste de normalidade mas não passaram no teste de equivalência das variâncias ou os dados que não passaram no teste de normalidade foram comparados seguindo o fluxograma da coluna da direita.

Dados Morfométricos de Fascículos e Fibras

Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Dados Ponderais e Fisiológicos

4.1.1 Animais com 5 semanas de vida

O peso corporal de SHR fêmeas variou de 68 a 102 gramas (g), com média de 82 ± 8 g (média $\pm$ EPM); nos machos entre 96 a 147g, com média de 112 ± 12 g. O peso corporal das fêmeas WKY variou entre 100 a 120 g com média de 111 ± 4 g; nos machos entre 100 a 140g, com média de 127 ± 9 g. Na figura 3 observa-se que as fêmeas SHR e WKY apresentam menor peso corporal em relação aos machos da mesma linhagem. Também observa-se que SHR apresentam maior peso corporal que WKY em ambos os sexos. A análise estatística mostrou que SHR fêmeas apresentam menor peso corporal que WKY fêmeas, sem outras diferenças.

Figura 3: Comparação dos valores médios de peso corporal (expresso em g $\pm$ EPM) entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 5 semanas de vida. N = 4 por grupo.

A frequência cardíaca (FC) no SHR macho variou entre 330 e 372 batimentos por minuto (bpm) com média de 353 ± 9 bpm, e das fêmeas variou de 306 e 318 bpm, com média de 314 ± 3 bpm. A FC no macho WKY variou entre 310 e 402 bpm com média de 373 ± 22 bpm, enquanto que nas fêmeas esses valores ficaram entre 304 e 370 bpm, com média de 341 ± 16 bpm. A análise estatística mostrou que a FC dos SHR machos é maior que das fêmeas ($p = 0,006$), sem outras diferenças (Figura 4).

Figura 4: Comparação dos valores médios da frequência cardíaca (expressa em bpm $\pm$ EPM) entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 5 semanas de vida, em cada grupo. N = 4 por grupo. # indica diferença significativa entre fêmeas os grupos SHR e WKY.

A Pressão arterial média (PAM) de SHR fêmeas variou de 120 a 154 mmHg, com média 131 ± 10 mmHg; a dos machos variou de 124 a 161 mmHg, com média de 140 ± 9 mmHg. A PAM de WKY fêmeas variou de 127 a 133 mmHg, com média de 130 ± 1 mmHg; a dos machos variou de 133 a 148 mmHg, com média de 141 ± 3 mmHg. Já nessa idade, observa-se que machos apresentam valores maiores fêmeas na mesma linhagem e ainda que SHR apresentam valores maiores que WKY em ambos os sexos (Figura 5). A análise estatística mostrou que a PAM dos machos WKY é maior que das fêmeas ($p = 0,021$), sem outras diferenças.

Figura 5: Comparação dos valores médios da pressão arterial média (expressa em mmHg $\pm$ EPM) entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 5 semanas de vida. N = 4 por grupo. # indica diferença significativa entre fêmeas os grupos SHR e WKY. @ indica diferença significativa entre machos os grupos SHR e WKY.

4.1.2 Animais com 20 semanas de vida

O peso corporal de SHR fêmeas variou de 182 a 200 g, com média de 187 ± 6 g; nos machos, esses valores variaram entre 255 a 304 g, com média de 283 ± 11 g. O peso corporal das fêmeas WKY variou entre 220 a 283 g com média de 257 ± 14 g; nos machos, esses valores ficaram entre 350 a 421 g, com média de 395 ± 16 g. Na figura 6 observa-se que as fêmeas SHR e WKY apresentam menor peso corporal em relação aos machos de mesma linhagem. Ainda, animais WKY apresentam peso corporal maior que SHR de mesmo sexo. Estatisticamente, animais WKY são mais pesados que SHR em ambos os sexos ($p = 0,003$ para fêmeas e $0,001$ para machos) bem como machos são mais pesados que fêmeas em ambas as linhagens ($p < 0,001$ para ambos).

Figura 6: Comparação dos valores médios de peso corporal (expresso em $g \pm EPM$) entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 20 semanas de vida. $N = 4$ por grupo. # indica diferença significativa entre fêmeas os grupos SHR e WKY. @ indica diferença significativa entre machos os grupos SHR e WKY.

A FC no SHR macho variou entre 272 e 378 bpm com média de 338 ± 23 bpm, e das fêmeas variou de 276 e 336 bpm, com média de 303 ± 13 bpm. A FC no WKY macho variou entre 330 e 400 bpm com média de 363 ± 14 bpm enquanto que nas fêmeas esses valores ficaram entre 300 e 400 bpm, com média de 340 ± 21 bpm. Não houve diferença significativa entre os gêneros de ambos grupos e entre os animais de mesmo gênero, de grupos diferentes (Figura 7).

Figura 7: Comparação dos valores médios de frequência cardíaca (expressa em bpm $\pm$ EPM) entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 20 semanas de vida. N = 4 por grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

A Pressão arterial média (PAM) em SHR fêmeas variou de 154 a 186 mmHg, com média 172 ± 8 mmHg; a dos machos variou de 180 a 210 mmHg, com média de 195 ± 6 mmHg. A PAM em WKY fêmeas variou de 136 a 166 mmHg, com média 148 ± 7 mmHg; a dos machos variou de 152 a 163 mmHg, com média de 158 ± 3 mmHg. Nessa idade, nota-se que SHR machos e fêmeas apresentam PAM maior que os respectivos WKY. Estatisticamente, machos SHR apresentam PAM maior que machos WKY ($p = 0,002$) sem outras diferenças (Figura 8).

Figura 8: Comparação dos valores médios de Pressão arterial média (expressa em mmHg $\pm$ EPM) entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 20 semanas de vida. N = 4 por grupo. # indica diferença significativa entre fêmeas os grupos SHR e WKY. @ indica diferença significativa entre machos os grupos SHR e WKY.

4.1.3 Animais com 50 semanas de vida

O peso corporal de SHR fêmeas variou de 217 a 225 g, com média de 222 ± 2 g; nos machos esse peso variou entre 350 a 375g, com média de 366 ± 5 g. O peso corporal das fêmeas WKY variou entre 276 a 346 g com média de 323 ± 16 g; nos machos o peso ficou entre 430 a 458g, com média de 446 ± 8 g. Na figura 7, observa-se que as fêmeas SHR e WKY apresentam menor peso corporal em relação ao macho. Além disso, SHR também apresentam peso menor que os WKY em ambos os sexos. Estatisticamente, machos são mais pesados que as fêmeas ($p < 0,001$) em ambas as linhagens, bem como animais WKY são mais pesados que SHR em ambos os sexos ($p < 0,001$) (Figura 9).

Figura 9: Comparação dos valores médios de peso corporal (expresso em $g \pm EPM$) entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 50 semanas de vida. $N = 4$ por grupo. # indica diferença significativa entre fêmeas os grupos SHR e WKY. @ indica diferença significativa entre machos os grupos SHR e WKY.

A Frequência cardíaca (FC) nos SHR machos variou entre 330 e 360 bpm com média de 350 ± 7 bpm, e das fêmeas variou de 306 e 318 bpm, com média de 314 ± 3 bpm. A FC nos WKY machos ficou entre 309 e 400 bpm com média de 352 ± 19 bpm, enquanto que nas fêmeas esses valores ficaram entre 309 e 374 bpm, com média de 341 ± 14 bpm. Não houve diferença significativa entre os gêneros de ambos grupos e entre os animais de mesmo gênero, de grupos diferentes (Figura 10).

Figura 10: Comparação dos valores médios de frequência cardíaca (expressa em bpm $\pm$ EPM) entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 50 semanas de vida. N = 4 por grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

A Pressão arterial média (PAM) em SHR fêmeas variou de 194 a 219 mmHg, com média de 210 ± 5 mmHg; a dos machos variou de 213 a 226 mmHg, com média de 220 ± 3 mmHg. A PAM em WKY fêmeas variou de 138 a 158 mmHg, com média 146 ± 4 mmHg e a dos machos variou de 121 a 170 mmHg, com média de 149 ± 11 mmHg. A figura 9 mostra que os SHR apresentam valores maiores de PAM que os WKY em ambos os sexos. A figura 11 mostra que os SHR apresentam valores maiores de PAM que os WKY em ambos os sexos e essa diferença foi significativa ($p < 0,001$ em ambos) sem diferenças entre machos e fêmeas da mesma linhagem.

Figura 11: Comparação dos valores médios de pressão arterial média (expressa em mmHg $\pm$ EPM) entre o grupo SHR (fêmeas e machos) e WKY (fêmeas e machos), com 50 semanas de vida. N = 4 por grupo. # indica diferença significativa entre fêmeas os grupos SHR e WKY. @ indica diferença significativa entre machos os grupos SHR e WKY.

4.2 Análise Morfológica do Nervo Vago

O exame das secções transversais semifinas dos nervos vagos, coradas com azul de toluidina a 1%, à microscopia de luz, mostrou que esse nervo é, em geral, constituído por um fascículo, sendo classificados como monofasciculado (Figura 12).

As observações morfológicas do nervo vago mostraram que estes apresentam um fascículo grande, de forma redonda ou oval. Esse nervo mostrou seus fascículos bem definidos sendo circundados por um perineuro, limitando o espaço endoneural, que apresentou centenas de fibras mielínicas e amielínicas, de diversos diâmetros, acompanhando o longo eixo do nervo. As fibras mielínicas apresentam axônios envolvidos por uma bainha de mielina típica, que mantém sua espessura relativa conforme aumenta o calibre dessas fibras (Figuras 13, 14).

