KARINA DO VALLE MARQUES

Características estruturais e estereológicas do plexo cardíaco de camundongos expostos à poluição ambiental

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

Programa de:
Fisiopatologia Experimental

Orientador:
Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

reprodução autorizada pelo autor

Marques, Karina do Valle

Características estruturais e estereológicas do plexo cardíaco de camundongos expostos à poluição ambiental / Karina do Valle Marques. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Edson Aparecido Liberti.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Plexo cardíaco 3.Exposição ambiental 4.Neurônios 5.Gânglios

USP/FM/DBD-136/12

Recebo
Em
22/10/10

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Carta datada de 05/08/09

Ao

Departamento de Fisiopatologia Experimental

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07.10.09, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **0063/09** "**CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS, ULTRA-ESTRUTURAIS E MORFOMÉTRICAS DO PLEXO SUBEPICÁRDICO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS A EXAUSTÃO DO DIESEL**", será **tese de doutorado** da aluna **KARINA DO VALLE MARQUES** tendo como orientador **Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti,** bem como do Relatório de andamento.

Encaminhe-se à CPG-FMUSP
para as devidas providências.
S.P., 23/10/09

Prof. Dra. Elia Garcia Caldini
Programa Fisiopatologia Experimental
Pós-Graduação em Ciências
Coordenadora

CAPPesq, 07 de outubro de 2009.

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5° andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

"A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós."

Marcel Proust

DEDICATÓRIA

“Ao Mestre com Carinho” Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, por aceitar ser meu orientador nesta tese, pela confiança e paciência, pelos seus ensinamentos como anatomista e como pessoa que é, tendo sempre algo a nos ensinar sobre a vida.

To Sir, With Love

Those school girl days
Of telling tales
And biting nails are gone
But in my mind
I know they will still live on and on

But how do you thank someone
Who has taken you from crayons to perfume

It isn't easy, but I'll try

If you wanted the sky I'd write across the sky in letters
That would soar a thousand feet high
To Sir, with love

The time has come
For closing books
And long last looks must end

And as I leave
I know that I am leaving my best friend

A friend who taught me right from wrong
And weak from strong
That's hard to learn

What, what can I give you in return?

If you wanted the moon I'd try to make a star
But I would rather you let me give my heart
To Sir, with love

DEDICATÓRIA

À Mariana Matera Veras, que depositou em mim toda a credibilidade, confiando e me apoiando em todas minhas ações, pelos ensinamentos de estereologia e da vida, amiga, companheira de lutas e vitórias, que sempre comemora comigo minhas conquistas como sendo suas.

Quero ser o teu amigo.
Nem demais e nem de menos.
Nem tão longe e nem tão perto.
Na medida mais precisa que eu puder.
Mas amar-te sem medida e ficar na tua vida,
Da maneira mais discreta que eu souber.
Sem tirar-te a liberdade, sem jamais te sufocar.
Sem forçar tua vontade.
Sem falar, quando for hora de calar.
E sem calar, quando for hora de falar.
Nem ausente, nem presente por demais.
Simplesmente, calmamente, ser-te paz.
É bonito ser amigo, mas confesso é tão difícil aprender!
E por isso eu te suplico paciência.
Vou encher este teu rosto de lembranças,
Dá-me tempo, de acertar nossas distâncias.

Fernando Pessoa

Agradecimentos

À Deus, por estar sempre presente, protegendo e guiando-me pelos difíceis caminhos da vida.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e à coordenadora do programa de Fisiopatologia Experimental Professora Dra. Elia Garcia Caldini, por me aceitar no programa possibiliantando meu desenvolvimento profissional e pelo apoio no laboratório.

Ao Prof Dr. Paulo Saldiva, mais conhecido como Pepino, agradeço pelos ensinamentos, oportunidade e confiança em meu trabalho; por sua bondade e sabedoria.

A banca de qualificação, Dra. Silvia Lachini, Dra. Laura Beatriz Maifrino, Dra. Naiane Kelly Clebi, pelas recomendações e sugestões feitas na qualificação.

As secretárias do Programa de Fisiopatologia Experimental em especial à Tania Regina de Souza, pela atenção e informações de documentos fornecidos.

A todos os meus professores (de anatomia), em especial à Profa. Irvênia Luiza de Santis Prada, o Prof. Zenon Silva e o Prof. Wilson Felipe Pereira, agradeço por me educarem e fornecerem a base de conhecimento sobre a qual "ergo" hoje esta tese de doutorado.

Ao curso de Medicina da Universidade Federal do Tocantins pelo apoio para execução dessa tese, em especial aos professores: Prof. Itágores Hoffman I Lopes Sousa Coutinho, Prof. Leandro Garcia Guimarães e o Prof. Sérgio Aragaki.

Agradeço aos meus familiares, que, nos últimos anos, foram privados de um convívio qualitativamente melhor, em razão da dedicação exigida na realização deste trabalho. A minha mãe Nivalda do Valle Marques, as minhas irmãs Andréa do Valle Marques e Fernanda do Valle Lourenço, o meu irmão Eduardo Henrique do Valle e ao meu companheiro Walison Justiniano Pinto por, mesmo nos momentos mais difíceis, terem me reconfortado com suas palavras de carinho, afeto e dedicação.

À Ione Matera Veras, exemplo de pessoa, presente principalmente nos momentos finais dessa tese, pelos momentos de felicidade e tristeza; pela sua enorme compreensão e auxílio na realização dessa tese.

Ao José Guilherme Veras Closs pela amizade, apoio e companherismo e à Froni *obrigada pelos latidos, pelos abraços e pelas patadas e brincadeiras.*

À amiga Natália de Souza Xavier Costa pela ajuda nas correções ortográficas que passaram inócuas nos momentos de maior cansaço, pela paciência na correção do inglês.

Às amigas Maria De Fatima Stangueti e Maria Angélica Perez pelo apoio e incentivo de sempre.

Também, neste longo caminho que trilhei desde 2003 no antigo VQM e hoje LAFACC, a muitas pessoas que conviveram no laboratório devo agradecimentos, espalhadas por diversas regiões do Brasil e do mundo. Entretanto, peço licença a todas elas, para desta vez utilizar esse espaço para dizer apenas obrigado a **Profa. Silvia de Campos Boldrini** (*in memoriam)***.**

Foi ela a maior incentivadora para que eu continuasse durante esses longos anos no laboratório. Ela, que sempre me recebia com um caloroso abraço e um lindo sorriso, com palavras sempre amigas e de ânimo. Infelizmente, não tenho mais esses abraços nos retornos a São Paulo. Você nos deixou de forma prematura e repentina. Nunca pensei que você não estaria aqui no final dessa minha jornada.

Queria poder compartilhar com você esse momento. Foi da forma mais difícil que aprendi, que a vida muda completamente em segundo e que o vazio que fica é impossível de ser preenchido. Não tem como explicar esse vazio de saudade.

A saudade que o tempo não apaga, não cala, não faz desaparecer… a saudade que o tempo apenas não torna menos amarga. Passa o tempo… passa a mágoa… atenua-se a dor… mas jamais se apaga a saudade. Saudade essa que não se explica apenas se sente.

Restam-me apenas as lembranças, de levar adiante os valores que você me ensinou.

Obrigada pelo ser humano maravilhoso que sempre foi um exemplo de amor, bondade e respeito ao próximo, que sempre carregarei comigo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

“A sabedoria é a meta da alma humana; mas a pessoa, à medida que em seus conhecimentos avança, vê o horizonte do desconhecido cada vez mais longe”.

Heráclito

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha,Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas.

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO 23

2 OBJETIVOS 26

3 REVISÃO DA LITERATURA 28

3.1 Poluição do ar e Sistema nervoso autônomo cardíaco 28

3.2 Sistema nervoso intrínseco cardíaco (SNIC) 29

3.3 Aspectos morfoquantitativos dos gânglios subepicárdicos 30

3.4 Classificação morfológica de neurônios do plexo cardíaco 37

3.5 Alterações morfológicas do plexo cardíaco 38

4 MÉTODOS 42

4.1 Animais - Grupos experimentais 42

4.2 Exposição 44

4.3 Caracterização da Exposição 45

4.3.1 Concentração ambiental 45

4.3.2 Dose de exposição dos animais 46

4.4 Obtenção e amostragem dos corações 46

4.5 Mapeamento topográfico da inervação do plexo cardíaco 47

4.6 Avaliação estereológica e morfométrica do coração e do plexo cardíaco 49

4.6.1 Amostragem 49

4.7 Colorações empregadas 50

4.8.1 Volume total do coração e dos átrios (VAT) 52

4.8.2 Volume Total de gânglios (VT_G) 54

4.8.3 Número Total de Gânglios (NT_G) 54

4.8.4 Volume Médio dos Gânglios (VM_G) do plexo cardíaco 55

4.8.5 Volume Médio dos Neurônios (VM_N) ganglionares 55

4.8.6 Numero Total de Neurônios (N_{NEU}) 56
4.8.7 Área Seccional, Perímetro e Diâmetro de Feret dos Neurônios do plexo cardíaco... 57
4.9 Avaliação qualitativa das fibras dos sistemas colágeno elástico nos gânglios..... 58
4.10 Análise Estatística..... 58
4.11 Reconstrução tridimensional do coração e dos gânglios cardíacos..... 59
4.11.1 A Escolha do Software..... 59
4.11.2 Modelagem 3D..... 60
4.11.3 A Interface de trabalho do *Blender*..... 60
4.11.4 Aquisição de Imagens..... 60
5 RESULTADOS..... 65
5.1 Níveis de Poluição 65
5.2 Aspectos Morfológicos e Inervação do coração de camundongos..... 66
5.2.1 Localizações topográfica dos gânglios do plexo cardíaco 69
5.3 Tecido conjuntivo associado ao plexo cardíaco 75
5.4 Aspectos Quantitativos 79
5.4.1 Peso corporal dos animais e peso do coração 79
5.4.2 Volume total do coração e dos átrios 80
5.4.3 Volume ganglionar e número de gânglios no plexo cardíaco..... 81
5.5 Morfometria..... 86
6 DISCUSSÃO..... 89
7 CONCLUSÕES 99
8 REFERÊNCIAS 101

LISTA DE ABREVIATURAS

PS - plexo subepicárdico

SNIC - Sistema nervoso intrínseco cardíaco

NIC - neurônios intrínsecos cardíacos

G1 – primeira geração

G2 – segunda geração

G3 - terceira geração

F – ar filtrado, ou limpo

NF - ar poluído

F-F – animal exposto ao ar Filtrado e mantido em ar filtrado

NF-F - animal exposto ao ar não filtrado e mantido em ar filtrado

F-NF – animal exposto ao ar filtrado e mantido em ar não filtrado

NF-NF: animal exposto ao ar não filtrado e mantido em ar não filtrado

V_{AT} - Volume Absoluto dos Átrios

VT_{GANG} - Volume Total de gânglios

NT_{GANG} - Número Total de Ganglios

VM_{GANG} - Volume Médio dos Gânglios

VM_{N} - Volume Médio dos Neurônios

N_{NEU} - Numero Total de Neurônios

FMax - Féret Máximo (comprimento)

FMin - Féret mínimo (largura)

CC - corpo celular

N - núcleo do neurônio

CV - coeficiente de variação

2D - bidimensional

3D - tridimensional

Na - Sódio

K- Potássio

Ca - Cálcio

Al - Alumínio

Cu - Cobre

Fe - Ferro

Ni - Níquel

P - Fósforo

Pb - Chumbo

S - Enxofre

Si - Silício

Ti - Titânio

V - Vanádio

Zn – Zinco

C - Carbono

AchE- acetilcolinesterase

iso-OMPA - tetra-isopropil pirofosfaramida

NADH - β-nicotinamida adenina dinucleotideo

Lista de tabelas

Tabela 1 – Análise descritiva da composição elementar presente nas amostras de $PM_{2,5}$ através da Fluorescencia dispersiva de raio X. O carbono (C) foi utilizado como parâmetro para cálculo da composição elementar relativa dos demais elementos. 65

Tabela 2 – Resultados da Média e Desvio padrão (DP) do valor referente aos parâmetros peso corporal (g), peso do coração (g) e a razão entre ambos nos grupos F-F. F-NF, NF-F e NF-NF..... 79

Tabela 3 – Resultados da Média e Desvio padrão (DP) do valor referente aos parâmetros volume do átrio direito (VAD), Volume do átrio esquerdo (VAE), Volume absoluto dos átrios (VAT) e Volume total do coração (cm³) e a razão entre ambos nos grupos F-F. F-NF, NF-F e NF-NF..... 80

Tabela 4 – Médias e desvios padrões das variáveis estereológicas referentes ao volume total de gânglios (VT_G um³), número total de gânglios (NT_G), Volume médio de gânglios (VM_G (um³)) e a razão entre volume ganglionar e volume cardíaco nos grupos F-F, F-NF, NF-F e NF-N..... 81

Tabela 5 - Médias e s padrões das variáveis estereológicas para o Número Total de Neurônios (N_{NEU}) e Volume Médio dos Neurônios (VM_N) μm^3 do plexo cardíaco reativos a Giemsa e para o Volume médio dos neurôrios reativos a NADH ($VM_{N\ NADH\ +}$ (um³)). 84

Tabela 6 - Médias e desvios padrões relacionado as análises morfológicas da Área Seccional (um²) e Perímetro (um) do neurônio para os grupos F-F, F-NF, NF-F e NF-NF. 87

Lista de figuras

Figura 1-Representação esquemática do protocolo de criação e exposição dos animais experimentais. As setas azul e vermelha indicam que os camundongos da terceira geração (G3) passaram por exposições diferenciadas durante o período de desenvolvimento embrionário/fetal e pós-natal. 44

Figura 2- Representação esquemática das câmaras de exposição, mostrando os filtros externos na câmara filtrada e o sentido de circulação do ar em ambas as câmaras filtrada e não filtrada. 45

Figura 3 - (a) Representação esquemática da orientação do coração para inclusão em parafina e realização dos cortes seriados; em (b) representação dos cortes selecionados para análise corados com técnica de Giemsa. 50

Figura 4 - Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos (ferramente GRID) e contagem do número de pontos (ferramenta CELL COUNTER) utilizando o programa de análise de imanges Image J para avaliação dos volumes das regiões atriais. 53

Figura 5 – Esquema ilustrativo para localização dos gânglios cardíacos no átrio de camundongos. Os números representam a quantidade de núcleos encontrados em cada corte seriado. O esquema representa a contagem de 5 (cinco) gânglios. 55

Figura 6 – Desenho esquemático para demonstração do diâmetro de Feret máximo (FMax) e odiâmetro de Feret mínimo (FMin), CC (corpo celular), N (núcleo do neurônio). 57

Figura 7 – Em (A) Modelo da primitiva inicial, sobre a imagem de referência utilizando a ferramenta extrusão; Em (B) Modelagem a ferramenta de extrusão, esfera para iniciar modelagem ventricular, e aplicação de textura sobre a veia cava superior esquerda, vista posterior. 62

Figura 8 – Em **(A)** Representação da interface do Programa plexo cardíaco 3D com os menus e em posição topográfica no camundongo; Em **(B)** Representação da interface do Programa Plexo Cardíaco com o coração e vasos da base e os menus, do programa; Em **(C)** Vista ventral do coração com a presença de tecido adiposo e gânglios nos vasos da base; Em **(D)** Vista Dorsal do coração de camundongo com a presença de gânglios cardíacos imersos no tecido adiposo nas proximidades dos grandes vasos da base; Em **(E)** Vista superior do átrio de camundongo com o tecido adiposo removido indicando a disposição

dos gânglios cardíacos; Em **(F)** Vista látero-lateral evidenciando a disposição do plexo cardíaco no átrio, os ventrículos foram removidos. 63

Figura 9-Fotografia do tórax de camundongo vista ventral com representação da inervação parassimpática do coração proveniente do nervo vago. A seta vermelha representa a inervação simpática proveniente da cadeia simpática a partir do gânglio cervical médio. Os números se referem a: 1) artéria carótida comum direita; 2) Nervo vago direito e esquerdo; 3) veia subclávia direita; 4) aurícula direita e aurícula esquerda..... 66

Figura 10 - **(A)** Vista ventral do coração de camundongo injetado com Látex "Neoprene" 450, para dissecação dos vasos da base. Os vasos em Vermelho evidenciam as artérias e, em azul as veias. Vista ventral do coração **(B)** e vista dorsal do coração **(C)** de camundongo injetado com Látex "Neoprene" 450. As fotografias realçam os vasos da base envoltos pela gordura epicárdica demonstrada pelas setas nas cores vermelhas. O círculo vermelho representa a localização das veias pulmonares. Nas fotografias verifica-se a artéria aorta (a.aorta), a veia cava cranial direita (VCCD), veia cava cranial esquerda (VCCE), veia cava caudal (VC), seio coronariano (SC) e o átrio direito (AD) e o átrio esquerdo (AE)..... 67

Figura 11 - A) Fotografia da vista lateral-posterior esquerda do coração de camundongo, em relação com a coluna vertebral, corado pela reação de AChE; a seta azul indica o componente simpático da inervação do coração proveniente da cadeia simpática; a seta preta mostra a inervação proveniente do nervo vago esquerdo passando abaixo do arco da aorta incluso no tecido adiposo (seta preta). B) O desenho esquemático representa a disposição dos gânglios simpáticos cervical superior (GCS), cervical médico (GCM) e gânglio estrelado (GE), o desenho esquemático é uma adaptação do artigo de TANAKA et al. (2007) para o *Suncus murinus*. 68

Figura 12 – Fotografias de Mapeamento do plexo cardíaco de camundongo corado com a técnica de acetilcolinesterase. A) Vista ventral do coração de camundongo, as setas azuis representam os átrios direito (AD) e o esquerdo (AE) (5x lupa). B) foto ampliada do coração em A, seta preta indica o ramo do nervo vago passando pelo tecido adiposo (seta verde (20x lupa)). C) - Fotografia do plexo cardíaco em vista dorsal corado por AChE, veias pulmonares (VP), aurícula esquerda (AE), veia cava cranial direita (VCCD), veia cava caudal (VCC) e artéria aorta (a.aort) (10x lupa). Os ramos neurais superficiais do plexo cardíaco são demonstrados por setas na superfície do átrio. 69

Figura 13 – Cortes transversais das regiões atriais do coração de camundongos do grupo da câmara de ar filtrado, corados pela técnica de Giemsa com aumento de 2,5x. Os cortes representa o procedimento estereológico utilizado para contagem dos gânglios cardíacos a fim de evitar a repetição de um mesmo gânglio, esse esquema também foi utilizado para mapeamento topográfico dos gânglios cardíacos entre os vasos da base. 70

Figura 14 - Demonstração topográfica dos cortes transversais de gânglios cardíaco de camundongo do grupo limpo localizado no átrio na região dos vasos da base corados com a técnica de Giemsa. **A)** representa a contagem do primeiro gânglio identificado (1)disposto no espaço entre os óstios da artéria aorta (a.Aort), veia cava superior direita (VCSD) e a artéria tronco pulmonar (a.TP) em aumento de 100x. **B)** Mesmo animal porem o número 4 representa o quarto gânglio localizado entre artéria aorta (a. Aort) e a artéria tronco pulmonar (a.TP), aumento de 100x. O tecido adiposo unilocular (U) e multilocular (M) é visível. 71

Figura 15 - Demonstração topográfica dos cortes transversais de gânglios cardíacos de animal limpo localizados no átrio dos vasos da base corados com NADH. A) Gânglio 1 disposto no espaço entre a bifurcação da artéria tronco pulmonar, aumento de 200x. D) Localização do quarto gânglio situado posterior ao átrio esquerdo (AE) aumento de 200x. Siglas: artéria tronco pulmonar (a.TP), átrio esquerdo (AE) e átrio direito (AD). 72

Figura 16 – Cortes de gânglios cardíacos de camundongos fêmeas dos grupos F-F (A), F-NF (B), NF-F (C), NF-NF (D), corados pela técnica de Giemsa. Notar o tecido adiposo unilocular (U) e cápsula de tecido conjuntivo (setas pretas). (Barra de calibração: 25µm). 73
Figura 17- Cortes de gânglios cardíacos de camundongos fêmeas dos grupos F-F (A), F-NF (B), NF-F (C), NF-NF (D), corados pela técnica de NADH. Notar o tecido adiposo unilocular (U) e cápsula de tecido conjuntivo (setas pretas). (Barra de calibração: 20µm). 74

Figura 18 – Corte transversal de gânglio cardíaco dos grupos FF (A), F-NF (B), NF-F (C) e NF-NF (D). Notar, a presença de fibras elásticas (setas) tanto na cápsula como no interior dos gânglios, envolvendo os neurônios. (Resorcina-fucsina.. Barra de calibração: 20µm). 76

Figura 19 – Cortes transversais de gânglios cardíacos corados com Picrosirius, A- Visualização sem luz polarizada, onde se observa a presença de fibras colágenas formando uma cápsula delgada, no interior do gânglio, envolvendo os neurônios (setas). B- O mesmo gânglio, analisado sob luz polarizada, com fibras colágenas dos tipos I.(amarelo, laranja e vermelho) e III (verde) distribuídas ao redor e no interior do mesmo (setas). C- Gânglio de animal do grupo FF, onde é nítida a presença de fibras colágenas do tipo I na cápsula ganglionar e no interior do gânglio, envolvendo os neurônios (setas). (Barra de calibração: 50µm). 77

Figura 20 – Fotomicrografias de corte transversal de gânglio cardíaco (g) dos grupos FF (A); F-NF (B); NF-F (C) e NF-NF (D). Em linhas gerais, todos os grupos exibem uma distribuição equitativa de fibras colágenas dos tipos I e III ao redor dos gânglios, bem como na constituição da cápsula ganglionar. A principal diferença é notada no interior dos gânglios onde, em um extremo (grupo FF) predominam as fibras do tipo I e no outro (grupo NF-NF) há o nítido predomínio das fibras do tipo III. (Picrosirius sob luz polarizada. (Barra de calibração: 50µm). 78

Figura 21 – Gráfico da estimativa da média marginal do número total de gânglios referente à interação entre exposição pós-natal e exposição gestacional nos grupos F-F, F-NF, NF-F e NF-NF. Observa-se a relação das variáveis da Exposição gestacional e exposição pós-gestacional. 82

Figura 22 - Gráfico da estimativa da média marginal da relação do volume médio de gânglios referente à interação entre a exposição gestacional e a pós-gestancional, nos grupos filtrado e não filtrado. 83

Figura 23 - Gráfico da estimativa da média marginal da relação do volume total de gânglios referente à interação entre a exposição gestacional e pós-gestacional, nos grupos filtrado e não filtrado. 83

Figura 24 - Gráfico da estimativa da média marginal da razão do volume dos gânglios e o volume do coração, referente à interação entre a exposição gestacional e pós-gestacional, nos grupos nos grupos filtrado e não filtrado. 84

Figura 25 - Gráfico *Boxplot* referente às médias de análises estereológicas do volume médio dos neurônios cardíacos corados com Giemsa. 85

Figura 26 - Gráfico da estimativa marginal da média em relação ao volume médio dos neurônios corados com Giemsa. Verifica-se que a interação significativa entre as variáveis foi de $p<0,05$, a maior interação significativa ocorre na exposição gestacional. 86

RESUMO

MARQUES, K.V. Características estruturais e estereológicas do plexo cardíaco de camundongos expostos à poluição ambiental [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Os objetivos do presente trabalho foram determinar a morfologia do plexo cardíaco e verificar se o coração de camundongos é alterado pela exposição à poluição atmosférica em relação ao peso, ao número de neurônios e gânglios. Camundongos foram mantidos em câmaras situadas próximas a vias de trafego intenso em São Paulo. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=5) segundo a exposição à poluição atmosférica no período gestacional e/ou pós natal: ar filtrado (F-F), ar não filtrado (NF-NF), ar filtrado e ar não filtrado (F-NF) e ar não filtrado e ar filtrado (NF-F). Ao atingirem 120 dias de vida, os animais foram eutanasiados e seus corações removidos. O número de neurônios cardíacos assim como seu volume, volume do gânglio, área do neurônio, perímetro e o diâmetro de Feret máximo (FMax) e mínimo (FMin) foram estimados por meio de avaliações morfométricas e estereológicas. Os neurônios e gânglios cardíacos foram corados pelo método de Giemsa. As fibras colágenas foram identificadas pelo método de Picro-sirius sob luz polarizada. Verificou-se que as fibras colágenas tipo III são predominantes na cápsula do gânglio nos grupos NF-F e NF-NF. O peso corpóreo foi significativamente menor nos animais que foram expostos no período pós natal (F-NF, NF-NF) quando comparados aos grupos F-F e NF-F. A média do perímetro neuronal foi maior no grupo F-F que nos grupos expostos no período gestacional e pós natal (F-NF, NF-F e NF-NF). O FMax foi estatisticamente diferente entre o grupos expostos no período pós natal (F-NF e NF-NF) ($p<0,05$). Houve uma redução significativa no volume dos neurônios nos grupos F-NF e NF-NF. Os resultados permitem especular que a mudanças no controle autonômico do coração resultante da exposição à poluição atmosférica, pode ser relacionado a alterações no desenvolvimento do plexo cardíaco.

Descritores: Poluição do ar, Plexo cardíaco, Exposição ambiental, neurônios, gânglios.

ABSTRACT

MARQUES, K.V. Stereological and Structural characteristics of the cardiac plexus in mice exposed to environmental air pollution [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

The aims of the present study were to determine the cardiac plexus morphology and to test whether or not the heart of the mice alters in weight, neuronal and ganglia number with air pollution exposure. Mice were maintained in exposure chambers situated close to a busy crossroads in São Paulo. Animals were grouped in to four groups (n=5) according to prenatal and/or postnatal exposure to air pollution: filtered air (F-F); non-filtered air (NF-NF); filtered and non-filtered air (F-NF); non-filtered and filtered air (NF-F). Reaching 120 days of life, the animals were euthanized for obtaining their hearts. The number of cardiac neurons as well as their volume, ganglion volume, neuron sectional area, perimeter and maximum (FMax) and minimum (FMin) Ferret's diameter were estimated under the stereological and morphometric aspects. The cardiac neurons and ganglia were stained employing the Giemsa method. Collagen fibers were identified by Picro-sirius under polarized light. Type III collagen fibers predominate in the ganglion capsule of the NF-F and NF-NF groups. Body weight was significantly reduced in those animals exposed to air pollution postnatally (F-NF, NF-NF) when compared to groups F-F and NF-F. The average of the neuronal perimeter was larger in F-F group than in those groups with gestational and postnatal exposure (F-NF, NF-F and NF-NF). The volume, volume do gânglio, área do neurônio, perímetro e o diâmetro de Feret máximo FMax was statistically different among the groups exposed to air pollution postnatally (F-NF and NF-NF) ($p<0.05$). A decrease in the total neuronal volume was significantly detected in F-NF and NF-F groups. The mean neuron volume was significant in the F-NF and NF-NF. Our results, allow us to speculate that changes in autonomic control of heart resulting from exposure to air pollution may be linked to alterations in the development of the cardiac plexus.