No espaço endoneural, verificou-se ainda a presença de elementos celulares usuais, como núcleos de células de Schwann associados às fibras mielínicas e amielínicas, núcleos de fibroblastos, células endoteliais de capilares e mastócitos. Os núcleos dos fibroblastos aparecem em número bem menor que os das células de Schwann, sendo um núcleo fusiforme, de coloração mais clara e sem relação de proximidade com os axônios (Figuras 15, 16 e 17).

Muitos mastócitos foram facilmente identificados, devido a presença de grânulos metacromáticos no seu citoplasma. Uma grande de variação a coloração dos grânulos desses mastócitos pode ser observada. Algumas células apresentaram-se com grânulos mais intensamente corados, outros com grânulos menos corados e, outros ainda, com grânulos de várias tonalidades.

Ainda a presença de vasos capilares, geralmente múltiplos, acompanhando o eixo longitudinal do nervo, por entre as fibras nervosas, foi observada em todos os segmentos estudados.

Em vários dos segmentos estudados, foi encontrada a presença de um grupo celular, formada por células granulares com núcleo claro e arredondado, entre as quais observa-se grande número de capilares (em número muito maior que do restante de todo o nervo). Esse grupo celular, que esteve quase sempre presente na periferia do nervo, muito próximo ao perineuro, porem no interior do endoneuro, é conhecido como paragânglio. Em alguns casos, esse grupo celular parecia apresentar um envoltório de tecido conjuntivo semelhante ao perineuro do fascículo. Os paragânglios, ora grandes,

ora pequenos, foram observados nos nervos direito e esquerdo tanto de machos quanto fêmeas, sem aparente preferência de aparecimento entre os diferentes níveis do nervo ou entre os gêneros (Figura 17 e 18).

Figura 12: Secções transversais semifinas dos nervos vagos de fêmeas em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e WKY com 5 semanas de vida. Na parte superior segmento proximal (A) e distal (B) do mesmo animal. Na parte inferior segmento proximal (C) e distal (D). Notar a presença de um perineuro bem definido envolvendo o fascículo, vasos sanguíneos endoneurais, sendo que no segmento distal observa um agrupamento de fibras de maior calibre na periferia do nervo (entre as pontas de seta). Coloração = Azul de toluidina a 1%, Barra= 20 μ m.

Figura 13: Secções transversais semifinas dos nervos vagos. Na parte superior segmento distal no nervo vago de fêmeas da linhagem SHR com 5 semanas (a), 20 semanas (B) e 50 semanas (C) de vida. Na parte inferior segmentos distais dos nervos vagos, linhagem WKY de fêmeas com 5 semanas (D), 20 semanas (E) e 50 semanas (F) de vida. Coloração = Azul de toluidina a 1%, Barra= 20 µm.

Figura 14: Secções transversais semifinas dos nervos vagos de machos, linhagem SHR segmentos distal e proximal. Na parte superior segmento distal no nervo vago, SHR, com 5 semanas (A), 20 semanas (B) de vida. Na parte inferior segmentos proximais de 50 semanas (C) de vida. Coloração = Azul de toluidina a 1%, Barra= 20 μm .

Figura 15: Detalhe do espaço endoneural dos fascículos dos nervos vagos WKY fêmeas utilizadas no presente estudo. Notar, em A e B presença de fibras mielínicas grandes, dispersas no endoneuro, misturadas as fibras mielínicas de menor tamanho. Perineuro é bom definido (cabeças das setas), vasos sanguíneos endoneurais (V). Presença de núcleos de células de Schwann (asterisco) associado as fibras mielínicas. Em B, notar a presença de um fibroblasto (seta amarela) no espaço endoneural e mastócito (β). Coloração: Azul de toluidina a 1%. Barra = 10 μ m.

Figura 16: Secção transversal semifina de um fascículo do nervo vago distal de SHR machos com um parânglio no interior do endoneuro (A), com perineuro bem definido e vasos sanguíneos. Em B, no espaço endoneural dos fascículos presença de fibras mielínicas grandes (M), dispersas no endoneuro, misturadas as fibras mielínicas de menor tamanho e fibras amielínicas (A). Presença de núcleos de células de Schwann associado as fibras mielínicas, fibroblasto (seta amarela) e parânglio (setas verdes). Coloração: Azul de toluidina a 1%. Barra = 20 μ m (A) e 10 μ m (B).

Figura 17: Detalhe do espaço endoneural dos fascículos dos nervos vagos SHR fêmeas utilizadas no presente estudo. Em A, presença de fibras mielínicas grandes (M), dispersas no endoneuro, misturadas as fibras mielínicas de menor tamanho. Presença de núcleos de células de Schwann associado as fibras mielínicas, fibroblasto (seta amarela) e paragânglio (setas verdes). Notar-se no B presença de vasos colabados (V) com paredes espessas. Coloração: Azul de toluidina a 1%. Barra = 10 μ m.

4.3 Análise Morfométrica dos Fascículos e das Fibras Mielínicas

4.3.1 Morfometria do Nervo Vago de WKY

4.3.1.1 Morfometria do Nervo Vago de WKY com 5 semanas de vida

Os dados de morfometria dos fascículos dos nervos vagos de ratos WKY com 5 semanas de vida, fêmeas e machos, como área fascicular total, diâmetro mínimo fascicular, número de fibras mielínicas e sua densidade estão mostrados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 3: Paramentos morfométricos fasciculares dos nervos vagos de WKY fêmeas, com 05 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n= 4)	Distal (n= 4)	Proximal (n= 4)	Distal (n= 4)
Área fascicular total (µm²)	39562± 1848	37559 ± 2304	40611 ± 6494	38605 ± 4007
Diâmetro mínimo fascicular (µm)	195 ± 8	182 ± 13	182 ± 20	179 ± 16
Número de fibras mielínicas	1450 ± 212	1274 ± 204	1516 ± 323	1265 ± 197
Densidade de fibras mielínicas (fibras/mm²)	36300 ± 4095	33962 ± 5276	36173 ± 4809	33112 ± 4734

Valores expressos em média ±EPM. N=número de animais analisados. *indica p<0,05 na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Comparado os dados fasciculares do nervo vago de WKY, notou-se que, de maneira geral, os segmentos proximais geralmente são maiores que os distais. A mesma observação é válida para o número de fibras mielínicas. A análise estatística não mostrou diferenças nas comparações entre segmentos de mesmo lado ou entre mesmo nível em lados diferentes para todos os parâmetros analisados, em ambos os sexos.

Tabela 4: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de WKY machos, com 05 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n= 4)	Distal (n= 4)	Proximal (n= 4)	Distal (n= 4)
Área fascicular total (μm^2)	56710 $\pm$ 2064	50258 $\pm$ 6264	54834 $\pm$ 6003	47873 $\pm$ 8323
Diâmetro mínimo fascicular (μm)	220 $\pm$ 9	199 $\pm$ 18	221 $\pm$ 16	215 $\pm$ 14
Número de fibras mielínicas	2231 $\pm$ 102	2089 $\pm$ 68	1859 $\pm$ 24	1529 $\pm$ 86
Densidade de fibras mielínicas (fibras/ mm^2)	39657 $\pm$ 3023	44277 $\pm$ 7512	34928 $\pm$ 3171	34043 $\pm$ 4564

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Ao comparar os dados fasciculares do nervo vago de WKY machos, notou-se que, os segmentos proximais são maiores que os distais. A análise estatística não mostrou diferenças nas comparações entre segmentos de mesmo lado ou entre mesmo nível em lados diferentes para todos os parâmetros analisados, em ambos os sexos.

A média dos parâmetros morfométricos de axônios mielinizados e fibras mielínicas (área da fibra, diâmetro mínimo da fibra, razão G, área da bainha de mielina, área do axônio, diâmetro mínimo do axônio) de ratos WKY com 5 semanas de vida, fêmeas e machos são demonstrados nas tabelas 3 e 4 respectivamente.

Tabela 3: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos de WKY fêmeas, com 5 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Fibras				
Mielínicas				
Área (μm^2)	6,31 $\pm$ 0,48	6,69 $\pm$ 0,40	6,39 $\pm$ 0,48	6,22 $\pm$ 0,27
Diâmetro mínimo (μm)	2,31 $\pm$ 0,06	2,38 $\pm$ 0,10	2,29 $\pm$ 0,09	2,33 $\pm$ 0,04
Razão G	0,55 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,01	0,59 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01
Área da bainha de mielina (μm^2)	4,33 $\pm$ 0,51	4,51 $\pm$ 0,22	4,00 $\pm$ 0,33	4,16 $\pm$ 0,23
Axônios				
Mielinizados				
Área (μm^2)	1,97 $\pm$ 0,09	2,18 $\pm$ 0,21	2,06 $\pm$ 0,12	2,39 $\pm$ 0,16
Diâmetro mínimo (μm)	1,26 $\pm$ 0,05	1,97 $\pm$ 0,09	1,35 $\pm$ 0,05	1,30 $\pm$ 0,03

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Tabela 4: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos de WKY machos, com 05 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Fibras Mielínicas				
Área (μm^2)	6,35 $\pm$ 0,32	6,02 $\pm$ 0,44	6,72 $\pm$ 0,44	6,12 $\pm$ 0,63
Diâmetro mínimo (μm)	2,26 $\pm$ 0,04	2,22 $\pm$ 0,06	2,40 $\pm$ 0,07	2,77 $\pm$ 0,11
Razão G	0,55 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,01
Área da bainha de mielina (μm^2)	4,41 $\pm$ 0,22	3,95 $\pm$ 0,37	4,66 $\pm$ 0,45	3,96 $\pm$ 0,41
Axônios				
Mielinizados				
Área (μm^2)	1,94 $\pm$ 0,11	2,07 $\pm$ 0,08	2,06 $\pm$ 0,20	2,16 $\pm$ 0,22
Diâmetro mínimo (μm)	1,22 $\pm$ 0,02	1,27 $\pm$ 0,02	1,30 $\pm$ 0,05	1,31 $\pm$ 0,07

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Comparando os dados da morfometria das fibras mielínicas do nervo vago de WKY fêmeas e machos com 5 semanas de idade, não observamos diferença significativa entre os parâmetros estudados, tanto entre segmentos de um mesmo lado quanto entre lados.