Descriptors: Air pollution; cardiac plexus, environmental exposure, neuron, ganglia

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Evidências epidemiológicas indicam que a poluição ambiental tem sido considerada como capaz de desencadear prejuízos funcionais na saúde e no sistema cardiovascular, entre os quais são relacionados o descontrole do ritmo átrio-ventricular (Peters et al.,2001; Lanki et al., 2006), o infarto do miocárdio (Nemmar et al., 2002; Ruidavets et al., 2005) e as arritmias cardíacas (Pope et al., 2004, Santos et al., 2008), conduzindo a um aumento de morbidade e mortalidade (Chang et al. , 2007). Porém, os mecanismos de associação da poluição ambiental com as doenças cardiovasculares ainda são desconhecidos (Zareba et al., 2001; Glantz, 2002). Embora haja um consenso sobre os efeitos da poluição ambiental na saúde, não se encontram relatos na literatura sobre os efeitos da poluição ambiental nos neurônios do plexo cardíaco.

Ainda, não está explicado o mecanismo biológico pelo qual a poluição ambiental influenciaria o sistema cardiovascular. Uma hipótese sugere que a poluição ambiental alteraria o controle neural do sistema nervoso autônomo do coração (Schwartz et al., 1994; Eilstein et al., 2001; Brook et al., 2002; D'Ippoliti et al., 2003; Nafstad et al., 2004). Outros acreditam que os níveis de poluição ambiental podem gerar respostas inflamatórias no tecido cardíaco, disfunções nos canais iônicos dos cardiomiócitos, aterosclerose e tromboses (Routledge et al., 2003; Pope et al., 2004).

De modo geral, os dados limitam-se à análise da frequência cardíaca (Peters et al.,1999; Devlin et al., 2003; Park et al., 2005), arritmias (Schwartz, 2002), taquicardia (Pope et al., 2004), incidência de internações em hospitais de grandes centros urbanos de pacientes com doenças cardiovasculares (Linn et al., 2000; Brunekreef e Holgate, 2002; Gouveia et al, 2003) e estresse oxidativo (Rhoden et al., 2005; Chahine, 2007). Embora em diversas pesquisas os autores tentassem descobrir quais os possíveis distúrbios do sistema nervoso autônomo do coração que estão associados à poluição ambiental, o mecanismo que desencadeia essas

alterações, bem como, o papel do plexo cardíaco na poluição ambiental ainda é desconhecido.

É sabido que os neurônios do plexo cardíaco fazem a interação entre gânglios isolados situados no epicárdio e provêm a modulação do trabalho cardíaco. Por isso, disfunções nesses neurônios podem ocasionar alterações nas bases funcionais e anatômicas do plexo cardíaco (Armour, 1999; Randal, 2000). Como a literatura é ainda escassa no que se refere ao estudo experimental utilizando animais de laboratório expostos a condições ambientais das grandes cidades, para obtenção de dados sobre a eficiência dos gânglios e neurônios cardíacos, o presente trabalho propõe avaliar as possíveis modificações do plexo cardíaco durante a exposição de animais submetidos à poluição ambiental de forma qualitativa e quantitativa por meio da estereologia.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Avaliar o plexo cardíaco de camundongos expostos à poluição ambiental, com o auxílio das microscopias de luz, estereologia e modelagem tridimensional, de forma a obter:

- Dados quantitativos dos gânglios como: a) O número total estimado e a área dos neurônios reativos a Giemsa e NADH; b) O número total dos gânglios, o volume médio do gânglio e neurônios do plexo cardíaco.

- Dados qualitativos como as relações de elementos do tecido conjuntivo (fibras colágenas e fibras elásticas).

- A reconstrução tridimensional das estruturas do plexo cardíaco a partir de observações macroscópicas e análises estereológicas.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Poluição do ar e Sistema nervoso autônomo cardíaco

Tem sido descrito na literatura por diversos autores (Schwartz et al., 1994; Eilstein et al., 2001; Brook et al., 2002; D'Ippoliti et al., 2003; Nafstad et al., 2004) que partículas ambientais podem alterar o controle do sistema nervoso autônomo cardíaco. Essa hipótese relaciona-se com o fato de que os poluentes atmosféricos podem desencadear eventos cardiovasculares como angina pectoris (Poloniecki et al., 1997), arritimias cardíacas (Watkinson et al., 1998; Donaldson et al., 2001), bradicardia e hipotermia, em ratos (Watkinson, 2000); afecções cardiovasculares, como a fibrilação ventricular (Peters et al., 2000); maior viscosidade do sangue, aumento de fibrinogênio, aumento da proteína C-reativa, aumento da frequência cardíaca (Dockery, 2001), infarto do miocárdio (Wellenius et al., 2002), oclusão das artérias coronárias em cães (Wellenius et al., 2003), estreitamento da artéria braquial (Brook et al., 2003); arritmias em ratos idosos (Nadziejko et al., 2004) e lesões na frequência cardíaca e na função do ventrículo esquerdo em ratos (Yan et al., 2008).

Zareba et al. (2001) e Glantz (2002) descrevem que embora, a modulação do controle autonômico cardiovascular seja uma proposta para definir os possíveis mecanismos entre poluição ambiental e mortalidades cardiovasculares. Os mecanismos biológico e fisiopatológico pelos quais a poluição do ar afetaria o sistema cardiovascular ainda são desconhecidos, contudo, vários são os mecanismos que podem ser sugeridos para ocasionar distúrbios cardíacos, tais como: sistema nervoso autônomo, respostas inflamatórias, efeitos químicos nos canais iônicos nas células do miocárdio, respostas inflamatórias nas células endoteliais, arteriosclerose e tromboses.

3.2 Sistema nervoso intrínseco cardíaco (SNIC)

As primeiras descrições sobre neurônios intrínsecos cardíacos (NIC) em humanos foram realizadas por Scarpa em 1794[1] (citado por Mitchell et al., 1952 *apud* Arora et al., 2003) e Lee (1849 a[2] e b[3] *apud* King e Coakley, 1958), esses autores notaram a presença de numerosos nervos que convergiam para a superfície do coração de vários mamíferos e do homem, e consideraram que estes nervos poderiam ser gânglios. A presença destes gânglios foi relacionada com o sistema nervoso autônomo em uma variedade de mamíferos (Dogiel, 1899; Francillon, 1928; Kuntz, 1934; Davies et al., 1952; King e Coakley, 1958; Robb, 1965; Shvalev e Sosunov, 1985; Gagliardi et al., 1988; Yuan et al., 1994; Armour et al., 1997; Pauza et al., 2000).

No plexo cardíaco existe uma coleção de neurônios que são classificados de acordo com a morfologia aparente como: neurônios unipolares, bipolares e multipolares. (Francillon, 1928; Kuntz, 1934; Robb, 1965; Yuan et al., 1994; Edwards et al., 1995; Armour et al., 1997; Cheng et al., 1997; Pauza et al., 1997, Arora et al , 2003; Maifrino et al, 2006).

Os neurônios localizam em coleções de gânglios que podem ser identificadas como plexos ganglionares na gordura epicárdica (Gagliardi et al., 1988; Yuan et al., 1994; Armour et al., 1997; Pauza et al., 2000; Pauziene et al., 2000). Esses neurônios cardíacos localizados na superfície epicárdica também são reconhecidos como plexo cardíaco (Akamatsu et al., 1999).

Estudos comparativos descrevem a localização do plexo cardíaco em corações de aves (Smith, 1971), anfíbios como a rã (Mcmahan e Kuffer, 1971), em mamíferos como a cobaia (Anderson, 1972), no rato (Pauza et al., 2000), em fetos

---

[1] Scarpa, A. Tabulae neurologicae; Ad illustrandum anatomiam cardiacorum nervosum, novi nervorum cerebri glosso-pharingali et octavocerebri. Ticini. (As cited in Mitchell GAG, Brown R, Cookson FB. 1952. Ventricular nerve cells in mammals. **Nature** 172:812. 1794.

[2] LEE, R. On the ganglia and nerves of the heart. Phil. Trans., 1849a pp. 43-46.

[3] LEE, R. Postscript to paper on the ganglia and nerves of the heart. Phil. Trans., 1849b.pp. 47-48.

humanos (Smith, 1969; Shvalev et al., 1989), em humanos (Pauziene e Pauza, 2003).

Ainda quanto à localização, o plexo cardíaco está localizado principalmente no tecido conjuntivo subepicárdico limitando os grandes vasos, na parte cranial do coração dos mamíferos em geral como o rato (Calaresu e St. Louis, 1967; Burkholder et al., 1992; Akamatsu et al., 1999) o porco (Moller e Jensen, 1971; Batulevicius et al., 2008), o homem adulto (King e Coakley, 1958; Janes et al., 1986; Pavlovich e Shvalev, 1992; Sing et al., 1996; Pauza et al., 2000; Pauziene e Pauza, 2003), e na fase fetal (Smith, 1969; Shvalev et al., 1989).

As células nervosas ganglionares localizam no tecido subepicárdico e são numerosas de acordo com King e Coakley (1958) em estudo realizado em vários tipos de mamíferos, Calaresu e St. Louis (1967) em gatos, Moller e Jensen (1971) em suínos, Smith (1971) em aves, Anderson (1972) em cobaias, Gagliardi et al., (1988) em cães, Singh, et al., (1996) em humanos, Pardini, et al., (1987), Burkholder et al., (1992), De Souza, et al. (1996), Akamatsu (1997), Cheng et al. (1997), em ratos.

Kukanova e Mravec (2006) descrevem que o plexo cardíaco é uma complexa rede neuronal, constituída por vários neurônios localizados em gânglios cardíacos. Esses neurônios processam informações a partir do sistema nervoso central e enviam informações para o coração. Além disso, os neurônios cardíacos participam da regulação da atividade cardíaca.

3.3 Aspectos morfoquantitativos dos gânglios subepicárdicos

King e Coakley (1958), através de várias técnicas de coloração em preparados de átrios de animais em vários mamíferos como a *Platypus* (espécie aquática de ornitorrinco)**,** *Echidna,* Porco Espinho, Canguru, Ouriço, Raposa-voadora, Rato, Porquinho da índia, Coelho, Cão, Gato, Golfinho, Boi, Ovelha, Porco, Cavalo, Tupaia, Macaca mullata, Homem (criança e adulto), observaram que o número de gânglios no tecido conjuntivo subepicárdico em cada animal é variável. Os gânglios se localizam espalhados na superfície dos átrios, mas localizados

sempre em áreas determinadas. Geralmente localizavam-se em torno da abertura veia cava superior, no septo interatrial, parte superior do átrio esquerdo, alguns na superfície ventral e dorsal do átrio direito e poucos gânglios próximos das veias pulmonares e veia cava inferior. No rato os gânglios estão localizados em torno do orifício da veia pré-cava, parte superior da superfície dorsal do átrio esquerdo, veia pré-cava esquerda (quando presente), em volta do seio coronário, abertura das veias pulmonares, septo interatrial e seio coronário. No cão, numerosos gânglios encontram-se na superfície do átrio direito, na parte superior da parede ventral e dorsal e no septo interatrial. No homem, em coração de crianças, não observaram gânglios entre a abertura das veias pulmonares e nem na superfície ventral do átrio esquerdo, o que ocorria no adulto. No homem adulto os gânglios estão espalhados na parte superior da superfície dorsal do átrio direito e junto da veia cava superior e veia cava inferior. Os autores não localizaram gânglios na região das aurículas desses mamíferos.

Calaresu e St Louis (1967), ao estudarem o plexo cardíaco do gato, por meio de numerosos cortes histológicos seriados, verificaram que os gânglios localizam próximos aos grandes vasos, aos átrios e septo interatrial, mas nunca sob o seio coronário. Esses autores verificaram que no coração do gato há um número total de neurônios estimadas em 8405.

Moller e Jensen (1971), ao estudaram os gânglios cardíacos no átrio direito do coração de suínos, verificaram a presença de gânglios dispostos como numerosas células nervosas no tecido subepicárdico. Eles utilizaram a técnica de reação da colinesterase e observaram grandes acúmulos de gânglios em torno dos nós sino-atrial e átrio-ventricular.

Ellison e Hibbs (1976), ao estudarem os gânglios cardíacos de rato, de cobaia, de suíno, de gato e de macaco, verificaram que em todas as espécies cada gânglio era embainhado por uma cápsula de tecido conjuntivo. As células nervosas eram grandes e cada uma possui um grande núcleo com um ou mais nucléolos. Os neurônios cardíacos de rato e cobaia são redondos e ovais, sendo o núcleo grande e pálido com nucléolo proeminente.

Randall et al. (1986), ao estudarem o plexo cardíaco da região próxima ao nó átrio-ventricular do cão, verificaram que nessa região há gânglios cardíacos com 2 a 80 células neuronais associadas com numerosos troncos nervosos. Gânglios individuais são comumente envoltos por tecido conjuntivo.

Pardini et al. (1987) estudaram o plexo cardíaco de rato por meio de cortes histológicos seriados, verificaram a presença de 3992 neurônios no coração de rato os quais localizam-se em gânglios em regiões distintas do atrio: entre a veia cava superior e a aorta, no septo interatrial superior, posterior ao átrio esquerdo, posterior ao septo interatrial inferior. O diâmetro longitudinal do neurônio foi de 26,9µm e o diâmetro transverso foi de 22,1µm e 16,1µm para os valores de maior e menor diâmetro respectivamente. As células ganglionares tinham forma redonda ou oval, com grande núcleo claro e substância de Nissl espessa, nucléolo pequeno, redondo e densamente corado, em um número de um a três por núcleo. Fibras nervosas e células de suporte eram frequentemente vistas entre os neurônios.

Burkholder et al. (1992) observaram em corações de ratos a presença de gânglios distribuídos em torno dos grandes vasos da base (artéria aorta, artéria pulmonar e veia cava superior). Os gânglios eram envoltos por tecido adiposo e geralmente adjacente ao músculo atrial, interconectados por feixes nervosos. Os gânglios estão imersos no tecido adiposo adjacente à camada muscular epicárdica, estando estrategicamente agregados em torno das raízes dos grandes vasos e septo interatrial.

Yuan et al. (1994), ao estudarem a anatomia dos gânglios cardíacos de cães, encontraram coleções de gânglios associados aos feixes nervosos e no tecido adiposo. No átrio esquerdo, o plexo ganglionar se localiza no tecido adiposo da superfície ventral. Há gânglios no meio da superfície dorsal dos átrios e em torno do óstio da veia cava inferior. Os gânglios são compostos de vários neurônios com um tamanho de 1x3mm.

De Sousa et al. (1996), estudaram os gânglios cardíacos por meio de preparados de membrana corados pelas técnicas histoquímicas do NADH diaforase e acetilcolinesterase, quantificaram os neurônios cardíacos e observaram em média

975 neurônios por rato, ocorrendo em grupos ou isolados. Encontraram os gânglios em localizações precisas tais como cranial as veias pulmonares (44% do total); cranial e à esquerda da veia cava superior (10%); junto ao septo interatrial (2%); à esquerda da veia pulmonar esquerda (12%); caudal às veias pulmonares e na parede do seio coronário (1%). Nenhum gânglio foi encontrado nas aurículas. Os nervos entram no átrio ao longo da veia cava superior, ao longo das veias pulmonares e ao longo do seio coronário formando um plexo contendo os gânglios.

Sing et al. (1996) e Armour et al. (1997) relataram que algumas porções do plexo cardíaco de humanos são desprovidas de gânglios cardíacos. No entanto, os gânglios cardíacos são distribuídos principalmente em ambos os átrios e na base dos grandes vasos próximos ao nó sino-atrial e ao nó-atrioventricular, no septo interatrial, na junção da aurícula, sobre o sulco átrio-ventricular e isolados nos ventrículos.

Akamatsu et al. (1997), ao estudarem o plexo cardíacos de ratos jovens e velhos, verificaram que os neurônios nos átrios do coração de ratos de três meses e de vintes meses apresentam uma diminuição de 70% a 80%. A área do perfil celular do corpo dos neurônios e a dos núcleos foram significativamente maior nos ratos com vinte meses comparado aos de três meses. Os gânglios apresentaram-se com forma arredondada, ovalada, alongada, estrelada ou poligonal em ambos os grupos. Foram encontrados exclusivamente sobre a superfície externa do músculo atrial, no tecido conjuntivo subepicárdico. A maioria dos neurônios esta agrupada em gânglios, mas há alguns neurônios isolados. A forma do perfil da célula nervosa é arredondada, oval, fusiforme em microscópio de luz e em microscópio eletrônico de transmissão mostra que os gânglios possuem cápsula, onde estão presentes fibras elásticas. Nos gânglios dos ratos de vinte meses detectou-se um aumento das fibras colágenas, tanto na cápsula como no interior do gânglio comparado aos gânglios dos ratos de três meses.

Armour et al. (1997), ao estudarem o plexo cardíaco de humanos, verificaram que os gânglios cardíacos se localizam em cinco regiões ventriculares e cinco atriais. Os gânglios foram classificados de acordo com seu tamanho a partir de

contagens neuronais com poucos neurônios localizados em gânglios volumosos medindo em torno de 0,5x1mm. O coração humano possui aproximadamente 14.000 neurônios, cada coração contém em média 550 gânglios de dimensões variadas. O corpo neuronal varia em forma e tamanho, podendo ser unipolar, bipolar ou multipolar. Os citoplasmas dos neurônios apresentam complexo de Golgi, retículo endoplasmático, ribossomos livres e numerosas mitocôndrias. Muitos axônios terminais localizam-se nos gânglios cardíacos intrínsecos e possuem um grande número de vesículas pequenas, claras e redondas que formam sinapses axodendrítica assimétricas, contudo poucos axônios possuem grandes vesículas de centro denso (grânulos de secreção). A cápsula dos gânglios cardíacos é formada por fibras colágenas.

Pauza et al. (1999), ao estudarem o plexo cardíaco em cães pelo método histoquímico de acetilcolinesterase, descrevem que a morfologia do plexo cardíaco foi identificada em cinco regiões adjacentes a veias pulmonares direita e veia cava superior. Os nervos penetram no epicárdio e dão origem ao plexo cardíaco, esse plexo varia de animal para animal e em relação à idade. O plexo cardíaco contém em média 456 gânglios de diferentes tamanhos.

Pauza et al. (2000), ao estudarem a topografia do plexo cardíaco em humanos através do método histoquímico por acetilcolinesterase, verificaram que o coração humano contém em média 836±76 gânglios epicárdicos. A organização estrutural dos nervos e gânglios no interior do plexo cardíaco varia consideravelmente de coração para coração e em relação à idade. O plexo cardíaco de humanos pode ser dividido em sete subplexos os quais estão distribuídos em regiões específicas do coração. O número de neurônios identificados nos gânglios de adultos foi significativamente pequeno quando comparado com os gânglios em crianças. Por estimativa o número de neurônios no interior dos gânglios cardíacos e relacionados com o número de gânglios cardíacos no epicárdio foi calculado com aproximadamente 43.000 neurônios intrínsecos presentes no plexo cardíaco em adultos e 94.000 neurônios foram encontrados em corações jovens (de fetos, de neonatos, e de crianças).

Her et al. (2000), em estudo de cultura neuronal de gânglios cardíacos a partir de diferentes estágios pós-natal em ratos, verificaram que a frequência de crescimento e tamanho dos gânglios cardíacos é rápida no estagio pós-natal de sete semanas, e lenta após o desmame (21 dias pós-nascimento). Os neurônios cultivados foram classificados como unipolares, bipolares e multipolares. Cada tipo de neurônio pode representar diferentes funções no plexo cardíaco relacionadas com o tempo de maturação dos neurônios.

Horackova et al. (2000), em estudo sobre o desenvolvimento pós-natal do plexo cardíaco de ratos, relatam que após duas semanas de vida extra-uterina ocorre uma subpopulação de neurônios cardíacos no septo interatrial e circulando o óstio da veia cava superior. Os neurônios cardíacos apresentam grandes mudanças durante a primeira semana de desenvolvimento pós-natal, isto pode estar relacionado parcialmente com o desenvolvimento e maturação do controle funcional do coração e dos nervos extrínsecos. O número total de neurônios presentes em cada gânglio cardíaco variou de 20-500 neurônios. A localização dos gânglios foi mais ou menos consistente entre os animais, sendo que o número de gânglios em cada região varia consideravelmente de preparação para preparação e aumenta com a idade do rato.

Arora et al. (2003), ao estudarem o plexo cardíaco no porco, descrevem que os neurônios se localizam em áreas discretas do tecido adiposo no epicárdio em cinco regiões atriais e seis regiões ventriculares. As cinco regiões do plexo ganglionar atrial identificadas foram: (1) na face ventral do átrio direito, (2) na veia cava e átrio direito, 3) na face dorsal do átrio direito, (4) no septo interatrial e (5) na veia cava superior e um no átrio esquerdo. Os seis plexos ganglionares identificados nas proximidades dos ventrículos foram (1) ramos da artéria aorta e artéria pulmonar (craniomedial), estendendo ao longo da artéria coronária esquerda, (2) artéria interventricular, (3) artéria circunflexa, (4) circulando a origem da artéria coronária interventricular dorsal, (5) artéria coronária direita e (6) ramo marginal da artéria coronária direita. Neurônios isolados foram identificados nas proximidades do septo interventricular na região cranial. Aproximadamente 3000 neurônios

foram estimados compondo o plexo cardíaco do porco. Alguns gânglios possuíam mais que 100 neurônios. Muitos destes neurônios são multipolares, sendo que uma pequena população de neurônios unipolares foi identificada entre tecido atrial e ventricular.

Kuder et al. (2003), ao realizarem estudo comparativo do plexo cardíacos no Gerbil, no *Spiny Mouse*, Chinchilas e pombo, descrevem que os gânglios cardíacos de todas as espécies estudadas encontram-se na gordura epicárdica. A organização estrutural dos neurônios em gânglios cardíacos de todos os mamíferos examinados foi uniforme em toda a superfície do corte, já no pombo, os neurônios se localizam principalmente na parte periférica dos gânglios.

Maifrino et al. (2006), em estudo morfoquantitativo dos neurônios cardíacos no átrio de camundongos utilizando a técnica de NADPH diaforase positivo, descrevem que os gânglios cardíacos foram mapeados em 3 grupos distintos: 1) na região cranial da artéria pulmonar, 2) na região caudal da veia pulmonar, 3) e sulco atrial. Amplos grupos de neurônios foram localizados cranialmente a veia pulmonar (66%). Três tipos morfológicos de neurônios NADPH-diaforase podem ser distinguidos relacionados com a sua morfologia: células unipolares, células bipolares e células multipolares. Os neurônios unipolares são mais predominantes (78,9%), enquanto que os neurônios multipolares são menos frequentes (5,3%). O tamanho dos neurônios varia de 90µm^2 a 220µm^2. Morfologicamente, os três tipos de neurônios foram similares e não há diferenças significativas. O total de neurônios cardíacos foi de 530±23.

Saburkina e Pauza (2006), ao estudarem a localização e variabilidade de gânglios epicárdicos em fetos humanos, relatam que os gânglios epicárdicos possuem localização definida a partir das 15 semanas de gestação e que os números de gânglios epicárdicos não diferem significativamente entre o feto e adultos humanos. O plexo cardíaco de fetos no período gestacional de 15-40 semanas contém 929±62 gânglios, mas a quantidade de gânglios varia consideravelmente de coração para coração, sem estarem relacionados com a idade.

Batulevicius et al. (2008), ao mapearam o plexo cardíaco em 11 porcos jovens (3-4 semanas de idade) através da técnica de acetilcolinesterase**,** descreveram que os gânglios se encontram em cinco regiões: (1) vento-medial a origem da artéria da veia cava superior, (2) dorsalmente a origem da veia cava superior, (3) entre a veia pulmonar, (4) dorso-medial a origem da veia ázigo, e (5) ventral a veia pulmonar esquerda. O número de gânglios intrínsecos do coração de porcos foi de 362±52. Aproximadamente 55% dos gânglios cardíacos do porco estão localizados no átrio esquerdo enquanto 36% encontram-se no átrio direito. Em média o coração do porco contém aproximadamente 12.000 neurônios intrínsecos.

3.4 Classificação morfológica de neurônios do plexo cardíaco

Nos gânglios intrínsecos cardíacos existem diferentes tipos de neurônios que são morfologicamente classificados como: neurônios unipolares, bipolares e multipolares. (Francillon, 1928; Kuntz, 1934; Robb, 1965; Yuan et al., 1994; Edwards et al., 1995; Armour et al., 1997; Cheng et al., 1997; Pauza et al., 1997, Arora et al , 2003; Maifrino et al, 2006).

Em relação ao diâmetro os neurônios de ratos são classificados em seu aspecto morfológico em três tipos (A, B, C), com base em seu tamanho e distribuição de suas organelas. Os neurônios do tipo A são grandes (40-75 µm de diâmetro), neurônios do tipo B correspondem ao tamanho médio (20-50 µm de diâmetro), enquanto que os neurônios do tipo C são pequenos com diâmetros menor que 20 µm (Ramburg et al., 1983). Neurônios do tipo A e B possuem fibras mielínicas e são classificados como mecanoreceptores, já os neurônios do tipo C possuem fibras amielínicas e são principalmente nociceptivos (Hunt et al., 1992; Wotherspoon e Priestley, 1999).

3.5 Alterações morfológicas do plexo cardíaco

Amorim e Olsen (1982) descrevem que os neurônios cardíacos variam morfologicamente em resposta as alterações patológicas durante doenças cardíacas, sendo que em pacientes com diabetes ocorre atrofia dos neurônios por coloração de Nissl's, em corações isquêmicos, um terço dos neurônios cardíacos demonstram grande alargamento.

Modificações estruturais no sistema nervoso autônomo ocorrem em diferentes períodos durante o desenvolvimento e maturidade relacionada à idade e/ou doenças degenerativas (Edwards et al., 1995). A morfologia do plexo cardíacos em diferentes espécies de mamíferos mostra que alterações morfológicas ocorrem com a idade tais como perda neuronal (Gabella, 1989; Chiang et al., 1986; De Souza et al. 1993; Gomes et al.,1997), acúmulo de tecido fibroso (De Souza, 1988), aumento de neurônios (Gabella e Trigg, 1984; Gabella, 1989; Masliukov, 2001).

Koberle (1968) e Junqueira et al. (1992), em trabalhos realizados sobre a influencia da doença de Chagas no coração, descrevem que uma das alterações morfológicas mais importantes que ocorrem durante a fase crônica da infecção chagásica humana é a lesão do plexo nervoso parassimpático dos órgãos ocos, especialmente do coração e do tubo digestivo, acompanhada por destruição neuronal. Esta despopulação (desnervação) é considerada a responsável pela patogênese das alterações cardíacas (arritmias, extrassístoles) assim como das manifestações digestivas (megaesôfago e magacólon).

Chapadeiro et al. (1999), em estudo realizado sob a despopulação neuronal cardíaca em hamsters cronicamente infectados com o *Trypanosoma cruzi*, verificaram que na doença de Chagas os gânglios cardíacos mostram alterações neuronais, ocorre redução no número de neurônios em todos os animais estudados que variou de 0 a 428 neurônios quando comparada com os controles. Em todos os animais infectados, o número total de neurônios esteve muito abaixo dos animais controles.