4.3.1.2 Morfometria do Nervo Vago de WKY com 20 semanas de vida

Os dados de morfometria dos fascículos dos nervos vagos de ratos WKY com 20 semanas de vida, fêmeas e machos como área fascicular total, diâmetro mínimo fascicular, número de fibras mielínicas e sua densidade, estão mostrados nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de WKY fêmea, com 20 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n= 4)	Distal (n= 4)	Proximal (n= 4)	Distal (n= 4)
Área fascicular total (μm^2)	72377 $\pm$ 2388	66296 $\pm$ 5450	64068 $\pm$ 2890	62077 $\pm$ 5974
Diâmetro mínimo fascicular (μm)	273 $\pm$ 6	245 $\pm$ 18	241 $\pm$ 18	242 $\pm$ 19
Número de fibras mielínicas	2768 $\pm$ 85	2299 $\pm$ 130	2673 $\pm$ 51	2162 $\pm$ 64
Densidade de fibras mielínicas (fibras/ mm^2)	38366 $\pm$ 1686	35991 $\pm$ 2145	35481 $\pm$ 2283	35481 $\pm$ 2283

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Comparado os dados fasciculares, de maneira geral, os segmentos proximais geralmente são maiores que os distais, em ambos os sexos. A mesma observação é válida para o número de fibras mielínicas.

Na comparação entre segmentos proximal e distal e lados direito e esquerdo do parâmetro fascicular não foi possível encontrar diferença estatística significativa.

Tabela 6: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de WKY machos, com 20 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Área fascicular total (μm^2)	85489 $\pm$ 10030	90618 $\pm$ 7580	71521 $\pm$ 6585	70540 $\pm$ 2157
Diâmetro mínimo fascicular (μm)	289 $\pm$ 19	284 $\pm$ 6	250 $\pm$ 29	247 $\pm$ 7
Número de fibras mielínicas	2977 $\pm$ 177	2706 $\pm$ 118	2470 $\pm$ 212	2513 $\pm$ 193
Densidade de fibras mielínicas (fibras/mm ²)	36508 $\pm$ 5402	30619 $\pm$ 3489	34602 $\pm$ 262	35549 $\pm$ 2180

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Na comparação entre segmentos e lados dos grupos WKY 20 semanas macho não constatou-se diferença estatística significante.

As médias dos parâmetros morfométricos de axônios mielinizados e fibras mielínicas (área da fibra, diâmetro mínimo da fibra, razão G, área da bainha de mielina, área do axônio, diâmetro mínimo do axônio) de ratos WKY com 20 semanas de vida, fêmeas e machos são demonstrados nas tabelas 7 e 8 respectivamente.

Tabela 7: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos de WKY fêmeas, com 20 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Fibras Mielínicas				
Área (μm^2)	7,86 $\pm$ 0,38	8,84 $\pm$ 0,32	8,24 $\pm$ 0,49	8,36 $\pm$ 0,81
Diâmetro mínimo (μm)	2,51 $\pm$ 0,01	2,70 $\pm$ 0,07	2,59 $\pm$ 0,08	2,59 $\pm$ 0,11
Razão G	0,55 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01
Área da bainha de mielina (μm^2)	5,23 $\pm$ 0,43	6,01 $\pm$ 0,32	5,51 $\pm$ 0,20	5,60 $\pm$ 0,67
Axônios				
Mielinizados				
Área (μm^2)	2,63 $\pm$ 0,08	2,83 $\pm$ 0,22	2,73 $\pm$ 0,30	2,59 $\pm$ 0,11
Diâmetro mínimo (μm)	1,37 $\pm$ 0,02	1,45 $\pm$ 0,06	1,40 $\pm$ 0,07	1,41 $\pm$ 0,03

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Tabela 8: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos de WKY machos, com 20 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Fibras Mielínicas				
Área (μm^2)	9,28 $\pm$ 0,19	9,88 $\pm$ 0,64	8,64 $\pm$ 0,48	9,22 $\pm$ 0,25
Diâmetro mínimo (μm)	2,74 $\pm$ 0,04	2,79 $\pm$ 0,11	2,64 $\pm$ 0,07	2,72 $\pm$ 0,04
Razão G	0,57 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,01
Área da bainha de mielina (μm^2)	6,25 $\pm$ 0,10	5,38 $\pm$ 1,57	5,92 $\pm$ 0,46	6,37 $\pm$ 0,29
Axônios				
Mielinizados				
Área (μm^2)	2,82 $\pm$ 0,17	3,25 $\pm$ 0,24	2,72 $\pm$ 0,10	2,85 $\pm$ 0,14
Diâmetro mínimo (μm)	1,49 $\pm$ 0,04	1,57 $\pm$ 0,07	1,47 $\pm$ 0,03	1,50 $\pm$ 0,03

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Comparando os dados da morfometria das fibras mielínicas do nervo vago de WKY fêmeas e machos com 20 semanas de idade, não observamos diferença significativa entre os parâmetros estudados, tanto entre segmentos de um mesmo lado quanto entre lados.

4.3.1.3 Morfometria do Nervo Vago de WKY com 50 semanas de vida

Os dados de morfometria dos fascículos dos nervos vagos de ratos WKY com 50 semanas de vida, fêmeas e machos como área fascicular total, diâmetro mínimo fascicular, número de fibras mielínicas e sua densidade, estão mostrados nas tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de WKY fêmeas com 50 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Área fascicular total (μm^2)	81061 $\pm$ 10858	79831 $\pm$ 10571	80915 $\pm$ 9969	65594 $\pm$ 3986
Diâmetro mínimo fascicular (μm)	292 $\pm$ 15	281 $\pm$ 10	259 $\pm$ 17	251 $\pm$ 19
Número de fibras mielínicas	2737 $\pm$ 90	2733 $\pm$ 244	2715 $\pm$ 160	2069 $\pm$ 227
Densidade de fibras mielínicas (fibras/ mm^2)	35411 $\pm$ 4377	35079 $\pm$ 2296	35203 $\pm$ 4947	32334 $\pm$ 5100

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Comparado os dados fasciculares, de maneira geral, os segmentos proximais geralmente são maiores que os distais, em ambos os sexos. A mesma observação é válida para o diâmetro mínimo, número de fibras mielínicas. A análise estatística não mostrou diferenças nas comparações entre segmentos de mesmo lado ou entre mesmo nível em lados diferentes para todos os parâmetros analisados.

Tabela 10: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de WKY machos, com 50 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Área fascicular total (μm^2)	95294 $\pm$ 3112	87125 $\pm$ 3236	92779 $\pm$ 9586	77712 $\pm$ 8601
Diâmetro mínimo fascicular (μm)	293 $\pm$ 8	283 $\pm$ 9	307 $\pm$ 22	260 $\pm$ 23
Número de fibras mielínicas	3251 $\pm$ 192	2897 $\pm$ 394	2628 $\pm$ 365	2403 $\pm$ 305
Densidade de fibras mielínicas (fibras/ mm^2)	34269 $\pm$ 2538	33357 $\pm$ 4587	29142 $\pm$ 4462	31067 $\pm$ 2950

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Comparado os dados fasciculares, notou-se que, os segmentos proximais geralmente são maiores que os distais, em ambos os lados. A análise estatística não constatou-se diferenças nas comparações entre segmentos e lados em todos os parâmetros para o grupo WKY 50 semanas machos.

A média dos parâmetros morfométricos de axônios mielinizados e fibras mielínicas (área da fibra, diâmetro mínimo da fibra, razão G, área da bainha de mielina, área do axônio, diâmetro mínimo do axônio) de ratos WKY com 50 semanas de vida, fêmeas e machos são demonstrados nas tabelas 11 e 12 respectivamente.

Tabela 11: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos de ratas WKY fêmea, com 50 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Fibras Mielínicas				
Área (μm^2)	12,87 $\pm$ 1,10	12,54 $\pm$ 0,79	11,35 $\pm$ 1,41	12,42 $\pm$ 1,38
Diâmetro mínimo (μm)	3,23 $\pm$ 0,15	3,14 $\pm$ 0,10	2,93 $\pm$ 0,18	3,14 $\pm$ 0,16
Razão G	0,54 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,02
Área da bainha de mielina (μm^2)	8,46 $\pm$ 0,49	8,57 $\pm$ 0,49	8,11 $\pm$ 1,02	8,57 $\pm$ 0,83
Axônios Mielinizados				
Área (μm^2)	4,19 $\pm$ 0,63	3,79 $\pm$ 0,16	3,24 $\pm$ 0,39	3,85 $\pm$ 0,63
Diâmetro mínimo (μm)	1,73 $\pm$ 0,13	1,68 $\pm$ 0,06	1,50 $\pm$ 0,10	1,65 $\pm$ 0,12

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Tabela 12: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos de WKY macho, com 50 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Fibras Mielínicas				
Área (μm^2)	10,69 $\pm$ 0,36	10,71 $\pm$ 0,29	12,37 $\pm$ 1,59	12,24 $\pm$ 1,10
Diâmetro mínimo (μm)	2,94 $\pm$ 0,08	2,99 $\pm$ 0,07	3,14 $\pm$ 0,20	3,13 $\pm$ 0,14
Razão G	0,57 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,01
Área da bainha de mielina (μm^2)	7,07 $\pm$ 0,41	7,23 $\pm$ 0,07	8,07 $\pm$ 0,83	8,43 $\pm$ 0,70
Axônios Mielinizados				
Área (μm^2)	3,62 $\pm$ 0,35	3,47 $\pm$ 0,24	4,30 $\pm$ 0,77	3,81 $\pm$ 0,43
Diâmetro mínimo (μm)	1,64 $\pm$ 0,09	1,65 $\pm$ 0,07	1,77 $\pm$ 0,16	1,70 $\pm$ 0,09

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Área do Gráfico

Comparando os dados da morfometria das fibras mielínicas do nervo vago de WKY fêmeas e machos com 50 semanas de idade, não observamos diferença significativa entre os parâmetros estudados, tanto entre segmentos de um mesmo lado.

4.3.1.4 Comparação de dados morfométricos dos Fascículos e Fibras Mielínicas entre Fêmeas e Machos de WKY.

As comparações entre as idades dos valores médios nas fêmeas e machos de WKY com 5, 20, 50 semanas de idade observamos diferença significativa entre os parâmetros estudados.

Analizamos os dados da morfometria dos fascículos dos nervos vagos em fêmeas, área fascicular total mostrou diferença significativa com $p = 0,003$ no segmento proximal direito. O número de fibras dos machos, na comparação entre todos os grupos estudados no segmento proximal direito apresentou $p = 0,004$.

Comparando os dados da morfometria das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos entre as fêmeas de WKY 5, 20, 50 semanas de idade observamos diferença significativa entre os parâmetros diâmetro mínimo da fibra ($p = 0,002$), área da bainha ($p = 0,002$), área da fibra ($p = 0,001$) no segmento distal esquerdo. Quando estudamos o lado direito, não observamos diferença significativa. Para os machos observamos diferença significativa no diâmetro axônio ($p = 0,002$) no segmento proximal direito. Ao analisamos o segmento distal esquerdo no diâmetro axônio ($p = 0,001$), área do axônio ($p = 0,003$).

4.3.2 Morfometria do Nervo Vago de SHR

4.3.2.1 Morfometria do Nervo Vago de SHR com 5 semanas de vida

Os dados de morfometria dos fascículos dos nervos vagos de ratos SHR com 5 semanas de vida, fêmeas e machos, como área fascicular total, diâmetro mínimo fascicular, número de fibras mielínicas e sua densidade, estão mostrados nas tabelas 13 e 14, respectivamente.

Tabela 13: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de SHR fêmeas, com 05 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Área fascicular total (μm^2)	43060 $\pm$ 3672	42510 $\pm$ 4023	41235 $\pm$ 2814	39055 $\pm$ 4618
Diâmetro mínimo fascicular (μm)	221 $\pm$ 10	204 $\pm$ 16	201 $\pm$ 10	210 $\pm$ 14
Número de fibras mielínicas	1737 $\pm$ 84	1657 $\pm$ 101	1511 $\pm$ 85	1392 $\pm$ 53
Densidade de fibras mielínicas (fibras/ mm^2)	41500 $\pm$ 4848	39496 $\pm$ 2230	36896 $\pm$ 2304	37651 $\pm$ 6045

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p<0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Comparado os dados fasciculares do nervo vago de SHR, 5 semanas notou-se que, de maneira geral, os segmentos proximais geralmente são maiores que os distais, em ambos os sexos. A análise estatística não mostrou diferenças nas comparações entre segmentos de mesmo lado ou entre mesmo nível em lados diferentes para todos os parâmetros analisados, em ambos os sexos.

Tabela14: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de SHR machos, com 05 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Área fascicular total (μm^2)	56370 $\pm$ 7457	55926 $\pm$ 7041	56961 $\pm$ 8344	54494 $\pm$ 8743
Diâmetro mínimo fascicular (μm)	196 $\pm$ 26	253 $\pm$ 68	240 $\pm$ 21	220 $\pm$ 21
Número de fibras mielínicas	1740 $\pm$ 167	1433 $\pm$ 172	1425 $\pm$ 84	1391 $\pm$ 24
Densidade de fibras mielínicas (fibras/ mm^2)	32410 $\pm$ 5235	25795 $\pm$ 1123	25854 $\pm$ 2047	27443 $\pm$ 4053

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p<0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Comparado os dados fasciculares, semanas notou-se que, os segmentos proximais geralmente são maiores que os distais. A análise estatística não mostrou diferenças nas comparações entre segmentos de mesmo lado ou entre mesmo nível em lados diferentes para todos os parâmetros analisados, em ambos os sexos.

A média dos parâmetros morfométricos de axônios mielinizados e fibras mielínicas (área da fibra, diâmetro mínimo da fibra, razão G, área da bainha de mielina, área do axônio, diâmetro mínimo da do axônio) de ratos SHR com 5 semanas de vida, fêmeas e machos são demonstrados nas tabelas 15 e 16 respectivamente.

Ao comparar os dados da morfometria das fibras mielínicas, obtido entre os segmentos de um mesmo lado, observa-se que os valores dos segmentos proximais são geralmente maiores que os distais, para o lado direito. A análise estatística não evidenciou nenhuma diferença significativa entre os dados morfométricos das fibras mielínicas e seus respectivos axônios, para os segmentos proximal e distal de um mesmo lado bem como entre lados direito e esquerdo no mesmo nível.

Tabela 15: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos de SHR fêmeas, com 5 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Fibras Mielínicas				
Área (μm^2)	6,38 $\pm$ 0,27	5,94 $\pm$ 0,34	5,99 $\pm$ 0,39	6,01 $\pm$ 0,30
Diâmetro mínimo (μm)	2,39 $\pm$ 0,07	2,32 $\pm$ 0,07	2,31 $\pm$ 0,09	2,34 $\pm$ 0,06
Razão G	0,53 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,02
Área da bainha de mielina (μm^2)	4,43 $\pm$ 0,27	4,05 $\pm$ 0,35	4,07 $\pm$ 0,35	4,10 $\pm$ 0,27
Axônios				
Mielinizados				
Área (μm^2)	1,95 $\pm$ 0,02	1,90 $\pm$ 0,09	1,92 $\pm$ 0,08	1,90 $\pm$ 0,13
Diâmetro mínimo (μm)	1,27 $\pm$ 0,02	1,27 $\pm$ 0,03	1,25 $\pm$ 0,03	1,27 $\pm$ 0,04

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Tabela 16: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos de SHR machos, com 05 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Fibras Mielínicas				
Área (μm^2)	5,17 $\pm$ 0,51	5,46 $\pm$ 0,33	5,40 $\pm$ 0,16	5,84 $\pm$ 0,56
Diâmetro mínimo (μm)	2,10 $\pm$ 0,09	2,18 $\pm$ 0,06	2,16 $\pm$ 0,03	2,20 $\pm$ 0,31
Razão G	0,57 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,01
Área da bainha de mielina (μm^2)	3,27 $\pm$ 0,29	3,62 $\pm$ 0,23	3,56 $\pm$ 0,07	3,78 $\pm$ 0,28
Axônios Mielinizados				
Área (μm^2)	1,90 $\pm$ 0,23	1,84 $\pm$ 0,18	1,84 $\pm$ 0,14	2,06 $\pm$ 0,31
Diâmetro mínimo (μm)	1,21 $\pm$ 0,06	1,21 $\pm$ 0,04	1,20 $\pm$ 0,04	1,24 $\pm$ 0,08

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p<0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Ao comparar os resultados obtidos, a análise estatística não evidenciou nenhuma diferença significativa entre os dados morfométricos das fibras mielínicas e seus respectivos axônios, para os segmentos proximal e distal de um mesmo lado bem como entre lados direito e esquerdo.

4.3.2.2 Morfometria do Nervo Vago de SHR com 20 semanas de vida

Os dados de morfometria dos fascículos dos nervos vagos de ratos SHR com 20 semanas de vida, fêmeas e machos como área fascicular total, diâmetro mínimo fascicular, número de fibras mielínicas e sua densidade, estão mostrados nas tabelas 17 e 18, respectivamente.

Tabela 17: Paramentos morfométricos fasciculares dos nervos vagos de SHR fêmeas, com 20 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Área fascicular total (μm^2)	63057 $\pm$ 5131	62117 $\pm$ 1934	53698 $\pm$ 4357	54011 $\pm$ 9151
Diâmetro mínimo fascicular (μm)	234 $\pm$ 21	267 $\pm$ 7	244 $\pm$ 13	223 $\pm$ 16
Número de fibras mielínicas	1202 $\pm$ 77	1146 $\pm$ 52	1122 $\pm$ 26	792 $\pm$ 32
Densidade de fibras mielínicas (fibras/ mm^2)	19351 $\pm$ 1690	18432 $\pm$ 331	21151 $\pm$ 1541	20175 $\pm$ 4561

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p<0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Comparado os dados fasciculares nos segmentos proximais geralmente são maiores que os distais, para lado direito. A mesma observação é válida para o número de fibras mielínicas. A análise estatística não mostrou diferenças nas comparações entre segmentos de mesmo lado ou entre mesmo nível em lados diferentes para todos os parâmetros analisados, em ambos os sexos.

Tabela 18: Paramentos morfométricos fasciculares dos nervos vagos de SHR machos, com 20 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Área fascicular total (μm^2)	72553 $\pm$ 5609	72691 $\pm$ 4192	73565 $\pm$ 11302	65748 $\pm$ 3335
Diâmetro mínimo fascicular (μm)	295 $\pm$ 19	260 $\pm$ 10	315 $\pm$ 52	270 $\pm$ 6
Número de fibras mielínicas	1251 $\pm$ 28	1171 $\pm$ 65	1201 $\pm$ 73	1075 $\pm$ 36
Densidade de fibras mielínicas (fibras/ mm^2)	1754 $\pm$ 1390	16418 $\pm$ 1813	17100 $\pm$ 1865	16464 $\pm$ 936

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p<0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Comparado os dados fasciculares do nervo vago, os segmentos proximais geralmente são maiores que os distais, para lado esquerdo. A mesma observação é válida para o diâmetro mínimo, número de fibras mielínicas e densidade de fibras. A análise estatística não mostrou diferenças nas comparações entre segmentos de mesmo lado ou entre mesmo nível em lados diferentes para todos os parâmetros analisados.