Jurgaitiene et al. (2004), em estudo realizado sobre as mudanças morfológicas relacionadas a idade em gânglios cardíacos de humanos, relatam que diferenças significativas ocorrem na morfologia dos gânglios intrínsecos cardíacos em relação a idade. Essas diferenças foram observadas com o aumento da idade na área ganglionar, nos neurônios e seus núcleos. Os gânglios apresentam forma circular ou oblíqua. A presença da cápsula de tecido conectivo ao redor dos gânglios variou entre os grupos. A cápsula de tecido conectivo nos gânglios cardíacos de humanos adultos e velhos é mais definida do que em crianças. A cápsula ganglionar em corações de crianças é pouco notável ou ausente.

Scorzoni-filho et al. (2004), ao aplicarem cloreto benzalcônio (CB) em ratos, verificaram que ocorre aumento no índice cardiotorácico (ICT), da área cardíaca, da pressão arterial e do débito cardíaco, bem como do peso ponderal e do fígado. Nestes animais, a análise histopatológica mostrou redução do número de neurônios atriais e congestão passiva crônica do fígado. A estimulação vagal não mostrou diferenças entre os grupos experimentais. A ablação do sistema nervoso intrínseco propiciou o aparecimento de cardiopatia dilatada com insuficiência cardíaca direita e esquerda. Os autores concluíram que o CB ocasiona desnervação exclusivamente intrínseca e provoca alteração na contratilidade cardíaca. A desnervação intrínseca se assemelha a cardiopatias dilatadas não isquêmicas, como a cardiopatia chagásica e a diabética. Nessas doenças, existe um desbalanço do sistema nervoso autonômico e a desnervação intrínseca tem, sem dúvida alguma, uma importância capital.

Akamatsu et al. (2007), em estudo sobre a influência da desnutrição pré e pós-natal no desenvolvimento da cápsula ganglionar subepicárdica em ratos, descrevem que a cápsula ganglionar subepicárdica de ratos é constituída por tecido conectivo, de colágeno tipo I e de fibras raras do sistema elástico. A desnutrição está associada a defeitos do tecido conectivo como lesões e alterações do crescimento. O colágeno é uma proteína presente em todos os tecidos, e sua presença foi avaliada no modelo de desnutrição protéica (5% de caseína) no plexo ganglionar subepicárdico em ratos de 21 e 42 dias. A desnutrição protéica altera as

fibras colágenas da cápsula ganglionar do plexo cardíaco, e pode influenciar a organização, desenvolvimento e maturação de células nervosas.

MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Animais - Grupos experimentais

Foram utilizados camundongos Balb C fêmeas, oriundos do Biotério Central da Faculdade de Medicina - USP para a avaliação dos efeitos da exposição à poluição do ar, sobre a morfologia e desenvolvimento do plexo cardíaco. Os protocolos foram realizados de acordo com normas internacionais e institucionais de experimentação animal American Veterinary Medical Association (AVMA, 2000) e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina sob o número 0063/09).

Os animais utilizados correspondem à terceira geração (**G3**) de camundongos que acasalaram, foram gerados e cresceram dentro das câmaras de exposição, recebendo ar filtrado, ou limpo (F) e não filtrado ou poluído (NF). A terceira geração foi escolhida para evitar exposições maternas pré-gestacionais ao ar poluído que poderiam ter ocorrido no Biotério Central da Faculdade de Medicina, principalmente no grupo controle (F-F). A formação das gerações precedentes (**G1** e **G2**) ocorreu de acordo com o descrito a seguir.

A primeira geração (**G1**) foi constituída por camundongos com 20 dias de idade, mantidos na câmara filtrada (5 fêmeas e 5 machos) e na câmara não filtrada (5 fêmeas e 5 machos), até atingirem a idade reprodutiva (60 dias). Neste estágio, foram formados 5 casais nas respectivas câmaras, mantidos separadamente em caixas individuais. Os filhotes desse cruzamento constituíram a geração 1 (G1), e foram mantidos em suas respectivas câmaras, por um período de 21 dias. Após o desmame, os mesmos foram separados das mães e agrupados em suas respectivas câmaras em duas caixas, uma contendo 10 fêmeas e a outra, com 10 machos, escolhidos aleatoriamente. Ao alcançarem a idade reprodutiva (60 dias), foram formados 10 casais em cada câmara, cujos filhotes passaram a constituir a segunda geração (G2). Após o desmame, os animais de G2 (mesmo número de G1) foram separados e, atingida a idade reprodutiva, foram agrupados em casais que

produziram os filhotes da terceira geração (G3), em suas respectivas câmaras (F e NF).

Após o nascimento das ninhadas **G3**, os filhotes permaneceram com a mãe durante o período de lactação (21° dia). Após o desmame, as mães e os filhotes machos foram retirados do estudo. Metade das fêmeas que estiveram durante o período gestacional expostas na câmara de ar filtrado passaram a serem expostas na câmara de ar não filtrado, até a atingir a maturidade (120 dias de vida), e a outra metade permaneceu sendo exposta na câmara de ar filtrado até completar 120 dias de vida. Da mesma forma, metade dos filhotes das fêmeas que foram expostas à ao ar não filtrado durante a vida gestacional, passou a ser exposta na câmara de ar filtrado até atingirem a idade adulta, e a outra metade, permaneceu na câmara de origem.

Assim, formaram-se quatro grupos de estudo:

Grupo 1 (F-F) = exposição gestacional e pós-natal à câmara de ar filtrado;

Grupo 2 (NF-F) = exposição à câmara de ar não filtrado no período gestacional e à câmara de ar filtrado no período pós-natal;

Grupo 3 (F-NF)– exposição à câmara de ar filtrado no período gestacional e a exposição à câmara de ar não filtrado no período pós-natal;

Grupo 4 (NF-NF)= exposição à câmara de ar não filtrado nos períodos gestacional e pós-natal.

Para os diferentes experimentos, após completarem 120 dias, foram utilizadas 5 fêmeas de cada grupo (F-F; NF-NF; F-NF; NF-F), escolhidas de forma aleatória.

A escolha da terceira geração visou assegurar que os animais do grupo F efetivamente não sofreram qualquer tipo de exposição ao ar poluído, uma vez que os animais de G1, por serem obtidos diretamente do Biotério, poderiam apresentar algum tipo de exposição à poluição do ar. Da mesma forma, ficou patente que os animais do grupo NF foram sempre expostos aos efeitos da poluição atmosférica.

A Figura 1 ilustra os procedimentos para a obtenção dos animais de G1, G2 e G3.

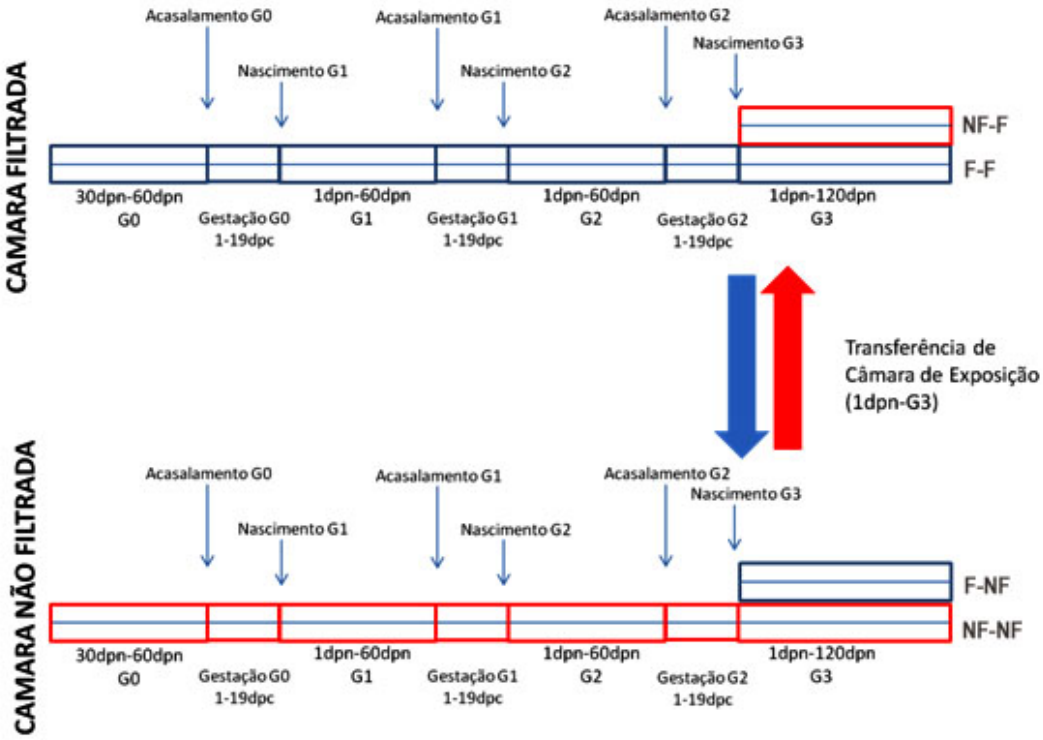


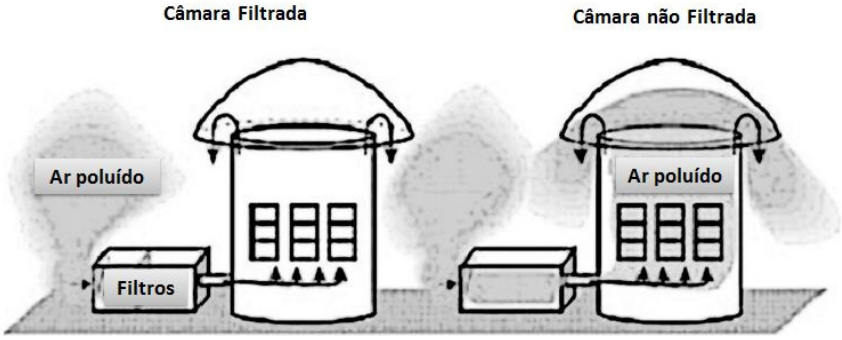
Figura 1-Representação esquemática do protocolo de criação e exposição dos animais experimentais. As setas azul e vermelha indicam que os camundongos da terceira geração (G3) passaram por exposições diferenciadas durante o período de desenvolvimento embrionário/fetal e pós-natal.

4.2 Exposição

A exposição dos animais foi realizada no jardim da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), em câmaras de exposição. A FMUSP está localizada na intersecção da Rua Teodoro Sampaio com a Av. Dr. Arnaldo. Muito próximo (100m) de uma estação de monitoramento da CETESB[4] (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) que registra continuamente os níveis de PM_{10}, NO_2, CO e SO_2. Foram usadas 2 câmaras de topo aberto montadas lado a lado (Fig.2): uma recebendo ar do meio ambiente (câmara poluída), e a outra recebendo

[4] http://www.cetesb.sp.gov.br/

ar filtrado (câmara limpa). A entrada de ar ocorre na base do cilindro, sendo distribuído uniformemente, através de furos, a um fluxo de 50 l/seg e exaurido pelo topo por uma grande abertura. Esta câmara é um sistema normobárico, onde a pressão interna não excede 3cm de H_2O. Na câmara limpa foram colocados filtros: o primeiro para as partículas grandes o segundo para partículas finas (Purafil, São Paulo, modelo TB e modelo JFL-90); e o último para adsorver substâncias químicas. No interior das câmaras, os animais foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e umidade relativa do ar, (recebendo água e ração *ad libitum*).



FONTE: VERAS et al., 2008).

Figura 2- Representação esquemática das câmaras de exposição, mostrando os filtros externos na câmara filtrada e o sentido de circulação do ar em ambas as câmaras filtrada e não filtrada.

4.3 Caracterização da Exposição

4.3.1 Concentração ambiental

A concentração dos poluentes ($MP_{2,5}$ = material particulado ≤ 2,5µm) dentro da câmaras foi determinada gravimetricamente, utilizando impactadores Harward (Air Diagnostics, Harrison, ME) sob uma taxa de fluxo de 10 $L.m^{-1}$ equipados com filtros de policarbonato; os resultados sendo expressos em $\mu g/m^3$. Ainda utilizando os

mesmos filtros, análises elementares (Na, Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, V, Fe, Ni, Cu, Zn and Pb) foram realizadas com auxílio de um espectrofotômetro de fluorescência de raio X (Shimadzu EDX 700)[5].

4.3.2 Dose de exposição dos animais

A exposição dos animais foi estimada com base na dose média diária de exposição ao $PM_{2,5}$, já a dose de exposição durante o período gestacional foi calculada multiplicando-se o volume total de ar inalado durante o período gestacional (18 dias) pela concentração média diária de PM2.5 no período, como mostrado na fórmula a seguir:

DOSE DE EXPOSIÇÃO= C * T* TxI

onde C é a concentração do poluente, T é o tempo de exposição e TxI é a taxa de ventilação

O volume de ar inalado por um camundongo em 1 hora foi considerado 0,0022 m^3; desta forma, o volume de ar inalado em 18 dias = 0,0022 m^3/h * 18 (dias) * 24 horas = 432 * 0,0022 m^3 = 0,95 m^3 de ar.

Assim, por exemplo, há uma concentração média de 10 ug/m^3 a dose de exposição acumulada seria de 0,95 ~~m^3~~ * 10 ug/~~m^3~~ = 9,5 ug.

4.4 Obtenção e amostragem dos corações

Após o período de exposição, as fêmeas foram pesadas e eutanasiadas por superdosagem de anestésico inalatório Isoflurane® (AVMA, 2000).

[5] http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/espectrometros/raios-x/eds/edx.aspx

Em seguida, após incisão na longitudinal mediana, tiveram a pele do tórax rebatida lateralmente para a realização de uma toracotomia mediana com posterior secção das costelas, a fim de facilitar a exposição do coração e a sua remoção com os vasos da base. O coração foi então imerso em solução salina e, após levemente enxugado e pesado, foi fixado por imersão em solução de parafolmaldeído 4% em PBS por 24 horas. Retirado do fixador, foi então transferido para o álcool 70%, até o momento da análise.

Finalizada a coleta dos espécimes, as carcaças dos animais foram descartadas, seguindo as normas de descarte para resíduos biológicos não contaminados da FMUSP, quando foram acondicionadas em sacos de lixo biológico, identificadas e destinadas à incineração.

4.5 Mapeamento topográfico da inervação do plexo cardíaco

Este procedimento foi realizado para facilitar o entendimento e reconhecimento das estruturas constituintes do plexo cardíaco. Desta forma, foram utilizados 6 fêmeas, com idade aproximada de 120 dias, provenientes de descarte do Biotério da FMUSP.

Após a eutanásia (3 animais), procedeu-se à laparotomia mediana para a remoção das alças intestinais, permitindo-se a visualização da a. aorta e da v. cava inferior.

Os vasos foram então canulados com cânulas plásticas adaptadas em seringas plásticas contendo látex "Neoprene" 450 (Du Pont do Brasil S/A - Indústrias Químicas) diluído em água a 2:1 e corado com pigmento específico (azul para veia e vermelho para artéria). A injeção foi realizada lenta e progressivamente, até o completo preenchimento dos sistemas arterial e venoso, quando então os vasos foram clampeados. Após toracotomia mediana, os animais foram imersos em solução de formol a 10% por um tempo mínimo de 72 horas. Identificado o coração com os vasos da base, procedeu-se a uma minuciosa dissecção desses vasos, a fim de evidenciar seus trajetos, até onde fosse possível acompanhá-los

macroscopicamente. Tal procedimento permitiu visualizar a região atrial próxima aos vasos da base, onde se localiza o plexo cardíaco.

Nos três animais restantes, realizou-se a evidenciação do plexo cardíaco à olho nu utilizando-se a reação da AChE[6]. Desta forma, após a eutanásia e toracotomia mediana seguida de secção lateral das costelas, adentrou-se à cavidade torácica com o intuito de se realizar ligaduras dos vasos da base. A seguir, com os corações ainda na caixa torácica, procedeu-se a uma secção do ápice cardíaco quando, então, foi injetada em cada um dos ventrículos e com pressão moderada, quantidade suficiente de solução salina tamponada[7], para lavagem das 4 câmaras cardíacas. Após a lavagem, via ventrículos direito e esquerdo e respectivos óstios atrioventriculares, era injetada nos átrios direito e esquerdo, uma solução de gelatina incolor a 10%, a fim de insuflar o átrio. Em seguida, retirou-se em bloco único o coração, vasos da base, pulmões e traquéia, que foram imersos em paraformol 10% com tampão fosfato[8] (0,1 M; pH 7,4) por um período de 2 horas a 4ºC. Findo esse período, promoveu-se à lavagem dos átrios a partir dos ventrículos, com solução salina com hialuronidase[9] (0,5mg/100ml) e iso-OMPA (tetra-isopropil pirofosfaramida)[10] 0,05 nM para inibir as colinesterases inespecíficas (ou pseudo AChE), por um período de 2hs. A seguir, os blocos foram incubados por 24hs conforme protocolo de Saburkina et al. (2010). Findo o processo de incubação, o coração com os vasos da base foram cuidadosamente dissecados sob lupa cirúrgica, com o auxílio de pinças e tesoura oftalmológicas, exibindo-se os vasos da base, ramos do nervo vago e a cadeia simpática. Os delgados ramos nervosos situados na superfície da parede atrial foram evidenciados com a introdução, via ventricular, de

---

[6] Sigma-Aldrich

[7] **PBS (SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA)-** Cloreto de sódio = 9 g; Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,2 a 7,4) 100 ml; Água destilada completar para 1000 ml.

[8] **TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 0,1M em pH=7,4.**
Solução A: solução 0,2M de fosfato de sódio monobásico, (NaH2PO4H20; PM = 138,01): 27,6 g/1000 ml de água destilada. Solução B: solução 0,2M de fosfato de sódio bibásico, (Na2HPO4; PM = 141,98): 28,4 g/1000 ml de água destilada. Misturando-se os volumes indicados solução A 19,0ml e solução B 81,0 ml e completando-se para 200 ml com água destilada pode-se fazer tampão fosfato 0,1M com pH=7,4

[9] 2000 UTR Aspen.

[10] Sigma-Aldrich.

um sistema de fibra óptica. A documentação fotográfica foi realizada com lupa estereoscópica acoplada a um sistema de imagem[11].

4.6 Avaliação estereológica e morfométrica do coração e do plexo cardíaco

4.6.1 Amostragem

Depois de retirados, os corações dos animais de todos os grupos foram pesados e incluídos rotineiramente em parafina, a fim de serem submetidos a cortes seriados com espessura de 5µm, transversais ao longo eixo do órgão, que foram realizados no sentido da base para o ápice cardíaco (Fig. 3). Desta forma, foram feitos tantos cortes quanto necessários a fim de se esgotar completamente a região dos átrios, cujo número variou, de acordo com o volume atrial de cada espécime (cerca de 200 a 600 cortes). O coração foi amostrado de forma sistemática e uniforme, e um em cada 10 cortes (ou seja, uma distância de 50 um) foi coletado em laminas. Neste protocolo de amostragem o primeiro corte selecionado ocorreu no intervalo entre a 1º e o 10º corte, sendo determinado aleatoriamente. Por exemplo se o número 1 foi sorteado, os cortes 1, 11, 21, 31, 41, 51, etc, foram coletados, se o numero 3 foi sorteado os cortes 3, 13, 23, 33, etc .. foram coletados. Para o estudo imunoshistoquímico e para a análise das fibras do sistema colágeno e elástico cortes aleatórios também foram amostrados e coletados em laminas silanizadas.

[11] Carl Zeiss Microimagin – Stemi SV6-Alemanha.

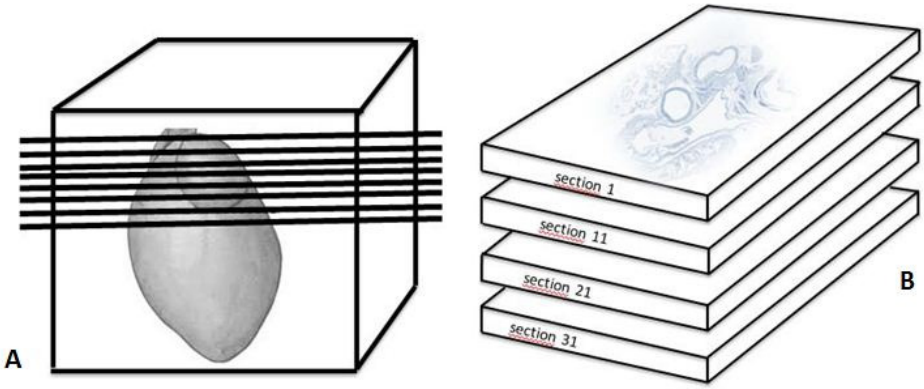


Figura 3 - (a) Representação esquemática da orientação do coração para inclusão em parafina e realização dos cortes seriados; em (b) representação dos cortes selecionados para análise corados com técnica de Giemsa.

4.7 Colorações empregadas

Para se estimar o numero de gânglios presentes no plexo cardíaco bem como o volume dos átrios e gânglios, os cortes, etc. foram montados em lâminas contendo 3 cortes cada (ex.: 1, 11, 21) e corados pelo método não-histoquímico de Giemsa descrito por Barbosa (1978), uma vez que, como relatado por Erhart (1974), Cormack (1995), Natali e Miranda-Neto (1996) e Sant'Ana et al. (1997), com essa técnica é possível distinguir no interior dos gânglios, neurônios com maior ou menor intensidade basofílica. Estes mesmos cortes foram utilizados para estimarmos o numero de neurônios e suas dimensões.

Inicialmente, os cortes foram desparafinados em xilol, submetidos a uma série decrescente de alcoóis (de 100º a 70º), lavados com água destilada e colocados por 2 minutos em solução tampão Sorensen (pH 6,9)[12]. Em seguida, foram imersos na solução corante de Gi com tampão Sorensen por um período de 5 minutos e, após, colocados em uma solução de molibdato de amônio a 5% por 1 minuto, a fim de melhor fixar o corante, impedindo sua retirada quando do

[12] **TAMPÃO SORENSEN pH 6,9**
Solução A: solução 0,06M de KH_2PO_4 0,816 g/ 100ml de água
Solução B: solução 0,06M de Na_2HPO_4. $12H_20$ 1,074g/50ml de água.
Para 100 ml de tampão, misturar 70 ml da solução A e 30 ml da Solução B.

processo de desidratação, que foi realizado em série crescente de álcoóis (do 70º ao absoluto) durante 1 minuto em cada fase. Após diafanizados em xilol por 3 vezes durante três minutos, os cortes foram montados entre lâmina e lamínula com resina Entellan[13] (Figura 4).

Para as colorações que passarão a ser descritas, foram utilizados os cortes dos intervalos entre aqueles utilizados no método de Giemsa, isto é, de 2 a 10; de 12 a 20; de 22 a 30, etc., que foram montados, alternadamente, em grupos de 3 em cada lâmina (Ex.: 2, 6, 10; 3, 7, 12; 4, 8, 13; 5, 9, 14, etc.).

O método histoquímico utilizado para evidenciar os componentes neuronais do plexo cardíaco foi o da reação da β-nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), descrito como segue. Uma lâmina de cada intervalo (ou seja, de 1 a 11; de 21 a 31; de 41 a 51, etc.) foi escolhida de forma aleatória (ex.: lâmina com os cortes 2, 6 e 10). Essa lâminas foram desparafinada em xilol e hidratadas em série decrescente de álcoois (de 100º a 70º), imersas por 30 minutos em solução permeabilizante (Krebs contendo Triton X-1005 a 0,3%), submetidas a 3 lavagens em solução de Krebs durante 10 minutos e, em seguida, mantidas por um período de 48 horas, no seguinte meio de incubação: 25 ml de solução estoque de NBT[14] (solução estoque na concentração de 0.5 mg/ml), 25 ml de tampão fosfato de sódio[15] ph 7,3 (0,1M), 50 ml de água destilada e 0,05 g de β-NADH-d[5] (Gabella, 1969). Finalizado o período de incubação as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas como previamente descrito.

Selecionadas de acordo com o descrito para o método da NADH, lâminas foram submetidas às colorações rotineiras da Resorcina-fucsina (Weigert, 1898) para a **evidenciação das fibras do sistema elástico**, e do Picrosírius analisado sob luz polarizada (Junqueira et al., 1979), para a tipificação das fibras colágenas.

---

[13] Merck, Darmstadt, Alemanha.
[14] Sigma-Aldrich.
[15] Sinth®BRA.

4.8 Estimativa de volumes

4.8.1 Volume total do coração e dos átrios (VAT)

O volume total dos corações (Vcor, cm^3) foi obtido dividindo-se o peso (g) pela densidade específica do tecido, neste caso considerada 1,06 g/cm^3 (Brüel e Nyengaard, 2002).

Já o volume dos átrios foi obtido utilizando-se o Princípio de Cavalieri (Gundersen e Jansen, 1987; Howard e Reed, 2005). Para que o corte pudesse se visto ao microscópio em sua totalidade uma objetiva de pequeno aumento (2,5 x) foi utilizada para se obter as fotomicrografias. Com o auxíliom do software ImageJ um sistema teste de pontos (área associada ao ponto= 0,1 mm^2) foi sobreposto as imagens e os pontos incidentes sobre os átrios foram contados diferencialmente para o direito (ptAD) e esquerdo (ptAE) (Fig.4). E aplicando-se as equações [1,2] a seguir os volume total dos átrios e do átrio esquerdo e direito puderam ser estimados:

[1] $VAD= T \times a(p) \times \Sigma Pts_{AD}$

[2] $VAE= T \times a(p) \times \Sigma Pts_{AE}$

onde T é a distância entre os cortes (número de cortes multiplicado pela espessura dos cortes = 50 µm); a(p) = a área associada ao ponto, e ΣPts_{AD} e ΣPts_{AE} = somatória de pontos incidentes no átrio direito e esquerdo, respectivamente.

O **VAT** foi então obtido, somando-se V_{AD} e $V_{AE.}$

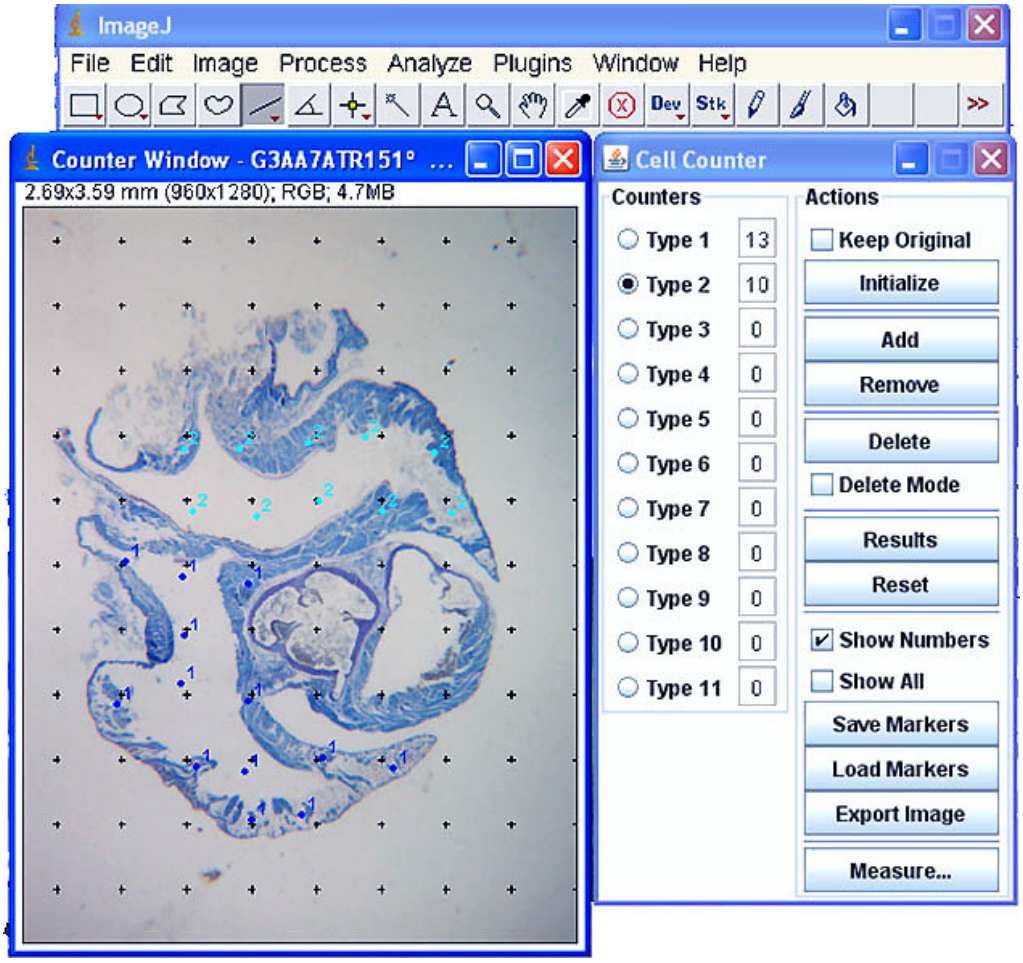


Figura 4 - Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos (ferramente GRID) e contagem do número de pontos (ferramenta CELL COUNTER) utilizando o programa de análise de imanges Image J para avaliação dos volumes das regiões atriais.

Fotografados com objetiva de 40x sob lupa estereoscópica com uma câmera acoplada[16], objetivando a captura das imagens, que após serem transmitidas para um computador munido de programa específico[17], permitiu fotografar os gânglios cardíacos. A estimativa do número de neurônios foi realizada em todos os grupos (F-F, F-NF, NF-F, NF-NF) corados pelos métodos de NADH. O Image J[18] foi utilizado para avaliar a área do contorno dos gânglios, dos corpos neuronais, e quantidade de corpos neuronais no interior dos gânglios.

[16] Carl Zeiss Microimaging, Axioshop 40, Germany
[17] Carl Zeiss Microimaging, Axionvision, Rel. 4.6, Germany
[18] http://rsbweb.nih.gov/ij/

4.8.2 Volume Total de gânglios (VT_G)

O **VT_G** também foi obtido utilizando-se o método de Cavalieri. Para tanto, todos os cortes corados pelos métodos de Giemsa e NADH que apresentavam gânglios foram observados com objetiva 20x e fotografados. Optou-se por calcular essa variante nos cortes com diferentes colorações, a fim de se comparar a acuidade dos métodos empregados para a evidenciação de neurônios. Novamente, um sistema-teste de pontos com área associada ao ponto[$a_{(p)}$] de 300µm foi sobreposto às imagens, e os pontos incidentes sobre todos os gânglios que apareciam no corte foram contados. O VT_G foi então obtido aplicando-se a formula a seguir [3]

$$[3] VT_G = T \times a(p) \times \Sigma Pts_G$$

onde T é a distância entre os cortes (número de cortes multiplicado pela espessura dos cortes = 50 µm); a(p) = a área associada ao ponto , e ΣPts_G = somatória de pontos incidentes sobre os gânglios.

4.8.3 Número Total de Gânglios (NT_G)

O **NT_G** foi estimado diretamente, avaliando-se com objetiva de 20x, todos os cortes corados pelo método de Giemsa. Quando visível, o gânglio era seguido sistematicamente através dos cortes, e sua localização anotada. Este procedimento foi necessário para que o mesmo gânglio não fosse contado duas vezes, já que existia uma grande variabilidade no seu tamanho, para o mesmo animal. Na figura 5 pode-se observar uma representação esquemática do método aplicado.

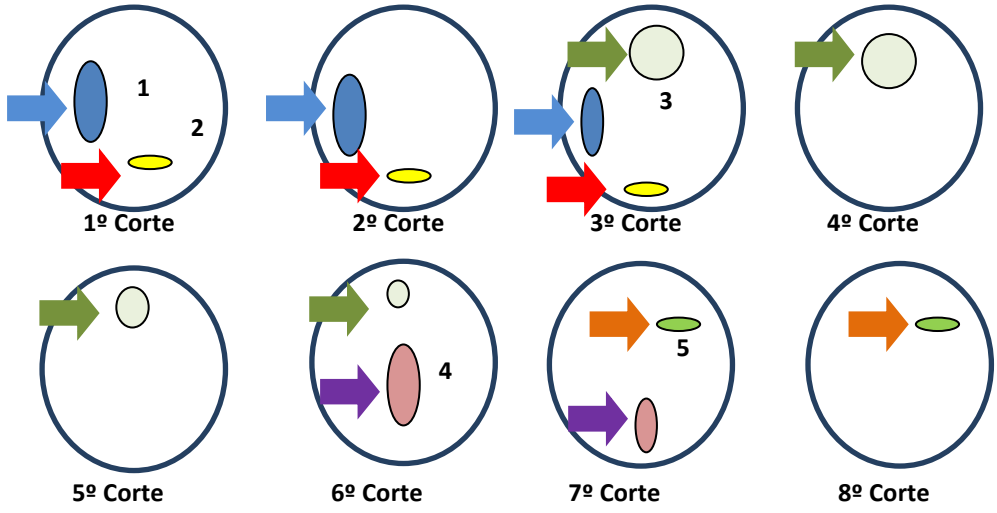


Figura 5 – Esquema ilustrativo para localização dos gânglios cardíacos no átrio de camundongos. Os números representam a quantidade de núcleos encontrados em cada corte seriado. O esquema representa a contagem de 5 (cinco) gânglios.

4.8.4 Volume Médio dos Gânglios (VM_G) do plexo cardíaco

O VM_G foi obtido indiretamente, dividindo-se V_G por NT_G [4]:

$$[4]\ VM_{G=}\ V_{G/}\ NT_G$$

4.8.5 Volume Médio dos Neurônios (VM_N) ganglionares

O **VM_N** foi estimado nos cortes corados pelos métodos de Giemsa e NADH, com o mesmo princípio estabelecido no item 3.8.1. Foram avaliados apenas os neurônios positivamente marcados; neurônios que não possuíam os limites de corpo neuronal, núcleo ou nucléolo bem definidos, foram desconsiderados.

O volume médio dos neurônios foi obtido pelo volume médio ponderado que é um método de se obter estimativas de volume de uma partícula e está baseada na medida de segmentos de interceptos sobre o perfil da partícula em cortes histológicos. A fundamentação teórica do método está descrita em Mayhew

(1989) e Gundersen (1986). Este é método eficiente de se medir o volume médio ponderado de uma partícula e é realizado em duas etapas (Howard e Reed, 2005):

1) **amostragem das partículas** a serem medidas: realizada aplicando-se um sistema-teste de pontos, avaliando-se os neurônios sobre os quais um ou mais pontos incidem;
2) **estimativa do volume** de cada partícula: realizada medindo-se o comprimento de uma linha isotrópica que atravessa o ponto de amostragem que encontra-se no interior do transecto da partícula visualizado no corte.

Assim, ao se realizar uma série de medidas, pode-se obter o volume ponderado, aplicando-se a seguinte fórmula [5]:

$$(5)\ V_{MN} = [\pi/(3*n)] * \sum l^3$$

onde n é o numero de medidas realizadas para uma mesma partícula (no caso um neurônio) e $\sum l$ a somatória dos comprimentos medidos elevados à terceira potencia.

4.8.6 Numero Total de Neurônios (N_{NEU})

O N_{NEU} também foi obtido indiretamente dividindo-se o V_G por V_{ponN}, segundo a fórmula a seguir [6]:

$$[6]\ N_{NEU} = VT_G / V_{ponN}$$

4.8.7 Área Seccional, Perímetro e Diâmetro de Feret dos Neurônios do plexo cardíaco

A área seccional, bem como o perímetro e diâmetros de Feret, foram avaliados de acordo com métodos morfométricos. Embora não se tratem de técnicas estereológicas puras estas medidas foram realizadas, por serem empregadas pela maioria da literatura referente ao tema do presente trabalho (Pardini et al., 1987).

Todas estas medidas foram realizadas em 50 neurônios por animal, num total de 250 neurônios para cada grupo (FF, NF-NF, F-NF, NF-F) sob objetiva de 40x, com o auxílio do software ImageJ. Após a calibração do software, o contorno do corpo celular dos neurônios era marcado manualmente e medido. O software ImageJ, a partir desta medida estima os demais parâmetros (Diâmetro máximo e mínimo de Feret e área seccional). O comprimento do neurônio foi verificado por meio do diâmetro de Feret máximo (FMax), e a largura, pelo diâmetro de Feret mínimo (FMin) (Walton,1948). O diâmetro de Feret é igual à distância entre duas tangentes paralelas a uma dada direção, que enquadram a silhueta do objeto (corpo celular do neurônio) representado através de reconstrução em 3D pelo programa ImageJ (Figura 6). A razão entre o eixo longo e curto foi usada para verificar a esfericidade para o corpo da célula (Kiang et al.,1984[19] apud Berglund e Ryugo, 1987).

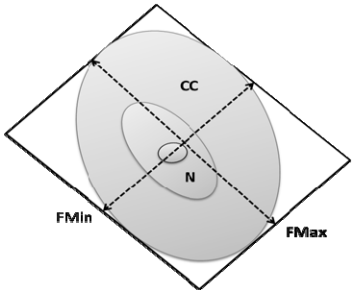


Figura 6 – Desenho esquemático para demonstração do diâmetro de Feret máximo (FMax) e odiâmetro de Feret mínimo (FMin), CC (corpo celular), N (núcleo do neurônio).

[19] Kiang, N.Y.-S., M.C. Liberman, J.S. Gage, C.C. Northrup, L.W. Dodds, and M.E. Oliver **(1984)** Afferent innervation of the mammalian cochlea. In L. Bolis, R.D. Keynes, and S.H.P. Maddrell (eds): Comparative Physiology of Sensory Systems. Cambridge: Cambridge University Press, pp. **143-161.**

4.9 Avaliação qualitativa das fibras dos sistemas colágeno elástico nos gânglios

Os cortes corados pelo método de Picrosirius e Resorcina-Fucsina foram avaliados com auxílio de um microscópio de luz comum e polarização para se verificar a organização das fibras da matriz. Estes dois métodos permitem evidenciar as fibras do sistema colágeno e elástico, respectivamente. Os cortes corados pelo método de Picrosirius quando observados ao microscópio de polarização têm as fibras do sistema colágenas discriminadas de acordo com sua birrefringência: as fibras grossas são muito birrefringentes, caracterizadas com as cores amarela ou vermelha, assim classificam-se em colágeno tipo I. Algumas fibras são finas, e apresentam-se menos birrefringentes, assim constituem o colágeno tipo III com coloração esverdeada. O colágeno tipo III não forma fibras e mostra uma fraca birrefringência de cor variável (Junqueira et al., 1978; Zambrano et al., 1982[20] apud Veras, 2004).

4.10 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se os softwares estatísticos SPSS 17. As médias (M), os desvios padrões (DP) foram calculados para cada grupo, com relação aos parâmetros avaliados.

Teste t pareado de *Student* foi utilizado para se realizar as comparações dos valores da concentração de $PM_{2,5}$ entre as câmaras.

Uma análise multivariada (two-way ANOVA) foi realizada para se avaliar os efeitos da exposição gestacional e o pós natal sobre os desfechos estudados. Este teste produz um termo de interação que identifica se o efeito de um fator (exposição gestacional) é ou não influenciado pelo efeito de outro fator (exposição pós natal). Hipótese nula foi rejeitada ao nível de probabilidade de $P<0,05$. O método gráfico de regressão linear multivariada permite investigar não apenas se

[20] Zambrano NZ, Montes GS, Shigihara KM, Sanchez EM, Junqueira LC (1982) Collagen arrangement in cartilages. *Acta Anatomica* **113**, 26±38.

os fatores tem efeito significativo sobre a variável em estudo, mas ainda, se há interação significativa entre eles. Por intermédio do gráfico de interação (interação significa que, ao mover uma variável do valor baixo para o alto, uma outra é afetada indiretamente), pode-se à saber se as distribuições da estimativa marginal da média (EMM) mantém um paralelismo entre si (ausência de interação) ou se isso não ocorre (interação significativa) (Beiguelman, 1994).

4.11 Reconstrução tridimensional do coração e dos gânglios cardíacos

Após observações das estruturas macroscópicas do coração e análise estereológicas, utilizou-se uma ferramenta de modelagem para reconstrução do plexo cardíaco com possibilidades de variação de parâmetros anatômicos, a qual foi composta de três etapas:

1. A primeira foi à modelagem tridimensional da posição do coração em relação à traqueia. A modelagem tridimensional do coração do camundongo foi composta pelos: átrios, ventrículos e vasos da base.
2. Na segunda, realizou-se a modelagem tridimensional da localização dos gânglios que compõem o OS, envoltos por tecido adiposo epicárdico.
3. Na terceira foi realizada a integração de todas as estruturas sob efeito de animação, representando um atlas em 3D do Plexo Cardíaco

4.11.1 A Escolha do Software

Ao se optar pela escolha de trabalhar com modelagem em 3D foram encontradas algumas restrições, como a versão para o sistema operacional em que ele poderia ser utilizado (Linux, Windows, etc) e também o fator custo de aquisição, uma vez que, os principais softwares de modelagem 3D do mercado apresentam custo elevado para sua licença, o que inviabiliza a utilização desse tipo de ferramenta. Outro fator importante a ser considerado, é a qualidade final dos modelos tridimensionais obtidos.

Desta forma, optou-se pela utilização do programa de reconstrução tridimensional *Blender,* por ser um software para modelagem e animações em 3D que possui código aberto, e está disponível para *download gratuitamente* na página da organização: http://www.blender.org. O *Blender* é uma suíte de criação 3D multiplataforma (Windows, Linux, Mac OSX, Solaris, Irix, etc), com diversos recursos. Ele também permite a criação de cenas e objetos interativos (através do chamado *game engine*).

4.11.2 Modelagem 3D

A seguir, será descrita a metodologia utilizada no processo de modelagem tridimensional das estruturas anatômicas do presente trabalho, assim como a introdução de alguns conceitos necessários para o entendimento do funcionamento da ferramenta e do processo de modelagem 3D.

4.11.3 A Interface de trabalho do *Blender*

A interface gráfica do *Blender* é formada por barras de menus na parte superior da tela, uma área de trabalho na região central, e um painel inferior, o qual é dividido em várias janelas compostas por diversas ferramentas com várias opções de utilização. Ao se abrir a plataforma *Blender,* a imagem padrão do programa é composta por um cubo localizado na região central da área de trabalho, uma câmera e uma fonte de alimentação.

4.11.4 Aquisição de Imagens

Várias técnicas de modelagem são disponíveis, porém, no presente trabalho optou-se pela técnica denominada "*Box modeling*", que consiste na deformação de uma primitiva 3D inicial, que nessa técnica é representada por um cubo. Para a modelagem, são realizadas deformações no cubo, que vão desde a subdivisão dessa estrutura inicial em um número maior de pontos, vértices e faces, até a extrusão e

escalas das mesmas, que ao decorrer do processo de modelagem, vão dando forma ao modelo.

O processo de modelagem com o *Blender* permite a utlização de referências visuais externas como desenhos em papel, ou fotos para referência na tela do sofware. Assim, foi escolhida uma foto de referência e selecionadas as opções "*Background Image"* no menu *"View".* Após importação da imagem na tela de trabalho, o processo de modelagem prosseguiu em três etapas.

A primeira etapa foi desenhar as vistas anterior e posterior do coração de camundongo com os átrios, ventrículos e vasos da base.

Na segunda etapa foram utilizadas figuras de um atlas de camundongo da parte torácica e da cabeça do animal com as exposições do coração, traqueia e vasos da base, estendendo-se até a região da cabeça.

Um dos processos mais utilizados durante o processo da modelagem foi a extrusão, um processo utilizado para alongamento da modelagem, que pode ser baseado em pontos, faces ou arestas. Na maior parte dos casos, é assim que um cubo se alonga em uma modelagem baseada no *"Box modeling".* À medida que se aplica extrusões, sozinhas ou combinadas com operações de translação e/ou escala, a primitiva inicial sofre deformação e vai, cada vez mais, se aproximando do formato desejado pelo usuário. Para se realizar um processo de extrusão, basta selecionar os vértices desejados com o mouse e pressionar a tecla "E", que é uma tecla de atalho referente ao processo de extrusão. Nesse processo em especial, é altamente recomendada a utilização de uma das teclas de atalho que limitam a influência da operação sobre o eixo desejado "X", "Y" ou "Z", de modo que a extrusão não realize deslocamentos em eixos não desejados. A figura 7 demonstra a aplicação da aquisição de imagens com a utilização da extrusão.

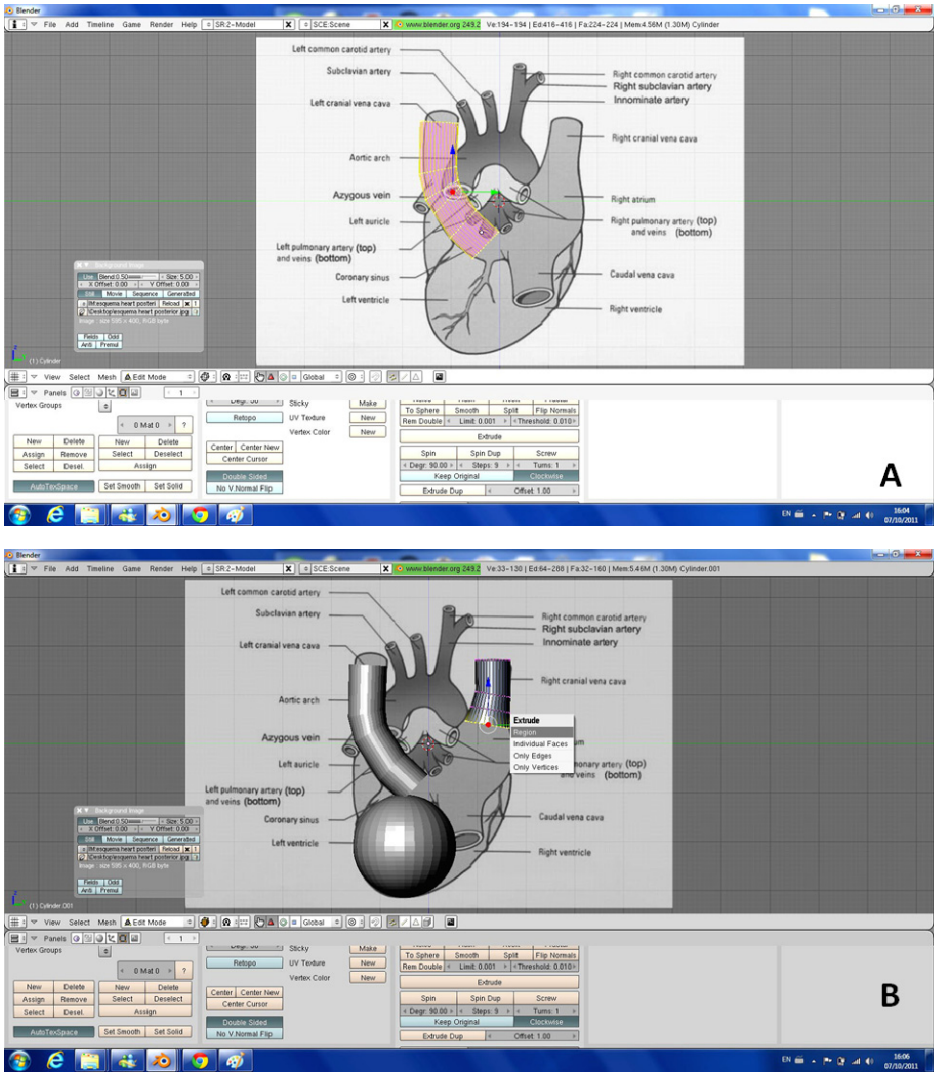


Figura 7 – Em (A) Modelo da primitiva inicial, sobre a imagem de referência utilizando a ferramenta extrusão; Em (B) Modelagem a ferramenta de extrusão, esfera para iniciar modelagem ventricular, e aplicação de textura sobre a veia cava superior esquerda, vista posterior.

Após aplicações de extrusões na imagem, a próxima etapa é a aplicação do arredondamento das mesmas, bem como, a suavização das superfícies sobre o modelo. Assim, no decorrer da modelagem, aplicaram-se vários processos de transformação geométrica sobre a primitiva inicial e, em seguida, utilizou-se a técnica de suavização de superfícies sobre o modelo. Desse modo, no final do processo, obtém uma malha tridimensional, com representação equivalente à imagem de referência utilizada. Todo esse processo foi desenvolvido em colaboração com o laboratório de Bioinformática do professor doutor **Leandro Garcia Guimarães** o qual desenvolveu a interface do programa.

Dessa forma, para facilitar a utilização do sistema, foram criados menus através da ferramenta *Blender Game Engine*, que expõem as funcionalidades do sistema para o usuário. O menu esta composto de botões que esboçam reações como som, aumento de escala, sobras iluminadas, e aparecimento de legendas a partir do momento em que o usuário movimenta o mouse sobre os mesmos. Essas reações ajudam o usuário a entender quais são as ações e funcionalidades correspondentes àquele ícone relativo a uma estrutura anatômica (Figura 8).

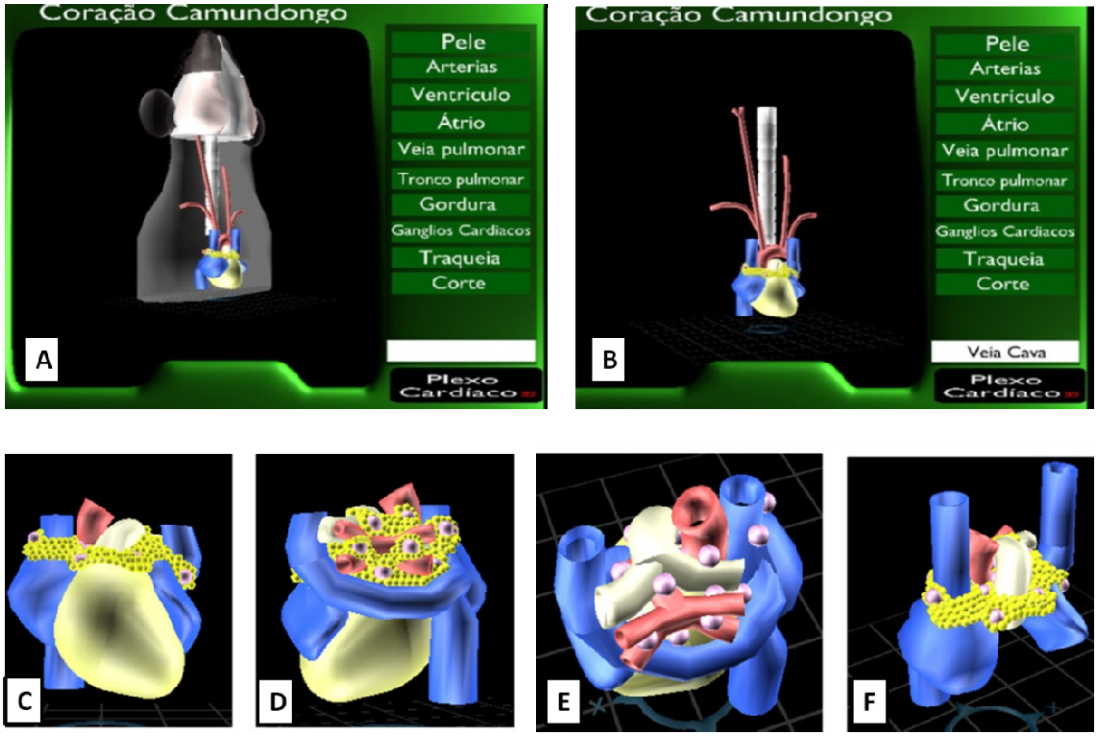


Figura 8 – Em **(A)** Representação da interface do Programa plexo cardíaco 3D com os menus e em posição topográfica no camundongo; Em **(B)** Representação da interface do Programa Plexo Cardíaco com o coração e vasos da base e os menus, do programa; Em **(C)** Vista ventral do coração com a presença de tecido adiposo e gânglios nos vasos da base; Em **(D)** Vista Dorsal do coração de camundongo com a presença de gânglios cardíacos imersos no tecido adiposo nas proximidades dos grandes vasos da base; Em **(E)** Vista superior do átrio de camundongo com o tecido adiposo removido indicando a disposição dos gânglios cardíacos; Em **(F)** Vista látero-lateral evidenciando a disposição do plexo cardíaco no átrio, os ventrículos foram removidos.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Níveis de Poluição

Durante o período de exposição, quatro amostras semanais foram obtidas para medir a concentração do $PM_{2,5}$ nas câmaras de exposição. A concentração média na câmara recebendo ar ambiente (não filtrada) foi de 27,5 $\mu g.cm^{-3}$ (CV=44%) e os valores foram similares à concentração medida no ambiente externo. Entretanto, o valor médio (6,5 $\mu g.cm^{-3}$; (CV=49%) foi significativamente menor na câmara recebendo ar filtrado ($p<0,001$), o que representa uma redução de 71% na concentração de $PM_{2,5}$. Os valores ambientais médios de NO_2, CO e SO_2 foram 101 $\mu g.cm^{-3}$ (CV=43%), 1,81 $\mu g.cm^{-3}$ (CV=50%) e 7,66% ppm (CV=64%), respectivamente.

A análise elementar realizada em 102 $PM_{2,5}$ filtros coletados no local da exposição entre os meses de Agosto/2005 e Maio/2007, permitiu identificar a composição deste material particulado (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise descritiva da composição elementar presente nas amostras de $PM_{2,5}$ através da Fluorescencia dispersiva de raio X. O carbono (C) foi utilizado como parâmetro para cálculo da composição elementar relativa dos demais elementos.