A média dos parâmetros morfométricos de axônios mielinizados e fibras mielínicas (área da fibra, diâmetro mínimo da fibra, razão G, área da bainha de mielina, área do axônio, diâmetro mínimo da do axônio) de ratos SHR com 20 semanas de vida, fêmeas e machos são demonstrados nas tabelas 19 e 20 respectivamente.

Tabela 19: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos de SHR fêmeas, com 20 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Fibras Mielínicas				
Área (μm^2)	11,41 $\pm$ 0,40	11,77 $\pm$ 0,46	10,20 $\pm$ 0,70	12,20 $\pm$ 1,28
Diâmetro mínimo (μm)	3,16 $\pm$ 0,05	3,21 $\pm$ 0,07	2,97 $\pm$ 0,11	3,19 $\pm$ 0,14
Razão G	0,50 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,03
Área da bainha de mielina (μm^2)	8,65 $\pm$ 0,45	8,80 $\pm$ 0,35	7,38 $\pm$ 0,58	8,91 $\pm$ 1,21
Axônios Mielinizados				
Área (μm^2)	2,77 $\pm$ 0,08	2,97 $\pm$ 0,15	2,82 $\pm$ 0,15	3,29 $\pm$ 0,11
Diâmetro mínimo (μm)	1,54 $\pm$ 0,02	1,60 $\pm$ 0,04	1,54 $\pm$ 0,05	1,64 $\pm$ 0,02

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p<0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Tabela 20: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos de SHR machos, com 20 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Fibras Mielínicas				
Área (μm^2)	12,22 $\pm$ 0,62	13,47 $\pm$ 1,36	11,70 $\pm$ 0,035	12,30 $\pm$ 0,43
Diâmetro mínimo (μm)	3,24 $\pm$ 0,09	3,31 $\pm$ 0,13	3,23 $\pm$ 0,04	3,23 $\pm$ 0,06
Razão G	0,47 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,01
Área da bainha de mielina (μm^2)	9,47 $\pm$ 0,45	10,41 $\pm$ 1,14	8,86 $\pm$ 0,28	9,41 $\pm$ 0,32
Axônios Mielinizados				
Área (μm^2)	2,75 $\pm$ 0,30	3,07 $\pm$ 0,30	2,85 $\pm$ 0,08	2,90 $\pm$ 0,24
Diâmetro mínimo (μm)	1,49 $\pm$ 0,08	1,55 $\pm$ 0,08	1,54 $\pm$ 0,03	1,52 $\pm$ 0,06

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p<0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Ao comparar os resultados obtidos (Tabela 19 e 20), a análise estatística não evidenciou nenhuma diferença significativa entre os dados morfométricos das fibras mielínicas e seus respectivos axônios, para os segmentos proximal e distal de um mesmo lado bem como entre lados direito e esquerdo no mesmo nível.

4.3.2.3 Morfometria do Nervo Vago de SHR com 50 semanas de vida

Os dados de morfometria dos fascículos dos nervos vagos de ratos SHR com 50 semanas de vida, fêmeas e machos como área fascicular total, diâmetro mínimo fascicular, número de fibras mielínicas e sua densidade, estão mostrados nas tabelas 21 e 22, respectivamente.

Tabela 21: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vagos de SHR fêmeas com 50 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Área fascicular total (μm^2)	85282 $\pm$ 7444	82286 $\pm$ 3938	56426 $\pm$ 6158	54565 $\pm$ 6880
Diâmetro mínimo fascicular (μm)	291 $\pm$ 10	289 $\pm$ 12	241 $\pm$ 15	248 $\pm$ 22
Número de fibras mielínicas	2296 $\pm$ 179	2174 $\pm$ 79	1791 $\pm$ 155	1874 $\pm$ 116
Densidade de fibras mielínicas (fibras/ mm^2)	27551 $\pm$ 3276	26492 $\pm$ 808	32190 $\pm$ 2463	29115 $\pm$ 937

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Comparado os dados fasciculares do nervo vago de SHR, notou-se que, os segmentos proximais geralmente são maiores que os distais. A mesma observação é válida para o número de fibras mielínicas. A análise estatística não mostrou diferenças nas comparações entre segmentos de mesmo lado ou entre mesmo nível em lados diferentes para todos os parâmetros analisados.

Tabela 22: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos vago de SHR machos, com 50 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Área fascicular total (μm^2)	82624 $\pm$ 5213	81852 $\pm$ 3193	78382 $\pm$ 6889	76824 $\pm$ 6051
Diâmetro mínimo fascicular (μm)	272 $\pm$ 18	297 $\pm$ 6	260 $\pm$ 11	292 $\pm$ 14
Número de fibras mielínicas	1968 $\pm$ 129	1960 $\pm$ 99	2239 $\pm$ 108	1997 $\pm$ 114
Densidade de fibras mielínicas (fibras/ mm^2)	24111 $\pm$ 2119	25036 $\pm$ 1458	29315 $\pm$ 3172	26365 $\pm$ 2149

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Comparado os dados fasciculares do nervo vago, notou-se que, os segmentos proximais geralmente são maiores que os distais. A mesma observação é válida para o número de fibras mielínicas. A análise estatística não mostrou diferenças nas comparações entre segmentos de mesmo lado ou entre mesmo nível em lados diferentes para todos os parâmetros analisados.

A média dos parâmetros morfométricos de axônios mielinizados e fibras mielínicas (área da fibra, diâmetro mínimo da fibra, razão G, área da bainha de mielina, área do axônio, diâmetro mínimo da do axônio) de ratos SHR com 50 semanas de vida, fêmeas e machos são demonstrados nas tabelas 23 e 24 respectivamente.

Tabela 23: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos de ratas SHR fêmea, com 50 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Fibras Mielínicas				
Área (μm^2)	12,20 $\pm$ 0,68	12,24 $\pm$ 0,51	10,21 $\pm$ 1,07	10,97 $\pm$ 0,72
Diâmetro mínimo (μm)	3,20 $\pm$ 0,07	3,24 $\pm$ 0,06	2,96 $\pm$ 0,13	3,05 $\pm$ 0,11
Razão G	0,52 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,01
Área da bainha de mielina (μm^2)	8,42 $\pm$ 0,42	8,31 $\pm$ 0,06	6,60 $\pm$ 0,81	7,52 $\pm$ 0,60
Axônios Mielinizados				
Área (μm^2)	3,78 $\pm$ 0,47	3,94 $\pm$ 0,35	3,61 $\pm$ 0,34	3,46 $\pm$ 0,22
Diâmetro mínimo (μm)	1,67 $\pm$ 0,08	1,74 $\pm$ 0,07	1,66 $\pm$ 0,06	1,62 $\pm$ 0,05

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Tabela 24: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos de ratas SHR macho, com 50 semanas de vida.

	Lado Direito		Lado Esquerdo	
	Proximal (n=4)	Distal (n=4)	Proximal (n=4)	Distal (n=4)
Fibras Mielínicas				
Área (μm^2)	12,53 $\pm$ 0,64	13,30 $\pm$ 1,45	11,64 $\pm$ 0,25	14,19 $\pm$ 1,02
Diâmetro mínimo (μm)	3,28 $\pm$ 0,10	3,46 $\pm$ 0,22	3,19 $\pm$ 0,03	3,46 $\pm$ 0,16
Razão G	0,57 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,01	0,51 $\pm$ 0,01
Área da bainha de mielina (μm^2)	8,44 $\pm$ 0,57	9,31 $\pm$ 1,11	8,10 $\pm$ 0,15	10,47 $\pm$ 0,94
Axônios Mielinizados				
Área (μm^2)	4,09 $\pm$ 0,32	3,98 $\pm$ 0,36	3,53 $\pm$ 0,15	3,72 $\pm$ 0,12
Diâmetro mínimo (μm)	1,83 $\pm$ 0,06	1,85 $\pm$ 0,11	1,71 $\pm$ 0,05	1,72 $\pm$ 0,06

Valores expressos em média $\pm$ EPM. N=número de animais analisados. *indica $p < 0,05$ na comparação entre os segmentos proximal e distal do mesmo lado.

Ao comparar os resultados obtidos (Tabela 23 e 24), a análise estatística não evidenciou nenhuma diferença significativa entre os dados morfométricos das fibras mielínicas e seus respectivos axônios, para os segmentos proximal e distal de um mesmo lado bem como entre lados direito e esquerdo no mesmo nível.

4.3.2.4 Comparação de dados morfométricos dos Fascículos e Fibras Mielínicas entre Fêmeas e Machos de SHR.

As comparações entre as idades dos valores médios nas fêmeas e machos de SHR com 5, 20, 50 semanas de idade observamos diferença significativa entre os parâmetros estudados.

Analizamos os dados da morfometria dos fascículos dos nervos vagos em fêmeas, observamos diferença significativa na área fascicular ($p = 0,002$), diâmetro mínimo das fibras ($p = 0,002$), número de fibras mielínicas ($p = 0,004$) e densidade das fibras ($p = 0,003$). Na comparação entre idades os machos apresentaram diferença significativa nos parâmetros diâmetro mínimo das fibras ($p = < 0,001$), número de fibras ($p = 0,001$). Quando estudamos o lado esquerdo para os machos não observamos diferença significativa.

Comparando os dados da morfometria das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos vagos entre as fêmeas observamos diferença significativa entre os parâmetros diâmetro mínimo da fibra ($p = 0,003$), diâmetro mínimo do axônio ($p = 0,001$). Para os machos observamos diferença significativa para razão G ($p = 0,003$), área da bainha ($p = 0,001$), área do axônio ($p = 0,002$).