Elementos do $PM_{2,5}$	Média (SD) em $\mu g.g^{1}$	n
Massa	0,47 (0,03) mg	97
Al	5054 (668)	101
Ca	3271 (541)	102
Cu	238,6 (340)	102
Fe	3182 (620)	102
K	2720 (395)	102
Na	5540 (246)	91
Ni	40,68 (5,97)	102
P	1415 (184)	102
Pb	97,96 (23,8)	102
S	9837 (1021)	102
Si	3545 (406)	102
Ti	188,1 (42,6)	102
V	64,78 (9,06)	102
Zn	757,8 (110)	102
C	98,0 (0,30%)	102

5.2 Aspectos Morfológicos e Inervação do coração de camundongos

A análise macroscópica do coração de camundongos na posição anatômica no interior da cavidade torácica, na região do mediastino médio, permitiu verificar que, como acontece nos mamíferos em geral, a maior parte do órgão é formada pelos ventrículos. Relativamente aos vasos da base, nos espécimes injetados com Neoprene látex foi possível verificar a presença de três veias cavas, sendo duas craniais e uma caudal. As veias cavas craniais são denominadas de veia cava cranial direita (VCCD) e veia cava cranial esquerda (VCCE), e a veia cava caudal (VC) (Figuras 9 e 10).

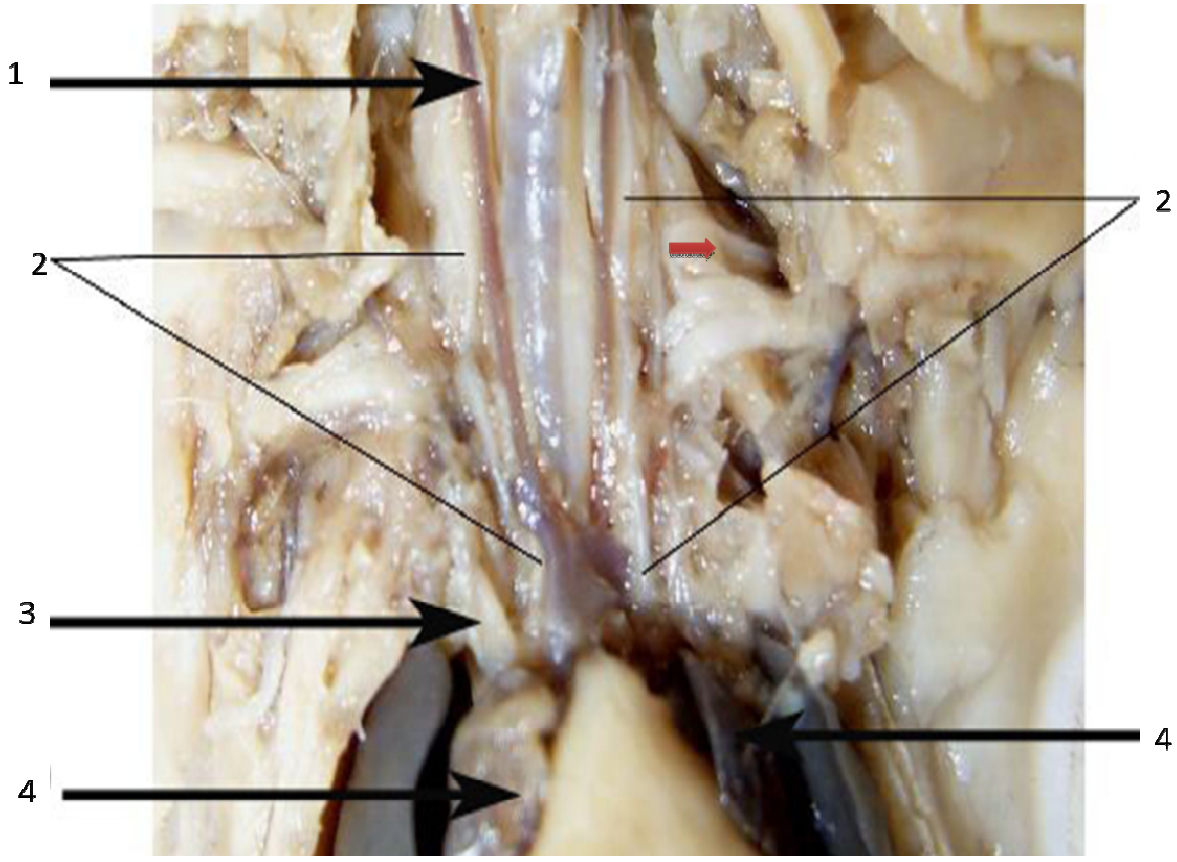


Figura 9- Fotografia do tórax de camundongo vista ventral com representação da inervação parassimpática do coração proveniente do nervo vago. A seta vermelha representa a inervação simpática proveniente da cadeia simpática a partir do gânglio cervical médio. Os números se referem a: 1) artéria carótida comum direita; 2) Nervo vago direito e esquerdo; 3) veia subclávia direita; 4) aurícula direita e aurícula esquerda.

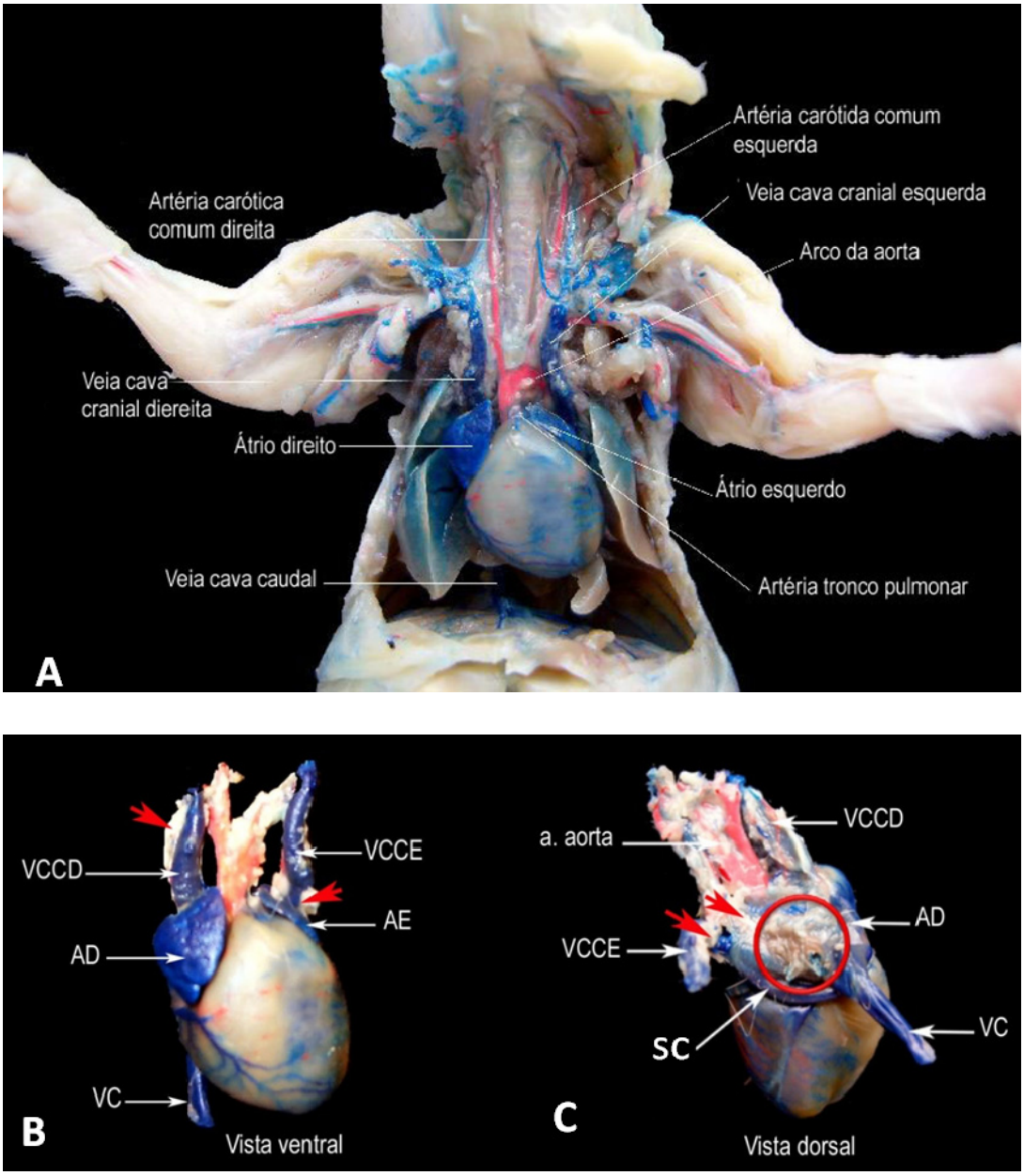


Figura 10 - **(A)** Vista ventral do coração de camundongo injetado com Látex "Neoprene" 450, para dissecação dos vasos da base. Os vasos em Vermelho evidenciam as artérias e, em azul as veias. Vista ventral do coração **(B)** e vista dorsal do coração **(C)** de camundongo injetado com Látex "Neoprene" 450. As fotografias realçam os vasos da base envoltos pela gordura epicárdica demonstrada pelas setas nas cores vermelhas. O círculo vermelho representa a localização das veias pulmonares. Nas fotografias verifica-se a artéria aorta (a.aorta), a veia cava cranial direita (VCCD), veia cava cranial esquerda (VCCE), veia cava caudal (VC), seio coronariano (SC) e o átrio direito (AD) e o átrio esquerdo (AE).

Através das dissecções verificou-se que a inervação respeita o padrão dos mamíferos, recebendo fibras simpáticas, e parassimpáticas provenientes do nervo vago (Figura 09). Com a reação da AChE verificou-se que a cadeia simpática descende a partir do gânglio cervical superior, lateralmente à a. carótida comum (AC). O gânglio cervical superior foi observado no ponto de bifurcação da AC, entre as aa. carótidas interna (ACI) e externa (ACE), enquanto que o gânglio cervical médio está localizado no nível de C2-C3. Já o gânglio cervical inferior não foi observado, mas parece estar fundido com o primeiro gânglio torácico para formar o gânglio estrelado. A inervação se difunde pelo tecido adiposo subepicárdico onde se encontra o plexo cardíaco, distribuído na superfície dos átrios entre os óstios dos vasos da base (a. aorta, a. tronco pulmonar, vv. cavas craniais direita e esquerda, v. cava caudal e vv. pulmonares) (figuras 11-12).

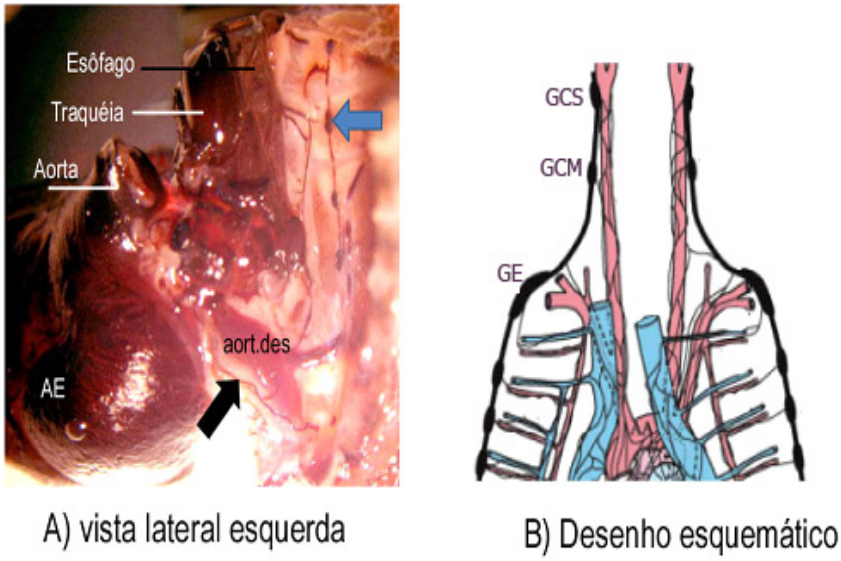


Figura 11 - A) Fotografia da vista lateral-posterior esquerda do coração de camundongo, em relação com a coluna vertebral, corado pela reação de AChE; a seta azul indica o componente simpático da inervação do coração proveniente da cadeia simpática; a seta preta mostra a inervação proveniente do nervo vago esquerdo passando abaixo do arco da aorta incluso no tecido adiposo (seta preta). B) O desenho esquemático representa a disposição dos gânglios simpáticos cervical superior (GCS), cervical médico (GCM) e gânglio estrelado (GE), o desenho esquemático é uma adaptação do artigo de TANAKA et al. (2007) para o *Suncus murinu*[21]*s*.

[21] Tanaka A, Tanaka S, Miyamoto K, Yi SQ, Nakatani T.Gross anatomical study of the sympathetic cardiac nerves in the house musk shrew (Suncus murinus). Anat Rec (Hoboken). 2007 May;290(5):468-76. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17393537

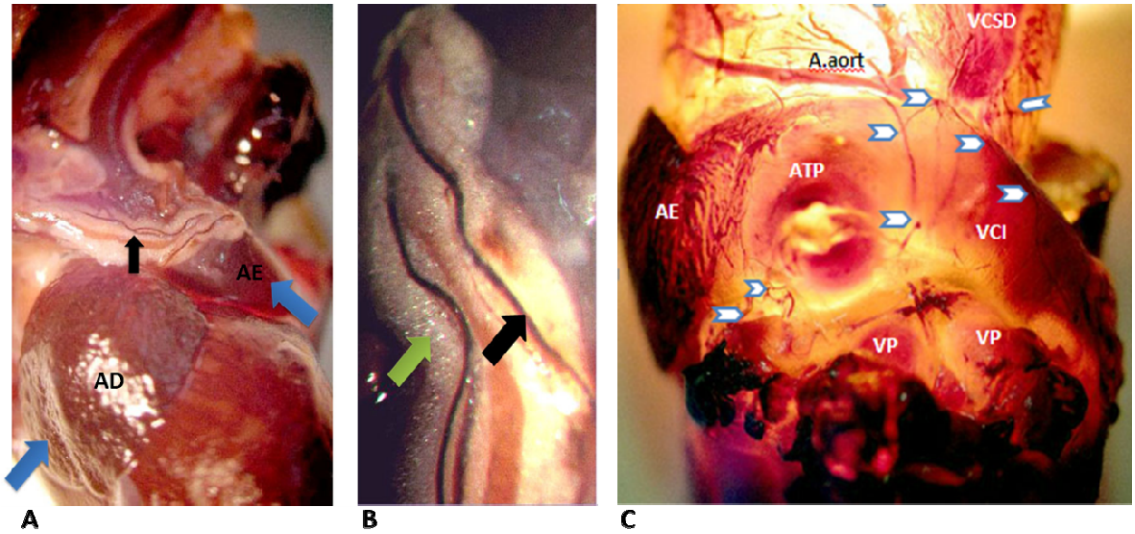


Figura 12 – Fotografias de Mapeamento do plexo cardíaco de camundongo corado com a técnica de acetilcolinesterase. **A)** Vista ventral do coração de camundongo, as setas azuis representam os átrios direito (AD) e o esquerdo (AE) (5x lupa). **B)** foto ampliada do coração em A, seta preta indica o ramo do nervo vago passando pelo tecido adiposo (seta verde (20x lupa)). **C)** - Fotografia do plexo cardíaco em vista dorsal corado por AChE, veias pulmonares (VP), aurícula esquerda (AE), veia cava cranial direita (VCCD), veia cava caudal (VCC) e artéria aorta (a.aort) (10x lupa). Os ramos neurais superficiais do plexo cardíaco são demonstrados por setas na superfície do átrio.

5.2.1 Localizações topográfica dos gânglios do plexo cardíaco

Nos cortes corados pelos métodos de Giemsa e NADH observou-se a presença de tecido adiposo unilocular (gordura branca) e multilocular (gordura marrom), e que os gânglios do plexo cardíaco estão imersos no tecido adiposo unilocular. A parte ventral do plexo cardíaco se a frente do arco da aorta e ventral à artéria tronco pulmonar direita, enquanto que a parte dorsal fica dorsal ao arco da aorta, e ventral à bifurcação da traquéia. A distribuição dos gânglios respeita os espaços entre os vasos, mas também são encontrados gânglios na gordura circunjacente à superfície atrial. Os gânglios e os neurônios encontrados em seu interior exibem diferentes tamanhos. Em todos os grupos, uma delgada cápsula de tecido conjuntivo foi verificada envolvendo o gânglio (Figuras 13 a 17).

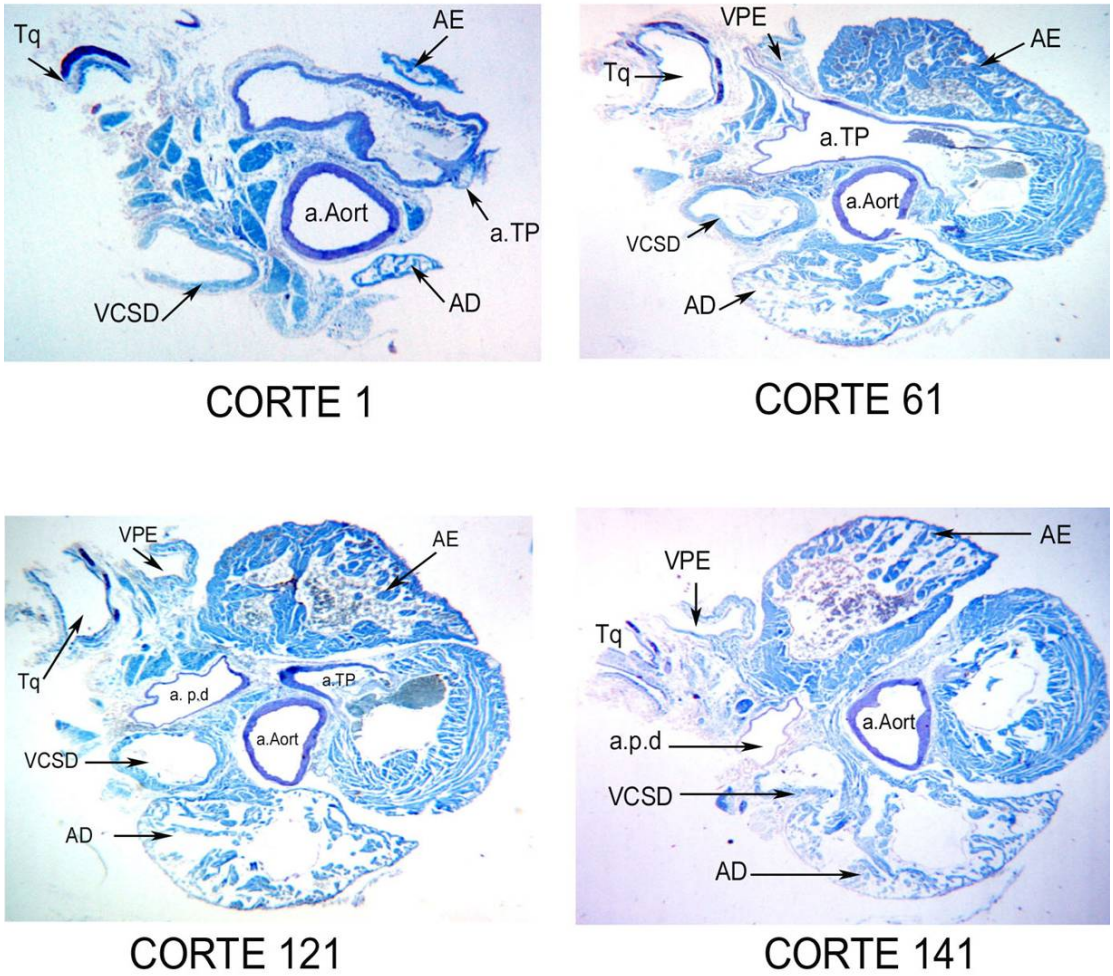
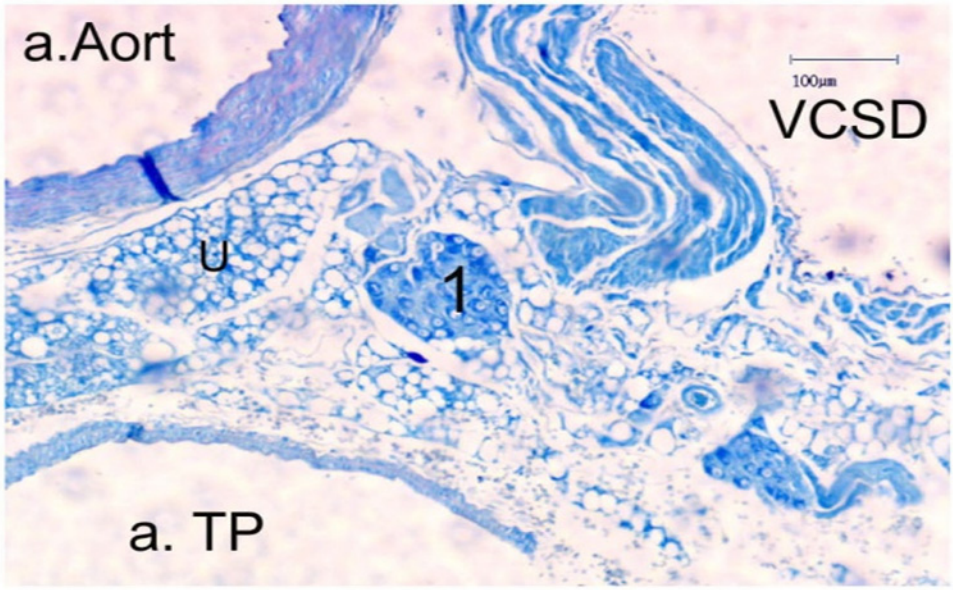
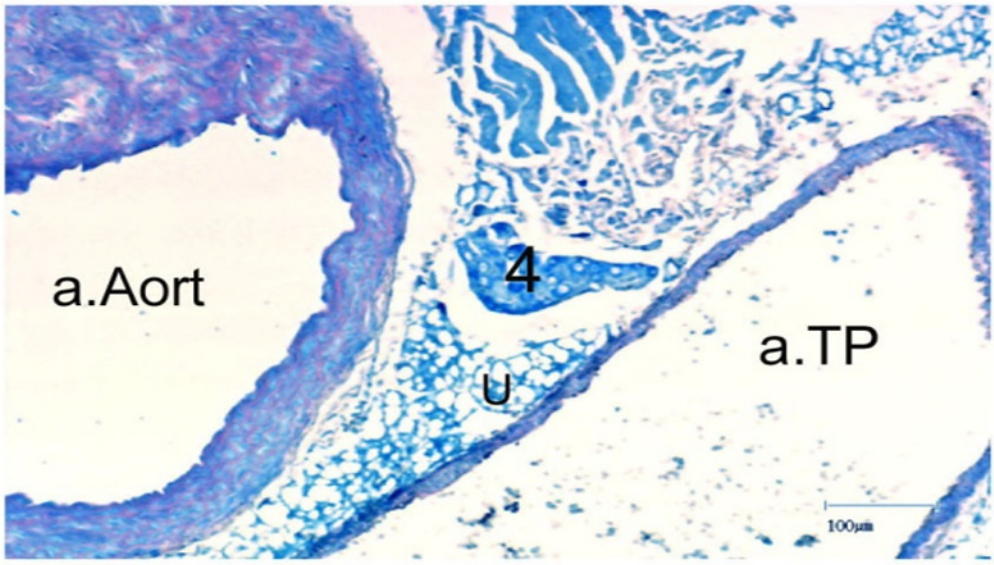


Figura 13 – Cortes transversais das regiões atriais do coração de camundongos do grupo da câmara de ar filtrado, corados pela técnica de Giemsa com aumento de 2,5x. Os cortes representa o procedimento estereológico utilizado para contagem dos gânglios cardíacos a fim de evitar a repetição de um mesmo gânglio, esse esquema também foi utilizado para mapeamento topográfico dos gânglios cardíacos entre os vasos da base.



A



B

Figura 14 - Demonstração topográfica dos cortes transversais de gânglios cardíaco de camundongo do grupo limpo localizado no átrio na região dos vasos da base corados com a técnica de Giemsa. **A)** representa a contagem do primeiro gânglio identificado (1)disposto no espaço entre os óstios da artéria aorta (a.Aort), veia cava superior direita (VCSD) e a artéria tronco pulmonar (a.TP) em aumento de 100x. **B)** Mesmo animal porem o número 4 representa o quarto gânglio localizado entre artéria aorta (a. Aort) e a artéria tronco pulmonar (a.TP), aumento de 100x. O tecido adiposo unilocular (U) e multilocular (M) é visível.

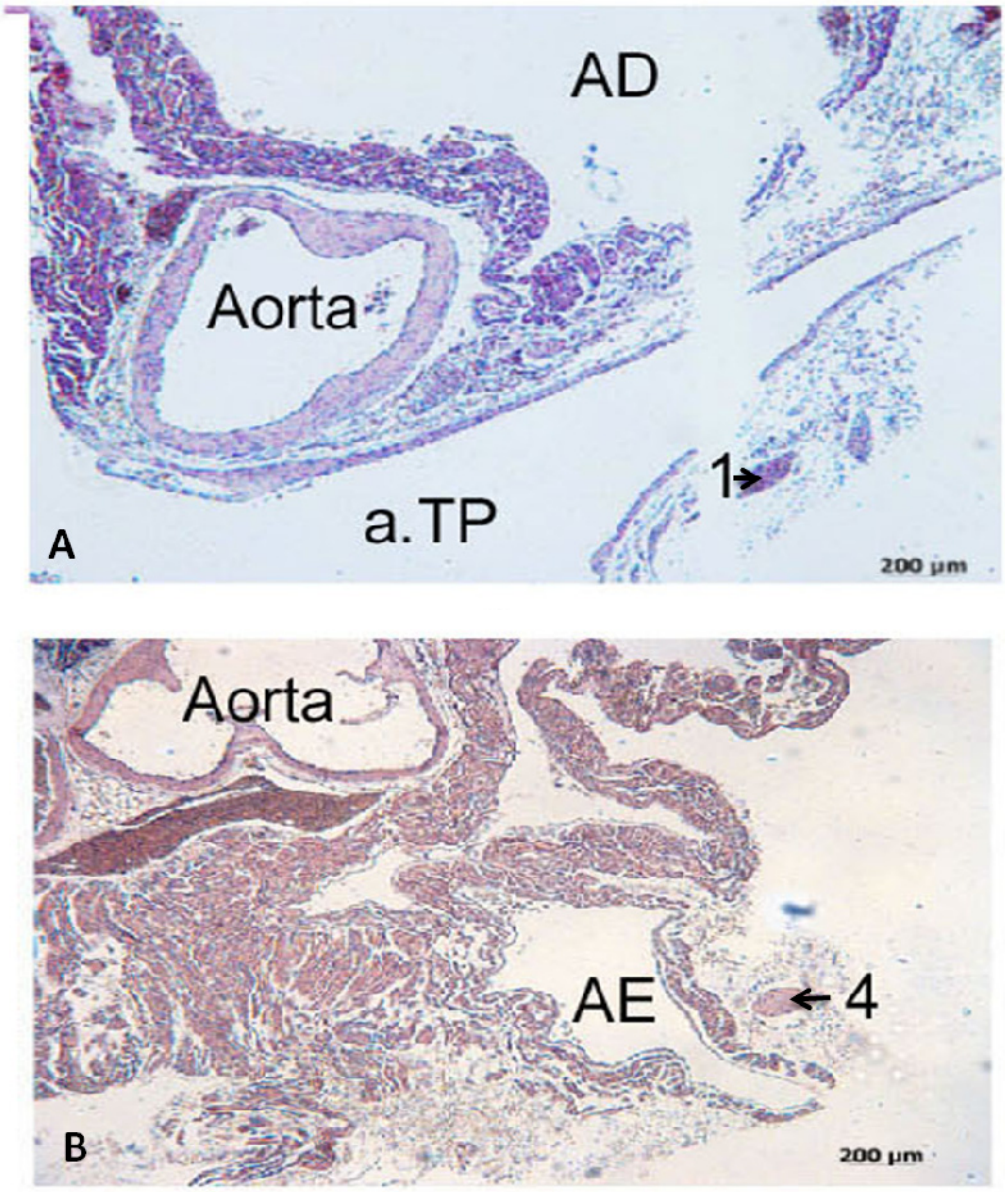


Figura 15 - Demonstração topográfica dos cortes transversais de gânglios cardíacos de animal limpo localizados no átrio dos vasos da base corados com NADH. A) Gânglio 1 disposto no espaço entre a bifurcação da artéria tronco pulmonar, aumento de 200x. D) Localização do quarto gânglio situado posterior ao átrio esquerdo (AE) aumento de 200x. Siglas: artéria tronco pulmonar (a.TP), átrio esquerdo (AE) e átrio direito (AD).