4.4 Comparação de dados morfométricos dos Fascículos e Fibras Mielínicas entre gêneros e linhagens.

Comparado os dados fasciculares e fibras mielínicas do nervo vago de WKY e SHR, não mostraram diferenças significativas em gêneros nos segmentos proximais e distais em ambos os lados, nem entre os segmentos de mesmo nível, entre lados.

Na análise estatística para dados fasciculares mostram diferença significativa no número de fibras ($p = 0,004$), densidade de fibras mielínicas ($p = 0,001$) entre as linhagens fêmeas WKY 20 semanas, sendo que os segmentos proximais geralmente são maiores que os distais, em ambos os sexos nas seguintes idades 5 e 50 semanas de WKY e SHR.

As comparações das fibras mielínicas e axônios mielinizados entre as linhagens demonstram diferença significativa nas fêmeas para os parâmetros área da fibra ($p = 0,002$), diâmetro mínimo da fibra ($p = 0,002$), área da bainha mielinizada ($p = 0,001$).

Entretanto, nos machos houve diferenças significativas para os parâmetros área da fibra ($p = 0,004$) no segmento proximal direito e $p = 0,002$ para o segmento proximal esquerdo, área da bainha mielinizada ($p = 0,001$ e $p = 0,002$ para segmento proximal direito e esquerdo respectivamente).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Ratos da linhagem SHR foram desenvolvidos dos ratos normotensos da linhagem WKY. As duas linhagens são utilizadas em pesquisas com alterações fisiopatológicas da hipertensão espontânea.

Os resultados do presente estudo fornecem informações sobre os dados ponderais, fisiológicos, morfológicos e morfométricos do nervo vago de WKY e SHR em três fases da vida.

5.1 Dados Ponderados e Fisiológicos

O peso corporal dos animais WKY de 5, 20 e 50 semanas mostraram significativamente maiores que dos animais SHR. Os WKY machos e fêmeas apresentam peso maior que o SHR de mesmo gênero. Esse resultado não apresentou diferença significativa entre machos e fêmeas, são compatíveis com achados em outras literaturas com a mesma linhagem e em outras (ALCANTARA et al., 2008; SANADA et al., 2012).

Estudos comparando WKY e SHR (adultos) comprovam que o peso corporal dos normotensos são significantemente maiores que dos hipertensos (LINDESAY et al., 2016). Em 2005 e 2008 Jeronimo e colaboradores verificaram que o peso de ratas Wistar aumentam com passar das idades. Todos esses resultados estão de acordo com os nossos resultados.

Nossos resultados mostram que FC e PAM com 20 e 50 semanas de vida apresentou valores semelhantes. Em relação as observações da frequência cardíaca, não houve diferença ente os animais WKY e SHR. Resultado semelhante encontrado em 2005 com Masineni que estudou FC em SHR machos e fêmeas com 54 a 58 semanas de idade.

Em relação a PAM grupo SHR (machos e fêmeas) foram maiores que os WKY. Autores Li (2016) e Nukada (2016) encontram a mesma semelhança, Isabelle (2016) relatou em seus achados que há diferença significativa da PAM entre WKY e SHR antes do aparecimento da hipertensão arterial. Estudo com ratos Sprague – Dawley, os machos apresentam PAM mais alto que as fêmeas (SAEZ et al., 2014).

O grupo SHR machos apresentam maiores níveis pressão arterial (PA) em relação as fêmeas de mesma idade. As reduções de PA podem estar relacionadas ao debito

cardíaco (volume de sangue bombeado para aorta a cada minuto) (GUYTON & HALL, 2017). Acredita que os hormônios femininos podem ter um papel de proteção nas fêmeas contra o desenvolvimento da hipertensão. A prevalência de doenças cardiovasculares é aumentada nos homens em comparação com as mulheres antes dos 55 anos de idade, mas com idade de 65 anos, isso é revertido, apresentando a possibilidade de que a perda de estrogênio na menopausa possa ser um fator contribuinte (THOM et al., 2006).

A linhagem SHR é comum apresentar remodelação cardíaca e hipertrofia ventricular esquerda seguida de insuficiência cardíaca (PAGAN et al., 2015).

Nosso estudo confirma que os SHR machos e fêmeas, possuem PAM mais elevada que WKY adulto de mesmo gênero. Bacakova e Kunes (2000) e Puzserova (2014) encontram os mesmos resultados.

5.2 Morfologia do Nervo Vago

As observações morfológicas das secções transversais dos segmentos proximais e distais dos nervos vagos em ratos SHR e WKY (machos e fêmeas) demonstraram que o nervo apresenta, um fascículo redondo, perineuro bem definido. Sem diferenças morfológicas entre nos segmentos proximais e distais, do lado direito e esquerdo. Semelhante em outros estudos (SANADA et al., 2011; SANADA et al. 2012). Schiavoni (2006) demonstrou as mesmas características morfológicas dos SHR.

No endoneuro, a citologia geral do nervo vago de WKY e SHR estudados não difere daquela de outros nervos periféricos e, de modo geral, pode ser comparável com observações morfológicas realizadas em nervos sensitivos (FAZAN et al., 1997; CAMPOS et al., 2008) e mistos (FAZAN et al., 2002).

Nervo vago apresenta grande número de fibras mielínicas de diversos diâmetros nos segmentos proximais e distais. Em sua maioria, a fibra de grosso calibre encontram-se dispersos no nervo, enquanto que os menores calibres estão concentrados na periferia. Essa característica também foi observada nos estudos de Alcântara (2008).

Notamos que esse nervo apresenta paragânglio, presente em segmentos distais. A importância deles em nervos SHR, pois são responsáveis pela função quimio-sensitiva, e detectar mudanças na tensão de oxigênio do sangue e podem estar envolvidos nos mecanismos fisiológicos regulatórios da laringe, sendo componentes importantes do sistema quimiorreceptor do pescoço (DA SILVA et al., 2016).

Diferenças na morfologia os nervos vagos entre machos e fêmeas, não foram observadas no presente estudo em todas as idades estudadas, entre gêneros nos segmentos proximais e distais, do lado direito e esquerdo. Compatível ao presente estudo, Alcântara et al.(2008).

5.3 Morfometria do Nervo Vago

A análise morfométrica é descrita como uma série de procedimentos que permitem uma descrição quantitativa da estrutura, particularmente revelando diferenças morfológicas mínimas entre a forma e a função. Além disso, foi amplamente utilizada nas investigações de modelos animais para doenças conhecidas por comprometer o sistema nervoso periférico, como diabetes, hipertensão e envelhecimento, com uma visão promissora para uma melhor compreensão das neuropatias humanas (NOVAS et al., 2016).

Os parâmetros morfométricos dos fascículos de ratos normotensos da linhagem WKY, fêmea e machos, mostram-se simétricos, tanto no sentido longitudinal, quanto no sentido lateral. Encontramos semelhanças e diferenças quando comparamos com dados na literatura (JERONIMO et al. 2008).

Os parâmetros morfométricos dos fascículos dos nervos vagos de ratos hipertensos da linhagem SHR, fêmea e machos, mostram-se simétricos, tanto no sentido longitudinal, quanto no sentido lateral. Compatível com o presente estudo, Alcântara et al.(2008), ao comparar o nervo vago de ratos SHR, fêmeas e machos, não observaram diferenças entre os gêneros.

Nossos dados morfométricos mostram que a área fascicular foi maior no segmento proximal, em ambos os lados. Estudos confirmam estes dados, área fascicular aumenta com a idade (RODRIGUES, 2008).

Os valores do diâmetro mínimo fascicular obtidos, mostra valores maiores que os animais com 50 semanas de idade, tanto nas fêmeas como os machos. Ao analisamos os gêneros, ausência diferença estatística significativa. Na literatura Da Silva (2016), encontrou resultados semelhantes porem em nervos laríngeos recorrentes.

Quando ao número de fibras dos nervos vagos apresentou-se com maior no segmento proximal para o distal, com 5, 20 e 50 semanas de idade. Quando comparados

os lados e gêneros houve ausência de diferenças significativas. No entanto, esse aumento também foi relatado em outros estudos com outros nervos (NUKADA et al., 2016; DA SILVA et al., 2016). Jeronimo et al., 2005 afirma que o aumento de fibras é constante em nervos normais, contudo, em ratos hipertensos os nervos chegam ao amadurecimento com 90 dias.

Parâmetro diâmetro mínimo, e o valor que “real” representa o tamanho de um nervo e de suas fibras e axônios, quando seccionados transversalmente. Isso porque, quando uma estrutura cilíndrica é cortada no sentido transversal, a medida do diâmetro mínimo não sofre variações (DA SILVA et al., 2016).

Densidade das fibras é um parâmetro morfométrico utilizado para descrever nervos normais e suas alterações em diferentes de lesões (LIMA et al., 2007). O número e densidade de fibras mielínicas foram menores nos SHR comparados aos WKY. Através de estudos feitos por Fazan (1999), podemos justificar esses dados, uma vez que os autores sugerem que diferença pode ser devido ao número e tamanho de fibras amielínicas que estão reduzidas nos SHR.

Em relação aos dados morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios do nervo vago em WKY e SHR, tanto nos valores médios dos diâmetros das fibras e dos axônios, verifica-se que não houve diferenças significativas entre segmentos, lados e gêneros. Verificou-se que houve um aumento dos parâmetros de área e diâmetro das fibras mielínica e da área da bainha de mielina nos animais mais velhos, tanto nos machos como as fêmeas. Outros autores demonstraram os mesmos achados Sanada 2012; Da Silva 2016).

A razão G é um parâmetro relacionado com a velocidade de condução do impulso nervoso. A maioria dos axônios mielínicos deve apresentar razão G entre 0,6-0,7. Valores acima de 0,7 indicam bainha de mielina fina, enquanto aqueles abaixo de 0,6 indicam bainha de mielina espessa. Neste estudo, todos os grupos apresentaram valor aproximados de 0,5. Esse resultado sugere que a maioria das fibras mielínicas dos nervos vagos encontram em condições de conduzir com velocidade máxima. Dado semelhantes ao obtido por Fazan et al. (1999) e Alcântara et al. (2008). Todo desvio da normalidade pode indicar tendências de desenvolvimento ou revelar processos patológicos. A determinação exata das proporções de bainha e axônio de mielina é especialmente essencial na interpretação de processos patológicos em nervos periféricos (BILEGO NETO; 2013).

Em relação a área e o diâmetro mínimo do axônio, verificou-se um aumento nos valores, indicando um crescimento progressivo do tamanho desses parâmetros, dos

animais mais jovens para os mais velhos. Esses achados estão de acordo com literatura (DA SILVA, 2016).

Nossos resultados mostram, que os animais grupos WKY e SHR apresentam simetria lateral, sem diferença morfológicas e morfométricos entre os mesmos níveis (proximal e distal) dos nervos vagos.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem as seguintes conclusões:

- 1- A morfologia e a morfometria geral dos segmentos proximais e distais, dos lados direito e esquerdo do nervo vago, de ratos da linhagem WKY, machos e fêmeas, não difere em todas as idades estudadas.
- 2- A morfologia e a morfometria geral dos segmentos proximais e distais, dos lados direito e esquerdo do nervo vago, de ratos da linhagem SHR, machos e fêmeas, não difere em todas as idades estudadas.
- 3- A hipertensão foi capaz de alterar a morfologia e a morfometria das fibras mielínicas dos nervos vagos de ratos SHR em comparação aos WKY.

Referências

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, A.C.; SALGADO H.C., FAZAN V.P.S. Morphology and morphometry of the vagus nerve in male and female spontaneously hypertensive rats. **Brain Res.** 2008; 170-180.

BACAKOVA L.; KUNE J. Gender differences in growth of vascular smooth muscle cells isolated from hypertensive and normotensive rats. **Clin Exp Hypertens.** 2002; 22:33–44.

BILEGO NETO A. P.; SILVEIRA F. B.; RODRIGUES DA SILVA G. A.; SANADA L. S.; FAZAN V. P. Reproducibility in nerve morphometry: comparison between methods and among observers. **Biomed Res Int.** 2013; 2013:682849.

BONAZ B.; SINNIGER V.; PELLISSIER S. Vagus nerve stimulation: a new promising therapeutic tool in inflammatory bowel disease. **J Intern Med.** 2017 Jul; 282(1): 46-63.

CAMPOS AS; SANADA LS; SATO KL; FAZAN VPS. Morphometry of saphenous nerve in Young rats. **J Neurosci Methods.** 2008; 168 (1):8-14.

CLARKE E.; BEARN J. G. The spiral nerve bands of Fontana. **Brain.** 1972; 95(1):1-20.

CROCKET A.; DOYLE D.; JOFFE S. N. Light microscopic identification of vagal nerve innervation of the rat stomach using methylene blue. **Br J Exp Pathol.** 1980 Apr;61(2):120-3.

COSENZA R. M. Fundamentos de Neuroatomia. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 1990, 138p.

DA SILVA A. P.; JORDAO C. E; FAZAN V. P. Peripheral nerve morphometry: Comparison between manual and semi-automated methods in the analysis of a small nerve. **J Neurosci Methods.** 2007 Jan 15; 159(1): 153-7.

DA SILVA G. A.; MENDES V. A.; GENARI A. B.; CASTANIA J. A.; SALGADO H. C.; FAZAN V. P. Recurrent laryngeal nerve alterations in developing spontaneously hypertensive rats. **Laryngoscope**. 2016 Jan; 126(1): E40-7.

DEANE B. M.; HOWE A.; MORGAN M. Abdominal vagal paraganglia: distribution and comparison with carotid body, in the rat. **Acta Anat (Basel)**. 1975; 93(1):19-28.

DICKHOUT J.G.; LEE R. M. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol**. 1998 Mar; 274(3 Pt 2): H794-800.

DO CARMO J. M.; JUNIOR R. F.; SALGADO H. C.; FAZAN V. P. Methods for exploring the morpho-functional relations of the aortic depressor nerve in experimental diabetes. **J Neurosci Methods**. 2011 Jan 30; 195(1): 30-5.

FARRAND A. Q.; HELKE K. L.; GREGORY R. A.; GOOZ M.; HINSON V. K.; BOGER H. A. Vagus nerve stimulation improves locomotion and neuronal populations in a model of Parkinson's disease. **Brain Stimul**. 2017 Nov - Dec;10(6):1045-1054.

FEDERATIVE COMMITTEE ON ANATOMICAL TERMINOLOGY. - Terminologia Anatomica. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1998.

FAZAN, V. P. et al. Ultrastructural morphology and morphometry of phrenic nerve in rats. **Anatomical Record**, v. 292, n. 4, p. 513-517, 2009.

FROHLICH E. D. Continued gains in hypertension. **Am J Cardiol**. 1981.

FROHLICH E. D. Is the spontaneously hypertensive rat a model for human hypertension? **J Hypertens Suppl**. 1986

FROHLICH E. D. Hypertension 1986. Evaluation and treatment--why and how. **Postgrad Med**. 1986 Nov 15;80(7):28-36, 41-6.

FAZAN, V. P. S. et al. Morphology of aortic depressor nerve myelinated fibers in normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 77, n. 2-3, p. 133-139, 1999.

FAZAN, V. P. S.; SALGADO, H. C.; BARREIRA, A. A. A descriptive and quantitative light and electron microscopy study of the aortic depressor nerve in normotensive rats. **Hypertension**. v. 30, n. 3 Pt 2, p. 693-698, 1997.

FAZAN, V. P.; SALGADO, H. C.; BARREIRA, A. A. Aortic depressor nerve unmyelinated fibers in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 4, H1560-H1564, 2001.

FAZAN, V. P.; SALGADO, H. C.; BARREIRA, A. A. Relation between myelin area and axon diameter in the aortic depressor nerve of spontaneously hypertensive rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 148, n. 2, p. 130-136, 2005.

FAZAN V. P.; MA X.; CHAPLEAU M. W.; BARREIRA A. A. Qualitative and quantitative morphology of renal nerves in C57BL/6J mice. **Anat Rec**. 2002. Dec 1;268(4):399-404.

GABELLA G.; PEASE H. L. Number of axons in the abdominal vagus of the rat. **Brain Res**. 1973 Aug 30;58(2):465-9.

GREENCE E. C. Anatomy of the rat. New York and London: Philadelphia, 1995.

GRUBER H. Motor innervation of the striated oesophagus muscle. Part 1. Intramural distribution of the right and left vagus nerve in the rat oesophagus as revealed by the glycogen depletion technique. **J Neurol Sci**. 1978 Mar;36(1):41-53.

GOIT, R. K.; ANSARI, A. H. Reduced parasympathetic tone in newly diagnosed essential hypertension. **Indian Heart Journal**, v. 68, n. 2, p. 153-157, 2016.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 13ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

ISABELLE M.; CHIMENTI S.; BEAUSSIER H.; GRANSAGNE D.; VILLENEUVE N.; SAFAR M. E.; DUCHATELLE V.; VILAINÉ J. P.; VAYSSETTES-COURCHAY C.; BEZIE Y. SBP, DBP, and pulse blood pressure variability are temporally associated with the increase in pulse wave velocity in a model of aortic stiffness. **J Hypertens**. 2016 Apr;34(4):666-75.

JARARI, N. et al. A review on prescribing patterns of antihypertensive drugs. **Clinical Hypertension**, v. 22, n. 7, p. 1-8, 2016.

JERONIMO A.; JERONIMO C. A.; RODRIGUES FILHO O. A.; SANADA L. S.; FAZAN V. P. Microscopic anatomy of the sural nerve in the postnatal developing rat: a longitudinal and lateral symmetry study. **J Anat**. 2005 Jan; 206(1): 93-9.

JERONIMO A.; JERONIMO C.A.; RODRIGUES FILHO O. A.; SANADA L. S.; FAZAN V. P. A morphometric study on the longitudinal and lateral symmetry of the sural nerve in mature and aging female rats. **Brain Res**. 2008 Jul 30; 1222:51-60.

KARIM M. A.; LEONG S. K. Neurons of origin of cervical vagus nerves in the rat and monkey. **Brain Res**. 1980 Mar 17; 186(1): 208-10.

KOVELL, L. C. et al. US hypertension management guidelines: a review of recent past and recommendations for the future. **Journal of American Heart Association**, v. 4, n. 12, p. e002315, 2015.

LEGROS G.; GRIFFITH C. A. The abdominal vagal system in rats. An anatomical study with emphasis upon the distribution of the gastric vagi to the stomach. **J Surg Res**. 1969 Mar; 9(3):183-6.

LI Y.; LIU J.; GAO D.; WEI J.; YUAN H.; NIU X.; ZHANG Q. Age-related changes in hypertensive brain damage in the hippocampi of spontaneously hypertensive rats. **Mol Med Rep**. 2016 Mar; 13(3): 2552-60.

LIMA N. T.; FAZAN V. P.; COLAFÊMINA J. F.; BARREIRA A. A. Recurrent laryngeal nerve post-natal development in rats. **J Neurosci Methods**. 2007 Sep 15;165(1):18-24. Epub 2007 May 21.

LINDESAY G.; RAGONNET C.; CHIMENTI S.; VILLENEUVE N.; VAYSSETTES-COURCHAY C. Age and hypertension strongly induce aortic stiffening in rats at basal and matched blood pressure levels. **Physiol Rep**. 2016 May; 4(10). pii: e12805.