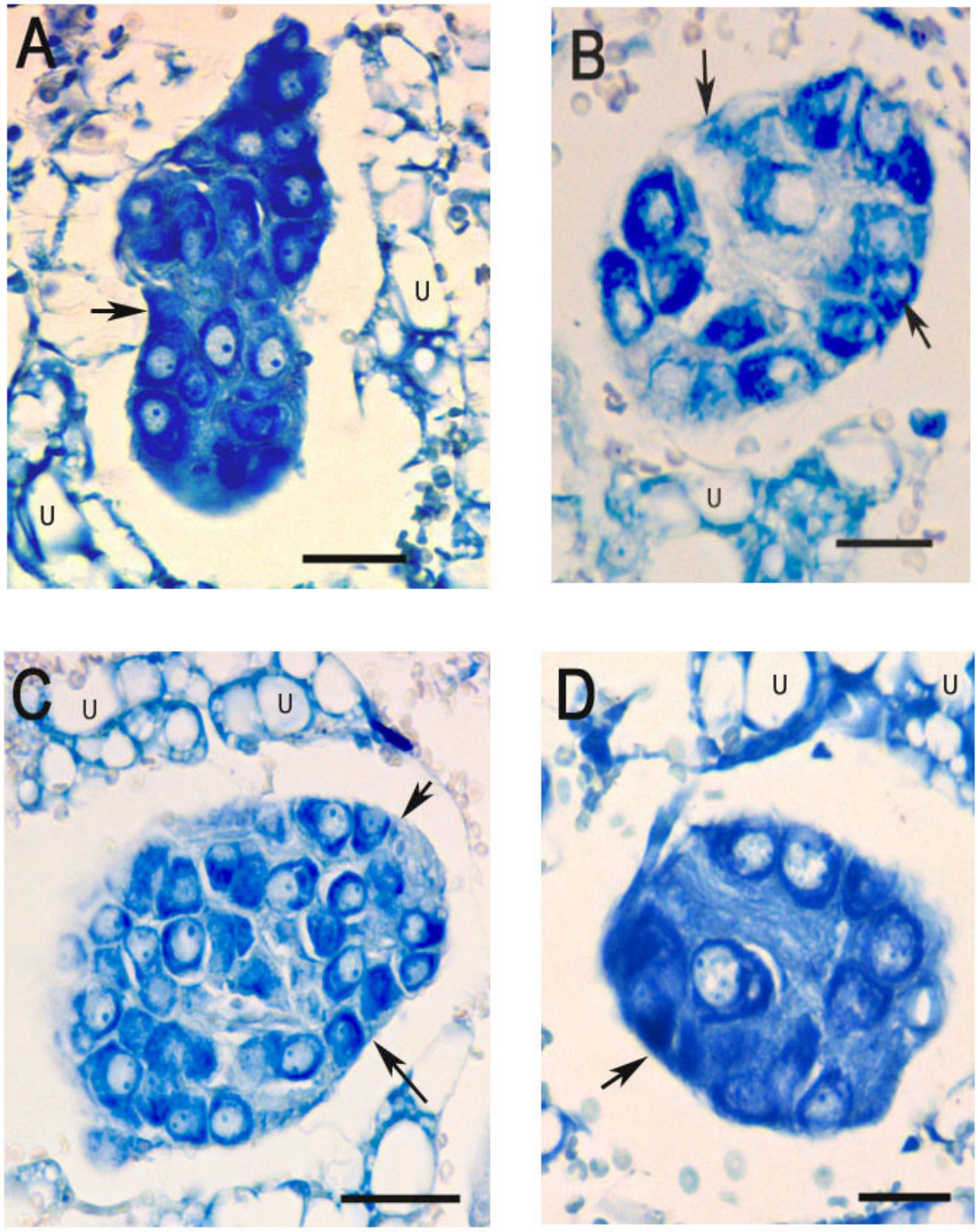


Figura 16 – Cortes de gânglios cardíacos de camundongos fêmeas dos grupos F-F (A), F-NF (B), NF-F (C), NF-NF (D), corados pela técnica de Giemsa. Notar o tecido adiposo unilocular (U) e cápsula de tecido conjuntivo (setas pretas). (Barra de calibração: 25µm).

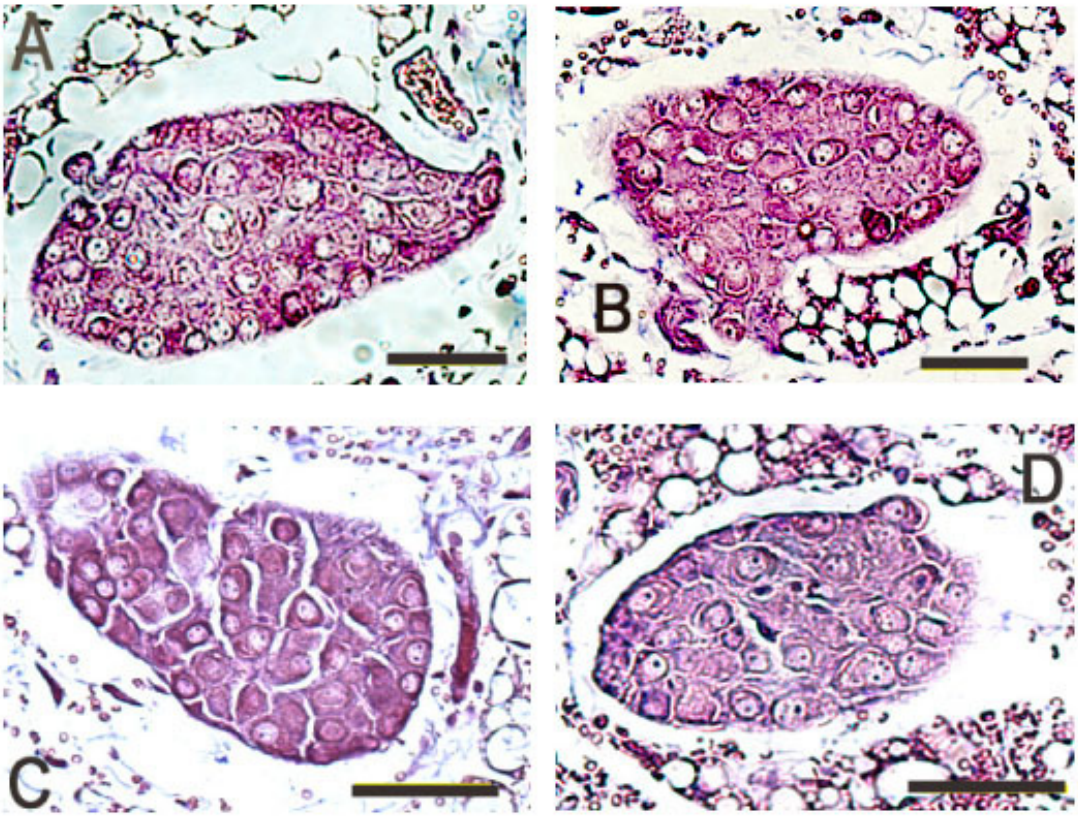


Figura 17- Cortes de gânglios cardíacos de camundongos fêmeas dos grupos F-F (A), F-NF (B), NF-F (C), NF-NF (D), corados pela técnica de NADH. Notar o tecido adiposo unilocular (U) e cápsula de tecido conjuntivo (setas pretas). (Barra de calibração: 20µm).

5.3 Tecido conjuntivo associado ao plexo cardíaco

Algumas características gerais do tecido conjuntivo foram evidenciadas pelos métodos do Picrosirius para fibras colágenas, e *da* Resorcina-fucsina *para fibras elásticas.*

Desta forma, de maneira geral, em todos os grupos estudados, os gânglios *do* plexo cardíaco encontram-se envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo, aparentemente mais espessa nos animais do grupo FF, de onde se destacam delgadas lâminas para o interior do gânglio, onde irão envolver os neurônios individualmente ou em grupos. Tal disposição pode ser aplicada, tanto para as fibras colágenas, como para as fibras elásticas (Figura 18,19 e 20).

Nos cortes corados com Picrosirius e analisados sob luz polarizada, o contorno dos gânglios, região correspondente à cápsula ganglionar apresentou uma distribuição de fibras do tipo I (de coloração amarela, laranja ou vermelha) e do tipo III (na cor verde) de maneira indistinta, não permitindo inferir em qual grupo ocorreu o predomínio de algum tipo de fibra. Todavia, chama a atenção o fato de as fibras colágenas do tipo I predominar no interior dos gânglios dos animais FF e, de maneira totalmente oposta, serem encontradas no interior dos gânglios dos animais NF-NF, somente fibras colágenas do tipo III (Figura 19 e 20).

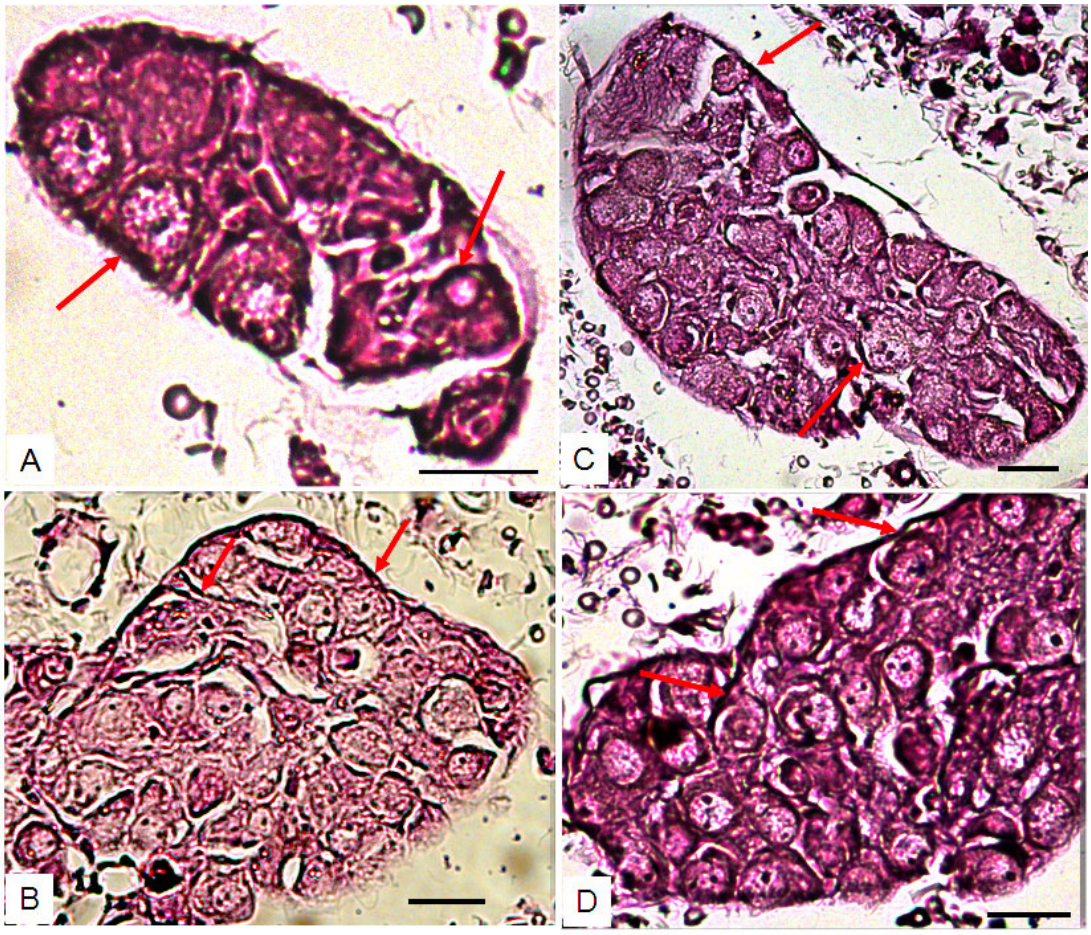


Figura 18 – Corte transversal de gânglio cardíaco dos grupos FF (A), F-NF (B), NF-F (C) e NF-NF (D). Notar, a presença de fibras elásticas (setas) tanto na cápsula como no interior dos gânglios, envolvendo os neurônios. (Resorcina-fucsina.. Barra de calibração: 20µm).

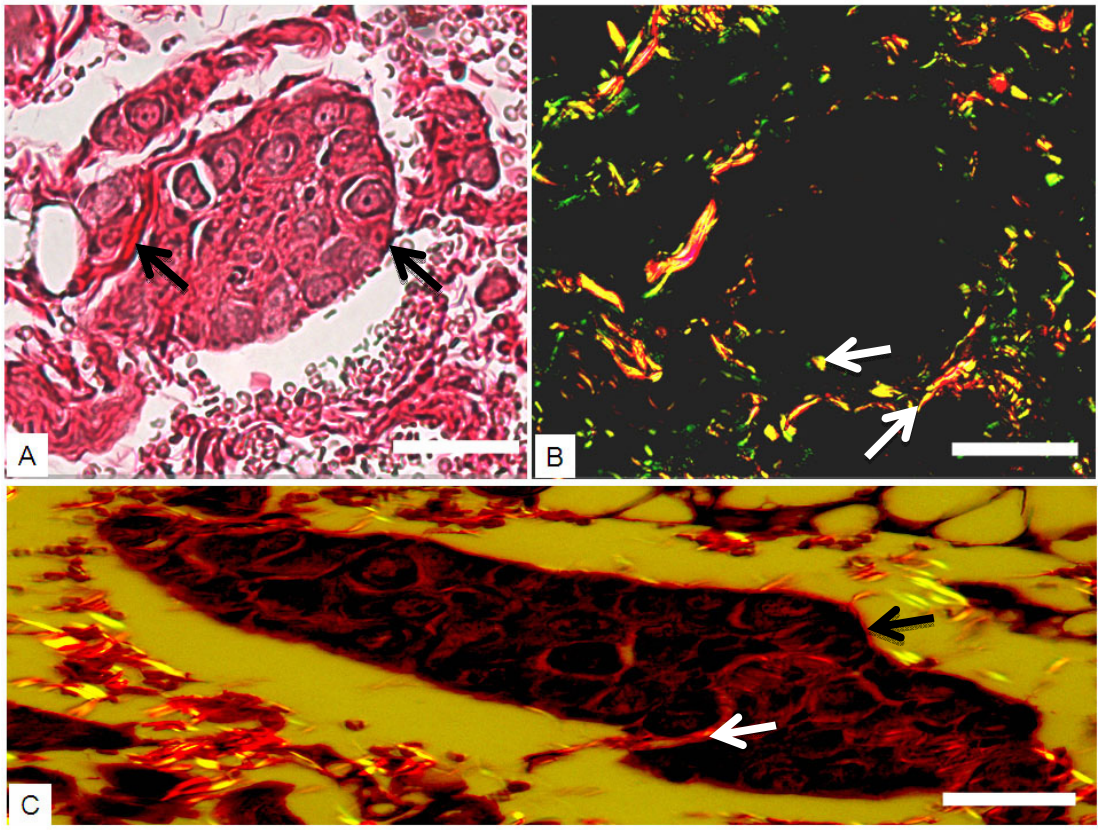


Figura 19 – Cortes transversais de gânglios cardíacos corados com Picrosirius, A- Visualização sem luz polarizada, onde se observa a presença de fibras colágenas formando uma cápsula delgada, no interior do gânglio, envolvendo os neurônios (setas). B- O mesmo gânglio, analisado sob luz polarizada, com fibras colágenas dos tipos I.(amarelo, laranja e vermelho) e III (verde) distribuídas ao redor e no interior do mesmo (setas). C- Gânglio de animal do grupo FF, onde é nítida a presença de fibras colágenas do tipo I na cápsula ganglionar e no interior do gânglio, envolvendo os neurônios (setas). (Barra de calibração: 50µm).

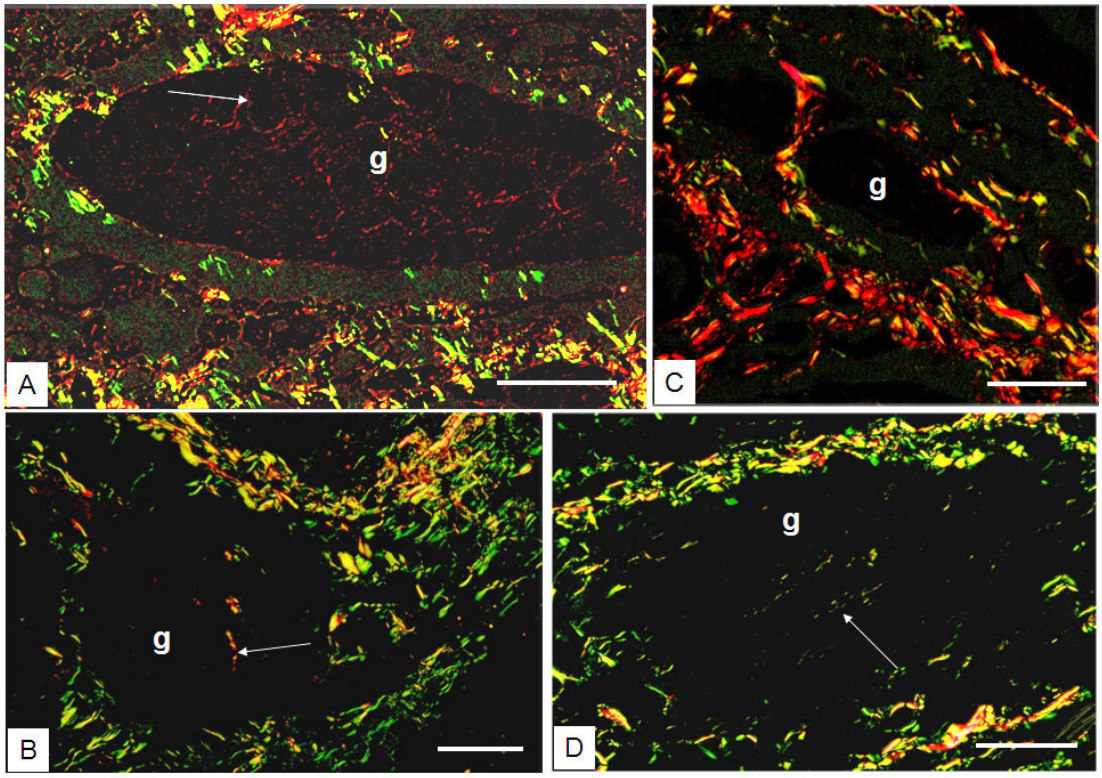


Figura 20 – Fotomicrografias de corte transversal de gânglio cardíaco (g) dos grupos FF (A); F-NF (B); NF-F (C) e NF-NF (D). Em linhas gerais, todos os grupos exibem uma distribuição equitativa de fibras colágenas dos tipos I e III ao redor dos gânglios, bem como na constituição da cápsula ganglionar. A principal diferença é notada no interior dos gânglios onde, em um extremo (grupo FF) predominam as fibras do tipo I e no outro (grupo NF-NF) há o nítido predomínio das fibras do tipo III. (Picrosirius sob luz polarizada. (Barra de calibração: 50µm).

5.4 Aspectos Quantitativos

5.4.1 Peso corporal dos animais e peso do coração

As médias (± Desvio Padrão) do peso corporal, peso do coração (g) e a relação entre peso corporal e peso do coração dos animais dos grupos estudados estão expressas na tabela 2.

Tabela 2 – Resultados da Média e Desvio padrão (DP) do valor referente aos parâmetros peso corporal (g), peso do coração (g) e a razão entre ambos nos grupos F-F. F-NF, NF-F e NF-NF.

Desfecho	Exposição Gestacional	Exposição pós natal	Média	Desvio Padrão	N	*p*
Peso (g)	F	F	25,010	1,128	5	0,03
		NF	21,943	1,374	4	
	NF	F	23,036	2,224	5	
		NF	22,028	1,351	5	
Peso do coração (g)	F	F	0,103	0,007	5	ns
		NF	0,102	0,009	4	
	NF	F	0,102	0,014	5	
		NF	0,099	0,011	5	
Razão Peso coração/Peso Corporal	F	F	0,0041	0,0004	5	ns
		NF	0,0047	0,0004	4	
	NF	F	0,0044	0,0003	5	
		NF	0,0045	0,0003	5	

F= filtrada; NF= não filtrada; ns= não significativo

A análise estatística apresentada na Tabela 2 demonstra que existe diferença significativa para o parâmetro peso corporal entre os quatro grupos ($p < 0,03$). Verifica-se que comparar as médias dos grupos F-NF e NF-NF com o grupo F-F ocorre uma tendência na diminuição do peso corpóreo dos animais expostos à poluição no período pós-natal ($p < 0,01$) Além da variação significativa do peso

corporal, nota-se um efeito de interação estatisticamente significativo para os animais que foram submetidos à exposição pós-natal, pois ao retirar os animais de um ambiente filtrado para um não filtrado a média do peso corporal foi afetada. Com a exposição gestacional o efeito foi o oposto, nada muda praticamente.

5.4.2 Volume total do coração e dos átrios

Na tabela 3 estão expressos os dados relativos ao volume do coração, volume do átrio direito (V_{AD}), Volume do átrio esquerdo (V_{AE}), Volume absoluto dos átrios (V_{AT}).

Tabela 3 – Resultados da Média e Desvio padrão (DP) do valor referente aos parâmetros volume do átrio direito (VAD), Volume do átrio esquerdo (VAE), Volume absoluto dos átrios (VAT) e Volume total do coração (cm³) e a razão entre ambos nos grupos F-F. F-NF, NF-F e NF-NF.

Desfecho	Exposição Gestacional	Exposição pos natal	Média	Desvio Padrão	N	*p*
Volume total do coração (cm³)	F	F	0,098	0,006	5	ns
		NF	0,096	0,009	4	
	NF	F	0,096	0,013	5	
		NF	0,093	0,011	5	
V_{AD}	F	F	1,17	0,38	5	ns
		NF	1,18	0,32	4	
	NF	F	1,22	0,82	5	
		NF	1,34	0,22	5	
V_{AE}	F	F	0,53	0,20	5	ns
		NF	0,44	0,33	4	
	NF	F	0,80	0,43	5	
		NF	0,94	0,51	5	
V_{AT}	F	F	1,70	0,22	5	ns
		NF	1,62	0,52	4	
	NF	F	2,02	1,21	5	
		NF	2,27	0,60	5	

F= filtrada; NF= não filtrada; ns= não significativo

A análise permitiu verificar, em todos os grupos, que o volume do coração, bem como dos átrios não sofre influencia da exposição à poluição do ar (Vcor = p>0,822).

5.4.3 **Volume ganglionar e número de gânglios no** plexo cardíaco

Os resultados relativos à análise estereológica dos **gânglios** (número total – NT_G, volume médio – VM_G em um³, e volume total – VT_G em um³), e a Razão Vol ganglionar/Vol cardíaco) são observados na tabela 4.

Tabela 4 – Médias e desvios padrões das variáveis estereológicas referentes ao volume total de gânglios (VT_G um³), número total de gânglios (NT_G), Volume médio de gânglios (VM_G (um³)) e a razão entre volume ganglionar e volume cardíaco nos grupos F-F, F-NF, NF-F e NF-N.

Desfecho	Exposição Gestacional	Exposição pos natal	Média	Desvio Padrão	N	*p*
VT_G (µm³)	F	F	12690000,0	5387412,4	5	0,02
		NF	5647500,0	3555907,1	4	
	NF	F	7290000,0	2932432,9	5	
		NF	8550000,0	2039586,4	5	
NT_G	F	F	12,8	5,7	5	0,01
		NF	13,8	1,5	4	
	NF	F	20,0	6,2	5	
		NF	19,8	3,6	5	
VM_G (um³)	F	F	1192024,5	707673,5	5	0,03
		NF	478312,5	216773,1	4	
	NF	F	364471,8	79392,2	5	
		NF	431885,7	60658,4	5	
Razão VT_G/Volume Cardíaco	F	F	0,0013	0,0006	5	0,02
		NF	0,0006	0,0004	4	
	NF	F	0,0007	0,0002	5	
		NF	0,0009	0,0003	5	

F= filtrada; NF= não filtrada

Para os diferentes parâmetros relacionados aos gânglios verificou-se ocorrências de diferenças estatísticas significativas entre os grupos ($p<0,01$).

Assim, o número total de gânglios do plexo cardíaco do grupo N F-F foi maior do que o observado para o grupo F-NF; do mesmo modo, ao se comparar os grupos NF-NF e F-NF, notou-se um maior número de gânglios nos animais poluídos. Quando se comparou o grupo F-F com os grupos F-NF e NF-F, notou-se que os animais do grupo limpo exibiram volume total de gânglios maior ($p<0,02$); da mesma forma, esses animais (F-F) apresentaram um volume médio de gânglios maior do que aquele verificado para os grupos NF-F e NF-NF ($p<0,03$). Ao se analisar os gráficos de interação da EMM em relação a Exp_G e a Exp_N verificou-se que existe interação significativa entre as variáveis conforme observado nas figuras 21, 22, 23, 24.