MARCOVECCHIO, E. Dizionario etimologico storico dei termini medici. Firenze, Ed. Festina Lente, 1993.

MASINENI S. N.; CHANDER P. N.; SINGH G. D.; POWERS C. A.; STIER C. T. JR. Male gender and not the severity of hypertension is associated with end-organ damage in aged stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens**. 2005; 18(6): 878–884.

NOBLE L. J.; GONZALEZ I. J.; MERUVA V. B.; CALLAHAN K. A.; BELFORT B. D.; RAMANATHAN K. R.; MEYERS E.; KILGARD M. P.; RENNAKER R. L.; MCINTYRE C. K. Effects of vagus nerve stimulation on extinction of conditioned fear and post-traumatic stress disorder symptoms in rats. **Transl Psychiatry**. 2017 Aug 22;7(8):e1217.

NOVAS R. B.; FAZAN V. P.; FELIPE J. C. A New Method for Automated Identification and Morphometry of Myelinated Fibers Through Light Microscopy Image Analysis. **J Digit Imaging**. 2016; Feb; 29(1):63-72.

NUKADA H.; BABA M.; OGASAWARA S.; MCMORRAN D.; YAGIHASHI S. Neuropathy in the spontaneously hypertensive rat: An electrophysiological and histological study. **Muscle Nerve**. 2016; Oct; 54(4): 756-62.

OLIVEIRA F. S.; NESSLER R. A.; CASTANIA J. A.; SALGADO H. C.; FAZAN V. P. Ultrastructural and morphometric alterations in the aortic depressor nerve of rats due to long term experimental diabetes: effects of insulin treatment. **Brain Res**. 2013 Jan 23; 1491: 197-203.

OLIVEIRA A. L.; FAZAN V. P.; MARQUES W. JR.; BARREIRA A. A. Dorsal cutaneous branch of the ulnar nerve: a light and electron microscopy histometric study.

J Peripher Nerv Syst. 2011 Jun; 16(2): 98-101.

OKAMOTO K.; Tabei R.; FUKUSHIMA M.; NOSAKA S.; YAMORI Y. Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J.** 1966 Jun; 30(6):703-16.

OKAMOTO K.; NOSAKA S.; YAMORI Y.; MATSUMOTO M. Participation of neural factor in the pathogenesis of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. **Jpn Heart J.** 1967 Mar; 8(2): 168-80.

PAGAN L. U.; DAMATTO R. L.; CEZAR M. D.; LIMA A. R.; BONOMO C.; CAMPOS D. H.; GOMES M. J.; MARTINEZ P. F.; OLIVEIRA S. A. JR, GIMENES R.; ROSA C. M.; GUIZONI D. M.; MOUKBEL Y. C.; CICOGNA A. C.; OKOSHI M. P.; OKOSHI K. Long-term low intensity physical exercise attenuates heart failure development in aging spontaneously hypertensive rats. **Cell Physiol Biochem.** 2015; 36(1): 61-74.

PROVENZANO, S. Nomina Anatômica. Buenos Aires, Lib. El Ateneo Editorial, 1951, p.199.

RODRIGUES A. R.; FERREIRA R. S.; SALGADO H. C.; FAZAN V. P. Morphometric analysis of the phrenic nerve in male and female Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). **Braz J Med Biol Res.** 2011 Jun;44(6):583-91.

RIJKERS K.; MAJOIE H. J.; AALBERS M. W.; PHILIPPENS M.; DOENNI V. M.; VLES J. S.; STEINBUSCH H. M.; MOERS-HORNIKX V. M.; HOPKINS D. A.; HOOGLAND G. Rat vagus nerve stimulation model of seizure suppression: nNOS and Δ Fos B changes in the brainstem. **J Chem Neuroanat.** 2012 Dec; 46(1-2): 1-9.

HOYES A. D.; BARBER P. Morphology and response to vagus nerve section of the intra-epithelial axons of the rat trachea. A quantitative ultrastructural study. **J Anat.** 1981 May;132(Pt 3):331-9.

RECKELHOFF J. F. Gender differences in the regulation of blood pressure. **Hypertension**. 2001 May; 37(5): 1199-208.

SABBATINI M.; VEGA J. A.; AMENTA F. Peripheral nerve vascular changes in spontaneously hypertensive rats. **Neurosci Lett**. 1996 Oct 18; 217(2-3): 85-8.

SAEZ F.; REVERTE V.; PALIEGE A.; MORENO J. M.; LLINÁS M.T.; BACHMANN S.; SALAZAR F.J. Sex-dependent hypertension and renal changes in aged rats with altered renal development. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2014 Aug 15;307(4):F461-70.

SANADA L. S.; DA ROCHA KALIL A. L.; TAVARES M. R.; NEUBERN M. C.; SALGADO H. C.; FAZAN V. P. Sural nerve involvement in experimental hypertension: morphology and morphometry in male and female normotensive Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). **BMC Neurosci**. 2012 Mar 2; 13:24. Epub 2012 Mar 2.

SINGH R. B.; SUH I. L.; SINGH V. P.; CHAITHIRAPHAN S.; LAOTHAVORN P.; SY R.G.; BABILONIA N.A.; RAHMAN A. R.; SHEIKH S.; TOMLINSON B.; SARRAF-ZADIGAN N. Hypertension and stroke in Asia: prevalence, control and strategies in developing countries for prevention. **J Hum Hypertens**. 2000 Oct-Nov; 14(10-11): 749-63.

SMITH, S. et al. Neural modulation for hypertension and heart failure. **International Journal of Cardiology**. v. 214, p. 320-330, 2016.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Arq Bras. Cardiol.2006. 1-48.

SCHNEIDER C. A.; RASBAND W. S.; ELICEIRI K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods**. 2012 Jul; 9(7): 671-5.

PAULIS. L.; UNGER T. Novel therapeutic targets for hypertension. **Nature Reviews Cardiology**. v. 7, n. 8, p. 431-441, 2010.

THE ACCORD STUDY GROUP. Effects of intensive blood pressure control in type 2 diabetes. **The New England Journal of Medicine**. v. 362, n. 17, p. 1575-1585, 2010.

TRIPPODO N.C.; FROHLICH E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circ Res**. 1981 Mar; 48(3): 309-19.

THOM T.; HAASE N.; ROSAMOND W.; HOWARD V. J.; RUMSFELD J.; MANOLIO T.; ZHENG Z. J.; FLEGAL K.; O'DONNELL C.; KITTNER S.; LLOYD-JONES D.; GOFF D. C. JR.; HONG Y.; ADAMS R.; FRIDAY G.; FURIE K.; GORELICK P.; KISSELA B.; MARLER J.; MEIGS J.; ROGER V.; SIDNEY S.; SORLIE P.; STEINBERGER J.; WASSERTHIEL-SMOLLER S.; WILSON M.; WOLF P. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics–2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**. 2006; 113:e85–e151.

TOMASSONI D.; TRAINI E.; VITAIOLI L.; AMENTA F. Morphological and conduction changes in the sciatic nerve of spontaneously hypertensive rats. **Neurosci Lett**. 2004 May 20; 362(2):131-5.

WARWICK R.; WILLIAMS P. L. Gray anatomy. Tomo II .35^a ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, c.7, 1979.

WIDIMSKÝ, J. The role of arterial hypertension in the primary prevention of stroke. **Cor et Vasa**. v. 58, n. 2, p. e279-e286, 2015.

YAMORI Y. Implication of hypertensive rat models for primordial nutritional prevention of cardiovascular diseases. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 1999 Jul; 26(7): 568-72.

ZICHA J.; KUNES J. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. **Physiol Rev**. 1999 Oct; 79(4): 1227-82.

8. ANEXOS

COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO

Ração: NUVILAB CR1 - NUVITAL®

Composição básica do produto: Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato de bicálcio, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácido.

NÍVEIS DE GARANTIA

Umidade (máx).....	12,50%
Proteína Bruta (min).....	22,00%
Extrato Etérico (min).....	4,00%
Material Mineral (máx).....	10,00%
Matéria Fibros (máx).....	8,00%
Cálcio (máx).....	1,40%
Fósforo (min).....	0,80%

Suplemento por quilo não menos que:

Vitaminas: Vitamina A – 12000 UI; Vitamina D3 – 1800 UI; Vitamina E – 30,00 mg;

Vitamina B2 – 6,00 mg; Vitamina K3 – 3,00 mg; Vitamina B1 – 5,00 mg; Vitamina B6 – 7,00 mg; Vitamina B12 – 20,00 mg; Ácido Pantotênico – 20,00 mg; Ácido fólico – 1,00 mg; Biotina – 0,05 mg; Colina – 600,00 mg.

Microelementos Minerais: Ferro – 50,00mg; Zinco – 60,00mg; Cobre – 10,00 mg; Iodo – 2,00 mg; Manganês – 60,00 mg; Selênio – 0,05 mg; Cobalto – 1,50 mg.

Aminoácidos: DL – Metionina – 300,00 mg; Lisina – 100,00 mg.

Aditivos: Antioxidante – 100,00 mg.

Comitê de ética em pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação n° 094/2006, sobre o projeto intitulado, "*Anatomia microscópica do nervo vago de ratos espontaneamente hipertensos, adultos jovens: comparação entre machos e fêmeas*", sob a responsabilidade da **Professora Doutora Valéria Paula Sassoli Fazan**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de 25 de setembro de 2006.

(We certify that the protocol n° 094/2006, about "*Microscopic anatomy of the vagus nerve in young adult spontaneously hypertensive rats: comparison between males and females*", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 09/25/2006 meeting).

Ribeirão Preto, 26 de setembro de 2006.

Prof. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES
Presidente da Comissão de Ética
em Experimentação Animal