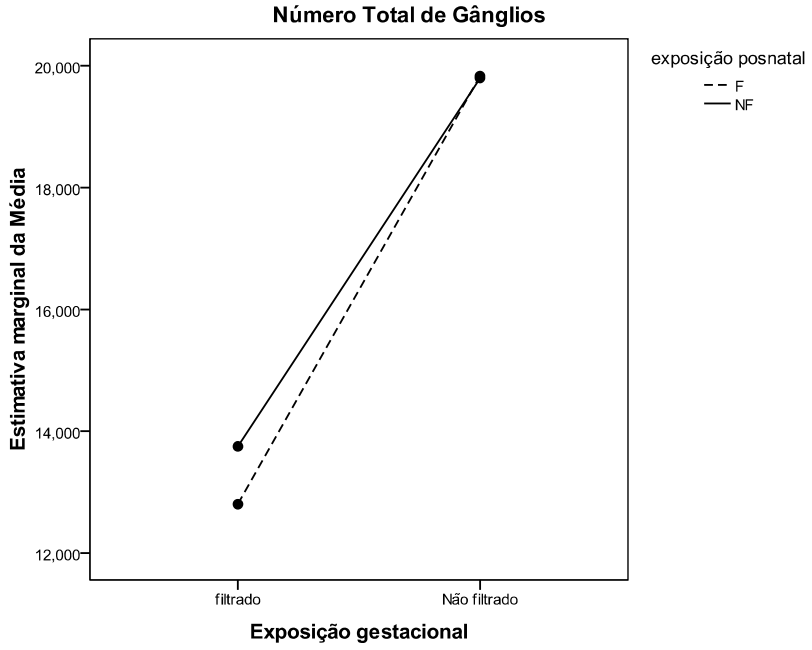


Figura 21 – Gráfico da estimativa da média marginal do número total de gânglios referente à interação entre exposição pós-natal e exposição gestacional nos grupos F-F, F-NF, NF-F e NF-NF. Observa-se a relação das variáveis da Exposição gestacional e exposição pós-gestacional.

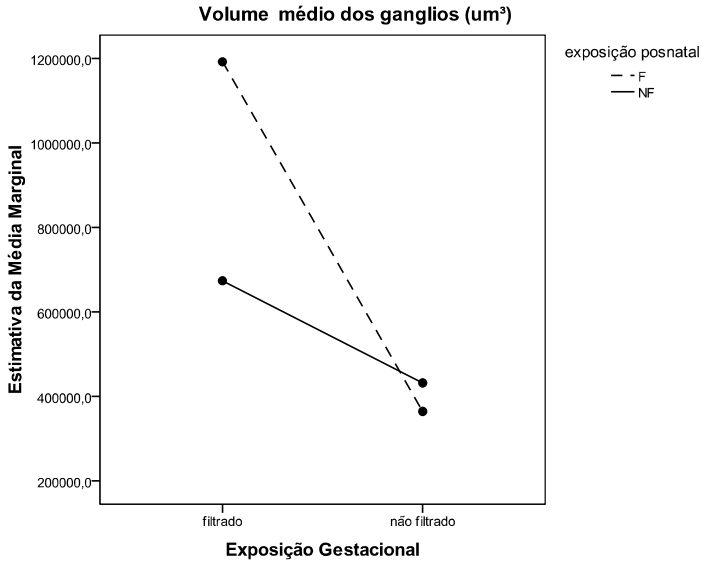


Figura 22 - Gráfico da estimativa da média marginal da relação do volume médio de gânglios referente à interação entre a exposição gestacional e a pós-gestancional, nos grupos filtrado e não filtrado.

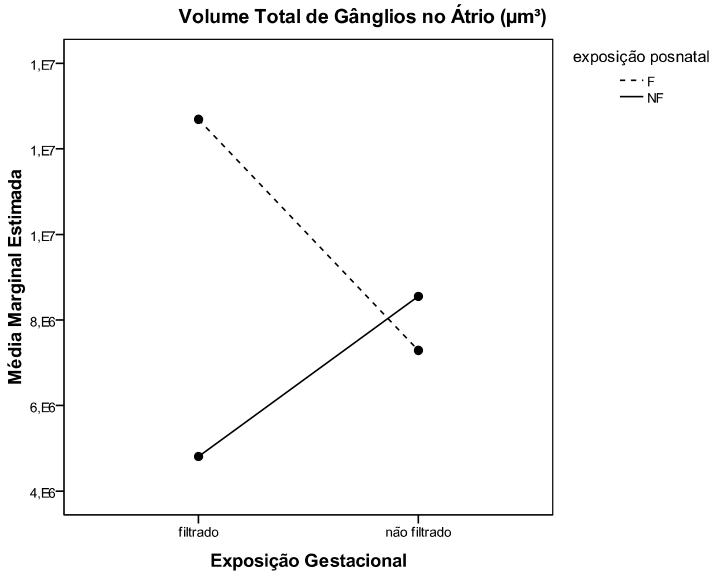


Figura 23 - Gráfico da estimativa da média marginal da relação do volume total de gânglios referente à interação entre a exposição gestacional e pós-gestacional, nos grupos filtrado e não filtrado.

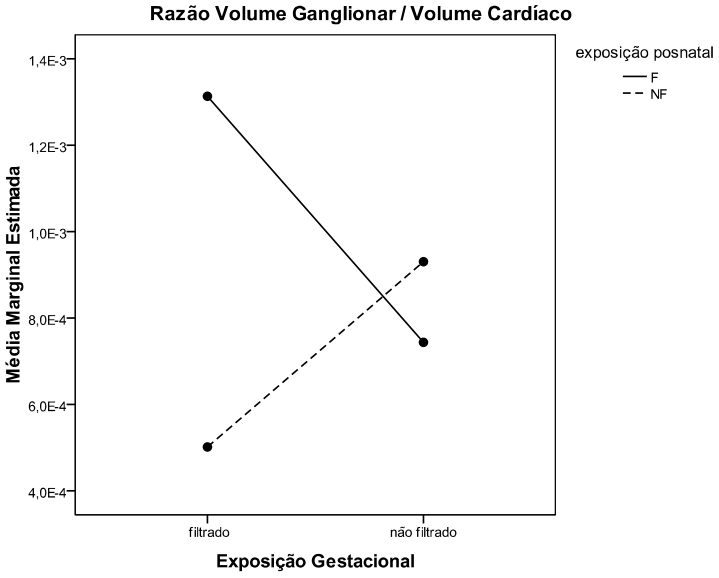


Figura 24 - Gráfico da estimativa da média marginal da razão do volume dos gânglios e o volume do coração, referente à interação entre a exposição gestacional e pós-gestacional, nos grupos nos grupos filtrado e não filtrado.

Na tabela 5 estão expressos os resultados relativos à análise estereológica dos **neurônios** constituintes dos gânglios do plexo cardíaco.

Tabela 5 - Médias e s padrões das variáveis estereológicas para o Número Total de Neurônios (N_{NEU}) e Volume Médio dos Neurônios (VM_N) μm^3 do plexo cardíaco reativos a Giemsa e para o Volume médio dos neurôrios reativos a NADH ($VM_{N\ NADH\ +}$ (um^3)).

Grupos	$N_{NEU\ Giemsa}$	$VM_{N\ Giemsa}$ (um^3)	$VM_{N\ NADH\ +}$ (um^3)
F-F	4611,32± 2179,15	2800,39± 464,85	2239,48 ± 126,50
F-NF	2923,89± 561,97	2085,40± 762,33	2487,07 ± 290,95
NF-F	3467,41± 867,51	2072,04± 389,97	2793,86 ± 647,40
NF-NF	4555,17± 1349,39	1906,94± 182,30	2376,07 ± 471,15

Com relação ao número total de neurônios do plexo cardíaco marcados com Giemsa, não verificamos diferenças significativas entre os grupos (p>0,01), o mesmo não pode se aplicar para as reações com NADH, pois a metodologia aplicada não

possibilitou a contagem de neurônios totais reativos a NADH. Todavia, ao se comparar as reações entre si, notou-se que o **VM_N** de neurônios evidenciados pelo método de Giemsa foi estatisticamente significativo ($p>0,01$) ao detectado pelo método da NADH, em todos os grupos avaliados, verificar gráfico de *Box plot* figura 25.

O volume neuronal (**VM_N**) do grupo F-F apresentou-se maior do que aqueles observado para os demais grupos (F-NF, NF-F, NF-NF), esse fator foi significativo quando analisamos o gráfico de interação das variáveis Exp_G e Exp_N ($p<0,33$). Verificou-se com a representação gráfica na figura 26 que a exposição gestacional exerce influencia no desenvolvimento do **VM_N de neurônios corados com Giemsa.**

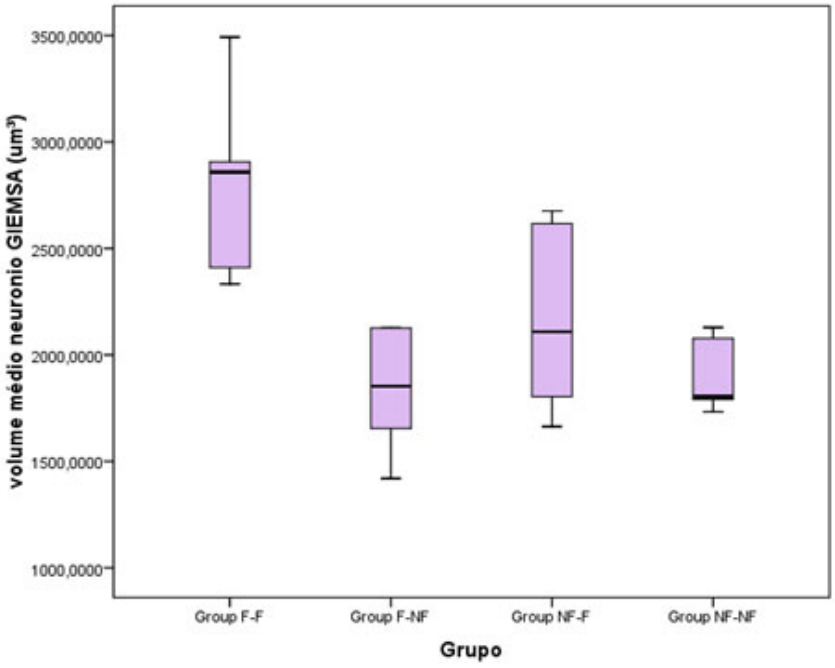


Figura 25 - Gráfico *Boxplot* referente às médias de análises estereológicas do volume médio dos neurônios cardíacos corados com Giemsa.

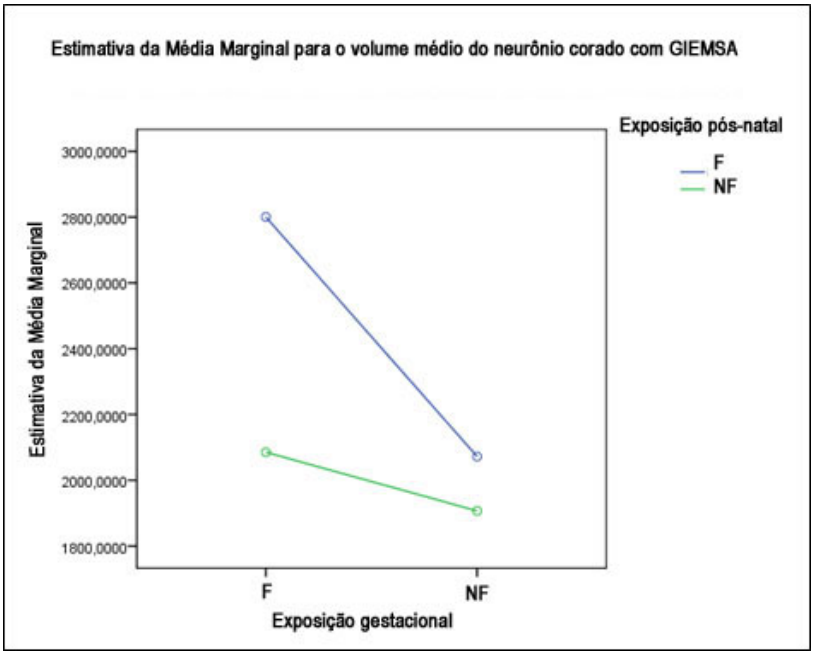


Figura 26 - Gráfico da estimativa marginal da média em relação ao volume médio dos neurônios corados com Giemsa. Verifica-se que a interação significativa entre as variáveis foi de p<0,05, a maior interação significativa ocorre na exposição gestacional.

5.5 Morfometria

Na análise comparativa da **área seccional** verificou-se que os grupos F-F, F-NF, NF-F e NF-NF não apresentam diferenças estatísticas significativa entre si (P>0,08). Entretanto, os resultados para as variáveis morfométricas do **perímetro** diferem significativamente (P<0,01) quando se compara o grupo F-F com os demais grupos (F-NF, NF-F, NF-NF), ou seja, esse parâmetro é maior nos animais filtrados (Tabela 6). Verifica-se que ocorre interação significativa no geral com p< 0,01. Ao analisarmos as variáveis ExpG (p<0,036) e ExpN (p<0,023) ocorre interação significativa em ambos os casos. Com relação ao **diâmetro** (comprimento – Fmax - e largura – FMin - do neurônio), observou-se um efeito grupo (p<0,05), em que o diâmetro do soma dos neurônios do grupo exposto na câmara de ar poluída é significativamente mentor do que na câmara filtrada (Tabela 6). Verificamos também que a fase pós-natal exerce influencia no diâmetro do soma neuronal (p<0,016). O diâmetro dos neurônios corados com NADH-d não apresentam diferenças estatisticamente significativas (p>0,2).

Tabela 6 - Médias e desvios padrões relacionado as análises morfológicas da Área Seccional (um²) e Perímetro (um) do neurônio para os grupos F-F, F-NF, NF-F e NF-NF.

Grupos	**Área Seccional** (um²)**± DP**	**Perímetro** (um)**± SD**	**Diâmetro**	
			FMax	FMin
F-F	146,3082 ± 29,7013	46,95 ±4,33	15,80±0,84	10,80±0,84
F-NF	118,6213 ± 34,8607	40,06 ± 4,93	14,20±1,64	9,60±1,14
NF-F	117,56 ± 16,32	40,43 ± 2,52	14,50±1,05	10,00±0,89
NF-NF	108,02 ± 6,27	39,22 ± 1,27	13,80±0,45	9,40±0,55

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Peso Corporal (g) e peso do coração (g) dos animais

As consequências de uma exposição gestacional à poluição atmosférica urbana sobre o desenvolvimento fetal ainda é assunto desconhecido. Estudos epidemiológicos e experimentais em relação a essa temática revelaram, entre as diversas alterações que ocorrem na fase pós-natal, o baixo peso ao nascer (Wang et al., 1997; Dejmek et al.,1999, Darrow et al., 2011)

Akinaga et al. (2009), cujas avaliações relativas ao peso corporal em camundongos expostos a poluição do ar, verificaram que entre os grupos controle e expostos não houve diferença significativa, observaram que, para o peso dos corações, não ocorreram diferenças entre os grupos. Esses dados foram parcialmente confirmados por Lushnikova et al. (1999) pois, ao analisarem ratos expostos a vários níveis de poluentes, verificaram semelhanças de peso no peso do coração e também no corpo dos animais normais e expostos.

Os dados da presente pesquisa confirmam aqueles dos autores acima citados, no que se refere ao peso do coração, uma vez que a exposição à poluição do ar antes e durante a gestação, não teve efeitos sobre o peso do coração em todos os grupos (filtrados e não filtrados). Todavia, relativamente ao peso corpóreo, foi aqui demonstrado que o peso médio corporal apresentou-se significativamente menor nos animais que cresceram em ambiente poluído, cujos pais (G2) também haviam respirado ar carregado de partículas durante toda a vida. Tais divergências podem estar relacionadas com as metodologias empregadas, uma vez que esses autores utilizaram apenas a primeira geração (G1) de camundongos.

Veras et al. (2008) ao estudarem em camundongos da segunda geração, a associação da poluição do ar com o peso ao nascer, descreveram que a poluição durante a fase gestacional pode interferir no ganho de peso do feto ao longo do seu desenvolvimento. Embora, não se tenha avaliado na presente pesquisa, o peso dos animais de G3 ao nascimento, pode-se inferir que, mesmo que seus ancestrais de

G2 tenham sido mantidos em um ambiente filtrado, o peso corporal de seus descendentes não se recupera, permanecendo na fase adulta, o que foi aqui confirmado.

Morfometria dos gânglios e neurônios cardíacos

Os efeitos da exposição à poluição do ar aguda e crônica sobre o sistema cardiovascular são conhecidos, podendo manifestar-se por Angina pectoris (Hosseinpoor et al., 2005), arritmia cardíaca (Santos et al., 2008; Tsai et al., 2009; Link e Dockery, 2010), diminuição da variabilidade da freqüência cardíaca (Tsuji et al., 1996; Hampel et al., 2011), infarto do miocárdio (Wellenius et al., 2002), aceleração no processo de aterosclerose (Künzli et al.,2010) e acidentes vasculares cerebrais (Gregory et al., 2012).

Como se admite que o plexo cardíaco participe ativamente da regulação da função cardíaca, mantendo um circuito reflexo neural (Cheng et al., 1997; Batulevicius et al., 2003), não se pode deixar de correlacionar tais disfunções, com as possíveis alterações que diferentes fatores extínsecos possam vir a produzir em seus componentes estruturais.

Os resultados demonstraram que a manipulação na fase pós-natal realizada diariamente, durante os 120 dias de vida, induziu à redução do diâmetro do soma neuronal nos grupos expostos na câmara não filtrada. A avaliação dos diâmetros máximo e mínimo de Feret do soma dos neurônios nos diferentes grupos foi utilizada a fim de se verificar a ocorrência de um aumento compensatório nos corpos neuronais, o que pode resultar em um aumento na excitabilidade cardíaca. Assim, os dados demonstraram que o soma dos neurônios do grupo exposto, foi significativamente menor do que os do grupo não exposto à poluição. Tal achado permite admitir uma influencia na condução do potencial elétrico dos neurônios cardíacos, uma vez que eles também exibiram diminuição quanto ao diâmetro, que, quanto maior, mais rápido atua na condução do impulso nervoso. De acordo com a classificação de Sommer et al. (1985) os neurônios dos grupos expostos (F-NF e NF-NF) exibiram, em média, um diâmetro menor que 20µm, tendo sido classificados

como do tipo C, com fibras amielínicas que normalmente conduzem velocidades de 2m/s ou menos. Sua ação é diferente daqueles neurônios com fibras mielínicas, cuja velocidade de condução pode atingir até 50m/s. Como segundo Linden (1973) os neurônios do tipo C são encontrados na região atrial e, de acordo com Coleridge e Coleridge (1977), alguns deles localizam-se na região da aorta e veia pulmonar, pode-se admitir que o predomínio de neurônios do tipo C nos animais expostos à poluição do ar representa um fator que efetivamente influencia no controle cardíaco, podendo causar arritmias, conforme previamente descrito em alguns trabalhos.

Estereologia

Número de Gânglios Cardíacos

A situação dos gânglios do plexo cardíaco de camundongos no tecido adiposo subepicárdico respeita o descrito para outros mamíferos, como o rato, o porco, o cão a ovelha e o homem (Davies et al., 1952; King e Coakley, 1958; Yuan et al., 1994; Armour et al., 1997, Hopkins, 2000; Batulevicius et al., 2003, Saburkina, 2010; Rysevaite et al., 2011). Na presente pesquisa foi possível detectar dois tipos de tecido adiposo na região subepicárdica, sendo o unilocular amplamente difundido e o multilocular, formando grupamentos isolados. Desta forma, verificou-se que, pelo menos em camundongos, os gânglios do plexo cardíaco eram encontrados sempre imersos na gordura unilocular. A localização dos gânglios do plexo cardíaco dos camundongos do presente estudo em regiões específicas do átrio relacionadas aos vasos da base estão de acordo com as observações de autores como De Sousa et al. (1996) no rato; Pauza et al. (2000) no homem; Maifrino et al. (2006) no camundongo.

Quando se avalia, na literatura, a disposição dos gânglios do plexo cardíaco, observa-se que uma série de trabalhos faz referência à sua distribuição sem, contudo, realizarem mensurações morfométricas (Pardini et al., 1987; Wallis et al., 1996; Singh et al., 1996; De Souza et al., 1996; Batulevicus et al.,2003; Maifrino et al.,2006; Gama et al.,2010).

Dentre aqueles que se preocuparam em estimar o seu número, observa-se uma ampla variabilidade, dependendo da espécie estudada. Assim, pode-se citar as pesquisas de King e Coakley et al. (1958), que determinaram uma média de 10 gânglios em diferentes mamíferos; Yuan et al. (1994) que determinaram uma média de 20 gânglios para o cão; Kuder (2003) e Rysevaite et al. (2011) que encontraram, respectivamente, 19 ± 3 gânglios para ratos jovens. Uma grande diversidade de número de gânglios no plexo cardíaco é relatada para os humanos, onde Armour et al. (1997) encontraram 460 gânglios; Jurgaitiené et al. (2004) 815 gânglios, e Hoover et al. (2009) 40 gânglios. Os dados do presente trabalho relativos aos animais que nasceram em ambiente limpo corroboram com o descrito por King e Coakley et al. (1958), uma vez que no plexo cardíaco dos animais F-F e F-NF foi encontrada uma média de, respectivamente, 12,8±5,7 e 9,2±6,7 gânglio*s.*

Todavia, ao se avaliar as médias dos gânglios referentes aos animais NF-NF (20,0±6,1) e NF-F (19,8±3,6) observou-se um aumento expressivo na média desses gânglios. Trata-se de uma informação interessante, uma vez que esses animais foram gerados nasceram e viveram a maior parte de suas vidas em ambiente poluído e, portanto, provavelmente tiveram esse parâmetro alterado devido à poluição ambiental. Todavia, não foram encontrados na literatura, dados que relacionassem a quantidade de gânglios com possíveis estados patológicos como infarto do miocárdio, arritmias, entre outros.

Número de Neurônios Cardíacos

Diversos autores determinaram o número de neurônios contidos nos gânglios do plexo cardíaco e, aqui também, verifica-se uma grande variabilidade, de acordo não somente com a espécie abordada, mas com outros fatores associados, como a idade. Assim, para o rato, Wallis et al. (1996) encontraram uma média de neurônios da ordem de 1993±184; De Souza et al. (1996) 975±150; Maifrino et al. (2006) 530±23; Batulevicius et al. (2003) notaram uma diferença entre ratos jovens (5009±332) e idosos (6576±317) e em ratos submetidos a exercícios físicos, a média

de neurônios do plexo cardíaco foi de 1104±205 contra 781±98 nos animais sedentários (Gama et al., 2010). No plexo cardíaco de humanos, Jurgaitiené et al. (2004), verificaram a presença de 1000 neurônios; Armour et al. (1997) contou 14.000 neurônios.

Em preparados de membrana do plexo de camundongos jovens, Rysevaite et al. (2011) encontraram uma média de 1082±160 neurônios, que corresponde a aproximadamente a metade do aqui observado para todos os grupos estudados, e cerca de 1/3 a ¼ da marcação realizada pela técnica de Giemsa. A diferença dos dados da presente pesquisa com os de Rysevaite et al. (2011) provavelmente reside no fato de esses autores terem utilizado métodos imunohistoquímicos em preparados de membrana. De fato, quando se confronta os dados aqui citados com os diversos autores que quantificaram neurônios do plexo cardíaco, verifica-se que as metodologias utilizadas influenciam na estimativa do número total de neurônios, e que pode ser comprovado nos trabalhos com cortes histológicos que apresentam maior quantidade de neurônios (Wallis et al., 1996; Armour et al., 1997; Batulevicus et al., 2003; Jurgaitiené et al., 2004), enquanto que os pesquisadores que utilizaram contagem de preparados de membrana descrevem uma menor quantidade dessas células (De Souza et al., 1996 (NADH e AChE Histoquímica); Maifrino et al., 2006 (NADPH-diaphorase); Gama et al., 2010 (β-NADH diaphorase); Rysevaite et al., 2011 (Acetyltransferase – ChAT).

Ao se comparar, em todos os grupos aqui estudados, a média dos neurônios corados com Giemsa com aquelas dos neurônios evidenciados pelo método da NADH, pode-se admitir que o método não histoquímico foi mais eficiente, corroborando as afirmações do autores Miranda-Neto et al. (2005), os quais descreveram que a técnica de evidenciação neuronal pela atividade da enzima NADH, marca apenas os neurônios com grande atividade respiratória, e não necessariamente toda a população neuronal. Segundo a literatura, a técnica de NADH-diaforase evidencia parte da densidade neuronal, sendo que o número de neurônios marcados é menor que o identificado pela coloração de Giemsa (Sant'ana et al., 1997; Furlan et al., 1999; Miranda-Neto et al., 2000).

As diferenças entre vários estudos relacionados ao plexo cardíaco demonstram que o método utilizado para contagem dos neurônios e gânglios cardíacos interfere nos resultados. A metodologia de avaliação aqui empregada (estereologia), seguramente auxilia em uma melhor determinação da quantidade dessas células, sem subestimar ou sobreestimar o resultado, fato que pode ocorrer em contagens utilizando métodos convencionais, conforme citado nos trabalhos de Gundersen et al. (1999), Veras et al. (2008). Assim, o método estereológico aplicado na presente pesquisa contribui para uma melhor análise quantitativa relacionadas às alterações estruturais, de forma a possibilitar comparações estatísticas confiáveis entre os grupos estudados. Como em camundongos Balb C não foram encontrados, até o momento, dados estereológicos relativos ao plexo cardíaco (número total de neurônios, gânglios e diâmetros), pode-se considerar os resultados ora apresentados como inéditos, que contribuem para uma melhor elucidação acerca dos seus componentes.

Os resultados para os diferentes grupos da presente pesquisa, a partir de cortes histológicos utilizando as duas técnicas de Giemsa e NADH-diaforase numa mesma população de camundongos, comprovam que no camundongo há uma quantidade maior de neurônios quando comparado aos dos ratos descritos na literatura, variação esta que pode estar relacionada com o emprego de preparados de membrana coradas com a técnica da NADH-diaforase. Isto é corroborado pelas afirmações de Batulevicius et al. (2003), que descrevem que a técnica de preparado de membrana leva a uma subestimação de neurônios no plexo cardíaco, quando eles comparam seu trabalho utilizando ratos idosos e jovens, com o trabalho de Akamatsu et al. (1999) que também utilizou ratos velhos. Batulevicius et al. (2003) encontrou uma média de 6576± 317 neurônios no plexo cardíaco em ratos velhos, enquanto Akamatsu et al., (1999) com a técnica de preparado de membrana descreveu a presença de somente 1000 neurônios no coração de ratos idosos. Nos resultados da presente pesquisa, como já citado comprova-se essa redução, mesmo utilizando-se cortes, uma vez que a técnica da NADH evidenciou menos neurônios do que o verificado com a técnica de Giemsa, que foi amplamente utilizada em

trabalhos com as diversas partes do tubo digestório (Gomes, 1995) e no plexo cardíaco (Akamatsu et al., 1999).

Estrutura do plexo cardíaco

Em relação à arquitetura geral do plexo cardíaco, a coloração de acetilcolinesterase (AChE) demonstrou ser um método eficiente para o seu mapeamento, como já descrito em diferentes mamíferos como o cão (Pauza et al., 1999; 2000); o homem (Hopikins, 2000) e o rato (Batulevicius, 2003; Arora et al., 2003; Rysevaite et al., 2011). Quando se compara as observações da inervação do coração de camundongo com os trabalhos realizados com corações de ratos (Batulevicius, 2003; Rysevaite et al., 2011), evidencia-se uma semelhança da anatomia dos componentes do plexo cardíaco.

Assim, ao se avaliar a estrutura dos gânglios, verifica-se também, que como descrito para outros gânglios autônomos como os do plexo mioentérico (Gomes et al., 1997), o mesmo exibe uma cápsula de tecido conjuntivo constituída por fibras colágenas e elásticas, com septos que se prolongam para o seu interior, envolvendo neurônios individualmente, ou em grupos. Pauzine e Pauza (2003) em humanos e Akamatsu (2007) em ratos também descreveram esse tipo de estrutura no plexo cardíaco; todavia, nenhum deles detectou a presença de fibras elásticas, como descrito aqui para o camundongo. Relativamente a essas fibras, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos, diferentemente do que foi descrito por Gomes et al (1997) para o plexo mioentérico, quando observou um substancial aumento de fibras elásticas em indivíduos idosos. Esse fenômeno foi interpretado pelos autores como uma maneira de preenchimento do gânglio, em decorrência da perda de neurônios ocasionada pelo processo de envelhecimento. Assim, como a distribuição dessas fibras não diferiu entre os grupos do presente estudo, indiretamente pode-se afirmar que a poluição pode alterar o tamanho dos neurônios, mas não diminuir a população neuronal no interior dos gânglios do plexo cardíaco.

Em ratos nutridos e desnutridos, Akamatsu (2007) relatou a presença de fibras colágenas do tipo I na cápsula dos gânglios do plexo cardíaco, e Gomes et al. (2006) detectou fibras dos tipos I e III na cápsula dos gânglios mioentéricos; além disso, esses últimos observaram a predominância de fibras colágenas do tipo III nos animais submetidos à desnutrição protéica, uma clara alusão ao atraso no processo de desenvolvimento de animais desnutridos. Como as fibras do tipo III também estão envolvidas em processos de reparação dos diferentes tecidos pode-se admitir que a predominância delas nos animais expostos à poluição, esteja relacionada a um processo de remodelação ganglionar, determinado pela alteração do tamanho dos corpos neuronais do plexo desses grupos.

Remodelação 3D

Finalizando, cumpre tecer algumas considerações acerca do processo de reconstrução tridimensional aqui empregado. Dessa maneira, várias técnicas de reconstrução de imagens em 3D são utilizadas a partir de uma série de secções de imagens transversais por meio de técnicas convencionais como: Tomografia Computadorizada, Tomografia por Emissão de Pósitrons, ressonância magnética, ultra-som em 3D, e o raios-X (Liu et al., 2003; Yankeelov et al., 2011). Com o surgimento de programas de reconstruções 3D a partir de cortes histológicos como o software Reconstrucet 3D, e o Biovision 3D, vários autores tem utilizados as técnicas de colorações histológicas de secções bidimensionais (2D) combinando com softwares de reconstrução computadoriza sob efeitos tridimensionais (3D) para uma melhor caracterização de estruturas anatômicas, como observado para reconstrução do mapeamento de células adrenérgicas no coração de ratos adultos (Kingsley et al., 2011) e para o mapeamento molecular e anatômico do feixe de His no ventrículo direito e esquerdo de ratos (Atkinson et al., 2011).

No entanto, alguns dos programas são pagos, fato esse que possibilitou a utilização do Blender em nosso trabalho por ser um programa gratuito. Assim, a utilização de um programa de reconstrução 3D, os cortes histológicos 2D e a

associação da estereologia uma técnica para contagem em 3D foi possível mapear a distribuição específica dos gânglios e neurônios cardíacos no plexo cardíaco para obtermos um mapa topográfico abrangente de suas posições anatômicas.

As dificuldades de visualização do plexo cardíaco em imagens de duas dimensões tornam difícil o entendimento desse componente. A modelagem em 3D do coração associada ao plexo cardíaco, separando suas diferentes camadas, permiti ao usuário visualizar cada uma das estruturas dos vasos da base e plexo cardíaco separadamente, podendo ocorrer à dissecção do órgão em tempo real, retirando e inserindo na visualização as estruturas que forem desejadas. O atlas criado dispõe também de uma intuitiva interface de interação com os objetos, utilizando mouse e teclado, para mover, girar e aplicar zoom. Todos os recursos presentes no atlas podem ser utilizados em computadores convencionais sem comprometimento do seu desempenho.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com as proposições estabelecidas, a metodologia empregada e os resultados obtidos neste trabalho, é lícito concluir-se que:

- A morfologia geral do plexo cardíaco de camundongos assemelha-se ao descrito para outros mamíferos, com seus neurônios organizando-se em gânglios dispostos na gordura unilocular;
- Nos animais submetidos aos fatores de poluição, os gânglios cardíacos apresentam-se em maior número e exibem maior volume;
- A técnica de Giemsa permite evidenciar uma quantidade maior de neurônios, quando comparada à metodologia da NADH;
- Em todos os grupos, verificou-se uma cápsula ganglionar, formada por tecido conjuntivo e constituída de fibras colágenas e de fibras do sistema elástico;
- Fibras colágenas dos tipos I e III foram detectadas na constituição da cápsula dos gânglios de todos os grupos estudados, com predominância daquelas do tipo III nos animais expostos à poluição;
- Septos formados por fibras colágenas e elásticas foram encontrados no interior dos gânglios dos animais de todo os grupos;
- Animais expostos à poluição exibiram diminuição no diâmetro do corpo neuronal;
- A utilização de técnicas de reconstrução tridimensional associadas a modelos estruturais de anatomia humana apresentou-se como uma excelente ferramenta aliada ao melhor entendimento do plexo cardíaco.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS *

Akamatsu FE, De-Souza RR, Liberti EA., E.A. Fall in the number of intracardiac neurons in aging rats. Mech Ageing Dev. 1999;109(3):153-61.

Akamatsu FE. Estudo morfoquantitativo dos neurônios subepicárdicos de ratos jovens e velhos. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

Akamatsu, FE, Gama EF, Souza RR, Leme RJA, Liberti EA. Pre And Post Natal Undermutrition Influences The Development Of The Subepicardic Ganglion Capsule .Braz.J.Morphol.Sci 2007; 24 (2): 58-65.

Akinaga LM, Lichtenfels AJ, Carvalho-Oliveira R, Caldini EG, Dolhnikoff M, Silva LF, Bueno HM, Pereira LA, Saldiva PH, Garcia ML. Effects of chronic exposure to air pollution from Sao Paulo city on coronary of Swiss mice, from birth to adulthood. Toxicol Pathol. 2009;37(3):306-14. Epub 2009 Feb 27.

Amorim DS, OLSEN EGJ. Assessment of heart neurons in dilated (congestive) cardiomyopathy. Brit. Heart J., 47: 11-18, 1982.

Anderson RH. The disposition, morphology, and innervation of cardiac specialized tissue in the guinea pig. J. Anat 1972; v. 111,453-468.

Armour JA, Murphy DA, Yuan BX, Macdonald S, Hopkins DA. Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. Anat Rec. 1997 Feb;247(2):289-98.

Armour JA. Myocardial ischemia and the cardiac nervous system. Cardiovasc Res. 1999; 41 (1):41-54

Atkinson A, Inada S, Li J, Tellez JO, Yanni J, Sleiman R, Allah EA, Anderson RH, Zhang H, Boyett MR, Dobrzynski H. Anatomical and molecular mapping of the left and right ventricular His-Purkinje conduction networks. J Mol Cell Cardiol. 2011;51(5):689-701.

AVMA Panel on Euthanasia. American Veterinary Medical Association. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. J Am Vet Med Assoc. 2001;218(5):669-96.

---

*De acordo com:
Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).
Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Barbosa AJA. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas;1978, 11: 95–97.

Batulevicius D, Pauziene N, Pauza DH. Topographic morphology and age-related analysis of the neuronal number of the rat intracardiac nerve plexus. Ann Anat. 2003;185(5):449-59.

Batulevicius D, Skripka V, Pauziene N, Pauza DH.Topography of the porcine epicardiac nerve plexus as revealed by histochemistry for acetylcholinesterase. Auton Neurosci. 2008;138(1-2):64-75.

Beiguelman B. *Curso prático de bioestatística*. 3 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994.

Berglund, AM; Ryugo DK. Hair Cell Innervation by Spiral Ganglion Neurons in the Mouse. THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY 1987;255:560-570.

Brook RD, Brook JR, Rajagopalan S. Air pollution: the "Heart" of the problem. Curr Hypertens Rep. 2003; 5(1): 32-9.

Brook RD, Brook JR, Urch B, Vincent R, Rajagopalan S, Silverman F. Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. Circulation. 2002;105:1534–1536.

Brüel A, Oxlund H, Nyengaard JR. Growth hormone increases the total number of cardiac myocyte nuclei in young rats but not in old rats. Mech Ageing Dev. 2002 Jul;123(10):1353-62.

Brunekreef B, Holgate ST.Air pollution and health. Lancet .2002;360: 1233–1242.

Burkholder T, Chambers M, Hotmire K, Wurster RD, Moody S, Randall WC. Gross and microscopic anatomy of the vagal innervation of the rat heart. Anat Rec. 1992;232(3):444-52.

Calaresu RF, St Louis AJ. Topography and numerical distribution of intracardiac ganglion cells in the cat. J Comp Neurol. 1967;131(1):55-66.

Chahine T, Baccarelli A, Litonjua A, Wright RO, Suh H, Gold DR, Sparrow D, Vokonas P, Schwartz J. Particulate Air Pollution, oxidative Stress Genes, and Heart Rate Variability in an Elderly Cohort. Environ Health Perspect. 2007 115(11):1617–1622.

Chang CC, Hwang JS, Chan CC, Wang PY, Cheng TJ. Effects of concentrated ambient particles on heart rate, blood pressure, and cardiac contractility in spontaneously hypertensive rats during a dust storm event. Inhal Toxicol. 2007;19(11):973-8.

Chapadeiro E, Silva EL, Silva ACM, FernandeS P, Ramirez LE. Despopulação neuronal cardíaca em hamsters (Mesocricetus auratus) cronicamente infectados com o Trypanosoma cruzi. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. , Uberaba, v. 32, n. 1, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821999000100007&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 10 Jun 2008. doi: 10.1590/S0037-86821999000100007

Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS, Doyle FJ 3rd. Vagal afferent innervation of the atria of the rat heart reconstructed with confocal microscopy. J Comp Neurol. 1997;381(1):1-17.

Chiang CH, Gabella G. Quantitative study of the ganglion neurons of the mouse trachea. Cell Tissue Res 1986; 246:243-52.
Coleridge JC, Coleridge HM. Afferent C-fibers and cardiorespiratory chemoreflexes. Am Rev Respir Dis. 1977; 115(6 Pt 2):251-60.

Cormack DH. Ham histologia. Ed 9. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1995;273-287, 384-404.

Darrow LA, Klein M, Strickland MJ, Mulholland JA, Tolbert PE. Ambient air pollution and birth weight in full-term infants in Atlanta, 1994-2004. Environ Health Perspect. 201;119(5):731-7.

Davies F,Francis ETB, King TS. Neurological studies of the cardiac ventricles of mammals. J Anat.1952; 86:130–143.

De Souza RR, De Carvalho CA, Liberti EA, Fujimura I.A quantitative study on the myenteric plexus of the distal end of the human esophagus. Gegenbaurs Morphol Jahrb. 1988;134(4):565-74.

De Souza RR, Gama EF, de Carvalho CA, Liberti EA. Quantitative study and architecture of nerves and ganglia of the rat heart. Acta Anat (Basel). 1996;156(1):53-60.

De Souza RR, Moratelli HB, Borges N, Liberti EA. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. Gerontology. 1993;39(4):183-8.

Devlin RB, Ghio AJ, Kehrl H, Sanders G, Cascio W. Elderly humans exposed to concentrated air pollution particles have decreased heart rate variability. Eur Respir J Suppl. 2003 ;40:76-80.

D'Ippoliti D, Forastiere F, Ancona C, Agabiti N, Fusco D, Michelozzi P, Perucci CA.. Air pollution and myocardial infarction in Rome: a case-crossover analysis. Epidemiology 2003; 528– 535.

Djemek, J., Selevan, S.G., Benes I, Solansky´ I, Sra´m, R.J. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. Environ Health Perspect; 1999, 107:475–480.

Dockery DW. Epidemiologic Evidence of Cardiovascular Effects of Particulate Air Pollution. Environ Health Perspect 2001; 109(4):483–486.

Dogiel AS. Zur Frage u¨ ber den feineren Bau der Herzganglien des Menschen und der Sa¨ugetiere. Arch Mikrosc Anat. 1899.53:237–281. (As cited in Kuntz A. 1934. The autonomic nervous system. Philadelphia: Lea and Febiger.

Donaldson K, Stone V, Seaton A, MacNee W.Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. Environ Health Perspect. 2001;109 (4):523-7. Review.

Edwards FR, Hirst GD, Klemm MF, Steele PA. Different types of ganglion cell in the cardiac plexus of guinea-pigs.J Physiol. 1995;486 (Pt 2):453-71
Eilstein D, Quénel P, Hédelin G, Kleinpeter J, Arveiler D, Schaffer P. Air pollution and myocardial infarction: Strasbourg France, 1984–89. *Ver Epidemiol Sante Publique*. 2001;49(1):13–25.

Ellison JP, Hibbs RG. An ultrastructural study of mammalian cardiac ganglia. No abstract available. J Mol Cell Cardiol. 1976;8(2):89-101.

Erhart EA. Neuroanatomia. Ed 4. São Paulo: Atheneu, 1974:3.

Francillon MR. Zur Topographie der Ganglien des menschlichen Herzens. Z Anat Entwicklungsgesch. 1928.85:131–165.

Furlan MM, de Miranda Neto MH, Sant'ana Dde M, Molinari SL. Number and size of myenteric neurons of the duodenum of adult rats with acute diabetes. Arq Neuropsiquiatr. 1999;57(3B):740-5.

Gabella G. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. Gastroenterology, 1989;96:1487-93.22.

Gabella G, Trigg P. Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. J Neurocytol 1984;13:49-71.

Gabella G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. Experientia 1969;25:218-219.

Gagliardi M, Randall WC, Bieger D, Wurster RD, Hopkins DA, Armour JA. Activity of in vivo canine cardiac plexus neurons.. Am J Physiol. 1988. 255:H789–H800

Gama EF, Santarém JM, Liberti EA, Jacob Filho W, Souza RR.Exercise changes the size of cardiac neurons and protects them from age-related neurodegeneration. Ann Anat. 2010;192(1):52-7.

Glantz SA. Air pollution as a cause of heart disease: time for action. J Am Coll Cardiol. 2002;39:943–945.

Gomes OA, Castelucci P, de Vasconcellos Fontes RB, Liberti EA Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: a quantitative morphological study.. Auton Neurosci. 2006 Jun 30;126-127:277-84

Gomes OA, de Souza RR, Liberti EA. A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. Gerontology. 1997;43(4):210-7.

Gomes, OA. Efeitos do Envelhecimento Nos Ganglios do Plexo Mienterico do Colo Humano: Aspectos Morfoquantitativos. 1995. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Universidade de São Paulo.

Gouveia N, Mendonça GA, Leon AP, Correia JE, Junger WL, Freitas CU, Daumas R.P, Martins LC, Giussepe L, Conceição GMS. Manerich A, Cunha-Cruz, J. Poluição do ar e efeitos na saúde nas populações de duas grandes metrópoles brasileiras. Epidemiol Serv Saúde 2003;12:29-40.

Gregory A. Wellenius; Mary R. Burger; Brent A. Coull; Joel Schwartz; Helen H. Suh; Petros Koutrakis; Gottfried Schlaug; Diane R. Gold; Murray A. MittlemanAmbient Air Pollution and the Risk of Acute Ischemic Stroke Arch Intern Med. 2012;172(3):229-234.

Gundersen HJ, Jensen EB, Kiêu K, Nielsen J The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. J Microsc. 1999;193(Pt 3):199-211.

Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J. Microsc* 1986; 143, 3-45.

Gundersen, H.J., Jensen, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. J Microsc 1987; 147:229-63.

Hampel R, Breitner S, Schneider A, Zareba W, Kraus U, Cyrys J, Geruschkat U, Belcredi P, Müller M, Wichmann HE, Peters A. Acute air pollution effects on heart rate variability are modified by SNPs involved in cardiac rhythm in individuals with diabetes or impaired glucose tolerance. Environ Res. 2012;112:177-85.

Her WY, Fu YS, Liu TS, Liu KM. Morphological study of cultured cardiac ganglionic neurons from different postnatal stages ofrats. Auton Neurosci. 2000 Oct 30;84(1-2):89-97.

Hoover DB, Isaacs ER, Jacques F, Hoard JL, Pagé P, Armour JA. Localization of multiple neurotransmitters in surgically derived specimens of human atrial ganglia. Neuroscience. 2009 15;164(3):1170-9.

Hopkins DA, Macdonald SE, Murphy DA, Armour JA. Pathology of intrinsic cardiac neurons from ischemic human hearts. Anat Rec. 2000;259(4):424-36.

Horackova M, Slavikova J, Byczko Z. Postnatal development of the rat intrinsic cardiac nervous system: a confocal laser scanningmicroscopy study in whole-mount atria. Tissue Cell. 2000 Oct;32(5):377-88.

Hosseinpoor AR, Forouzanfar MH, Yunesian M, Asghari F, Naieni KH, Farhood D.Air pollution and hospitalization due to angina pectoris in Tehran, Iran: a time-series study. Environ Res. 2005; 99(1):126-31.

Howard, V., Reed, M.G. *Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy. BIOS Scientific.* 2005.

Hunt SP, Mantyh PW, Priestley JV. The organization of biochemically characterized sensory neurons. In: Scott SA, editor. Sensory neurons: diversity, development and plasticity. New York: Oxford University Press. 1992; 60–76.

Janes RD, Brandys JC, Hopkins DA, Johnstone DE, Murphy DA, Armour JA. Anatomy of human extrinsic cardiac nerves and ganglia. Am J Cardiol. 1986;57(4):299-309.

Junqueira Júnior LF, Beraldo PS, Chapadeiro E, Jesus PC. Cardiac autonomic dysfunction and neuroganglionitis in a rat model of chronic Chagas'disease. Cardiovasc Res. 1992;(4):324-9.

Junqueira LCU, Bignolas G, Bretani R. Picro sirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histhochem. J. 1979;11: 447-455.

Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani RR. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. Arch. Histol. 1978; 41:267-274.

Jurgaitiene R, Pauziene N, Azelis V, Zurauskas E. Morphometric study of age-related changes in the human intracardiac ganglia. **Medicina (Kaunas***)* 2004; 40(6).574-58.

King TS, Coakley JB. The intrinsic nerve cells of the cardiac atria of mammals and man. J Anat. 1958 Jul;92(3):353-76.

Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndrome. The pathology of American trypanosomiasis. Dawes B (ed) Advances in Parasitology vol.6. Academic Press, New York, 1968; 63-116.

Kuder T, Nowak E, Szczurkowski A, Kuchinka J.A Comparative Study on Cardiac Ganglia in Midday Gerbil, Egyptian Spiny Mouse, Chinchilla Laniger and Pigeon. Anat Histol Embryol. 2003;32(3):134-40.

Kukanova B, Mravec B. Complex intracardiac nervous system. Bratisl Lek Listy. 2006;107(3):45-51. Review.

Kuntz A. The autonomic nervous system. Philadelphia: Lea and Febiger. 1934.

Künzli N, Jerrett M, Garcia-Esteban R, Basagaña X, Beckermann B, Gilliland F, Medina M, Peters J, Hodis HN, Mack WJ. Ambient air pollution and the progression of atherosclerosis in adults. PLoS One. 2010; 8;5(2):e9096.

Lanki T, Pekkanen J, Aalto P, Elosua R, Berglind N, D'Ippoliti D, Kulmala M, Nyberg F, Peters A, Picciotto S, Salomaa V, Sunyer J, Tiittanen P, von Klot S, Forastiere F. Associations of traffic related air pollutants with hospitalisation for first acute myocardial infarction: the HEAPSS study. Occup Environ Med. 2006 Dec;63(12):844-51.

Linden RJ. Function of cardiac receptors. Circulation 1973; 48: 463.

Link MS, Dockery DW. Air pollution and the triggering of cardiac arrhythmias.Curr Opin Cardiol. 2010;25(1):16-22. Review.

Linn WS, Szlachcic Y, Gong H Jr, Kinney PL, Berhane KT.Air pollution and daily hospital admissions in metropolitan Los Angeles. Environ Health Perspect. 2000;108(5):427-34

Liu D, Smith DJ. Voxelation and gene expression tomography for the acquisition of 3-D gene expression maps in the brain. *Methods.* 2003;**31**(4):317–325.

Lushnikova EL, Molodykh OP, Cheresiz SV, Nepomnyashchikh LM. Morphofunctional reorganization of the myocardium of mouse-like rodents in regions with various anthropogenic contamination levels. Translated from Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny, 1999; 127(6):708–713.

Maifrino LB, Liberti EA, Castelucci P, De Souza RR. NADPH- Diaphorase positive cardiac neurons in the atria of mice. A morphoquantitative study. *BMC Neuroscience,* 2006; 7:10

Masliukov PM. Sympathetic neurons of the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis: morphometric analysis. Auton Neurosci . 2001;89:48-53.

Mayhew TM. Stereological studies on rat spinal neurons during postnatal development: estimates of mean perikaryal and nuclear volumes free from assumptions about shape. *J. Anat.* 1989; 162, 97-109.

McMahan UJ, Kuffler SW.Visual identification of synaptic boutons on living ganglion cells and of varicosities inpostganglionic axons in the heart of the frog. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1971;177(49):485-508.

Miranda-Neto MH, Defani MA, Fregonesi CE, Natali MRM, Pereira A. Morphometric and quantitative evaluation of the NADH- diaphorase positive myenteric neurons of the jejunum of streptozotocin-diabetic rats supplemented with acetyl-l-carnitine. Anat Histol Embryol 2005;34(3):154-8

Miranda-Neto MH, Furlan MM, Sant'Ana DD, Molinari SL, Souza JA. Evaluation of theareas of neuronal cell bodies and nuclei in the myenteric plexus of the duodenum of adult rats. Arq Neuropsiquiatr. 2000; 58(2A):246-51.

Moller FB, Jensen JT. Whole-mount demonstration of cholinesterase-containing nerves in the right atrial wall, nodaltissue, and atrioventricular bundle of the pig heart. J Anat. 1971;108(Pt 3):375-86.

Nadziejko C, Fang K, Narciso S, Zhong M, Su WC, Gordon T, Nádas A, Chen LC. Effect of Particulate and Gaseous Pollutants on Spontaneous Arrhythmias in Aged Rats. Inhalation Toxicology, 16:373–380, 2004.

Nafstad P, Håheim LL, Wisløff T, Gram F, Oftedal B, Holme I, Hjermann I, Leren P. Urban air pollution and mortality in a cohort of Norwegian men. Environ Health Perspect. 2004;112(5):610–615.

Natali MRM, Miranda-Neto MH. Effects of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of duodenum of rats. Arq Neuropsiquiatr 1996;54:273-279.

Nemmar A, Nemery B, Hoylaerts MF, Vermylen J. Air pollution and thrombosis: an experimental approach. Pathophysiol Haemost Thromb. 2002;32(5-6):349-50. Review.

Pardini BJ, Patel KP, Schmid PG, Lund DD. Location, distribution and projections of intracardiac ganglion cells in the rat. J. Aut. Nerv. Sys. 1987; 20(2):91-101.

Park SK, O'Neill MS, Vokonas PS, Sparrow D, Schwartz J. Effects of Air Pollution on Heart Rate Variability: The VA Normative Aging Study. Environ Health Perspect . 2005.113(3):304–309.

Pauza DH, Skripka V, Pauziene N, Stropus R. Anatomical study of the neural ganglionated plexus in the canine right atrium: implicationsfor selective denervation and electrophysiology of the sinoatrial node in dog. Anat Rec. 1999;255(3):271-94.

Pauza DH, Skripka V, Pauziene N, Stropus R. Morphology, distribution and variability of the epicardic neural ganglionated subplexus of the human heart. Anat. Rec., 2000;259(4):353-382.

Pauza DH, Skripkiene G, Skripka V, Pauziene N, Stropus R. Morphological study of neurons in the nerve plexus on heart base of rats and guinea pigs. J Auton Nerv Syst. 1997;62(1-2):1-12.

Pauziene N, Pauza DH, Stropus R. Morphology of human intracardiac nerves: an electron microscope study. J Anat. 2000;197 Pt 3:437-59.

Pauziene N, Pauza DH. Electron microscopic study of intrinsic cardiac ganglia in the adult human. Ann Anat. 2003.185: 135–148.

Pavlovich ER, Shvalev VN.The ultrastructure of human intracardiac neuroganglia. Morfologiia. 1992;102(6):59-67.

Peters A, Fröhlich M, Döring A, Immervoll T, Wichmann HE, Hutchinson WL, Pepys MB, Koenig W. Particulate air pollution is associated with an acute phase response in men; results from the MONICA-Augsburg Study. Eur Heart J. 2001 ;22(14):1198-204.

Peters A, Liu E, Verrier RL, Schwartz J, Gold DR, Mittleman M, Baliff J, Oh JA, Allen G, Monahan K, Dockery DW. Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. Epidemiology. 2000.11, 11–17.

Peters A, Perz S, Döring A, Stieber J, Koenig W, Wichmann HE. Increases in Heart Rate during an Air Pollution Episode. *Am J Epidemiol.* 1999; 150(10):1094-8.

PolonieckI JD, Atkinson RW, De Leon AP, Anderson HR. Daily time series for cardiovascular hospital admissions and previous day's air pollution in London, UK. Occup Environ Med. 1997; 54:535–540.

Pope CA 3rd, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. Circulation. 2004 6;109(1):71-7.

Rambourg A, Clemont Y, Beaudet A. Ultrastructural features of sixtypes of neurons in rat dorsal root ganglia. J Neurocytol 1983; 12:47–66.

Randall DC. Towards um understanding of the function of the intrinsic cardiac ganglia. J. Physiol, 2000; 528 (Pt 3): 406.

Randall WC, Ardell JL, Calderwood D, Milosavljevic M, Goyal SC.Parasympathetic ganglia innervating the canine atrioventricular nodal region. J Auton Nerv Syst. 1986;16(4):311-23.

Rhoden CR, Wellenius GA, Ghelfi E, Lawrence J, González-Flecha B. PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. Biochim Biophys Acta. 2005 10;1725(3):305-13

RobB JS. Comparative basic cardiology. New York: Grune and Stratton. 1965.
Routledge HC, Ayres JG, Townend JN. Why cardiologists should be interested in air pollution. Heart. 2003; 89(12):1383-8. Review.

Ruidavets JB, Cournot M, Cassadou S, Giroux M, Meybeck M, Ferrières J. Ozone air pollution is associated with acute myocardial infarction. Circulation. 2005 8;111(5):563-9.

Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Noujaim SF, Jalife J, Pauza DH. Morphologic pattern of the intrinsic ganglionated nerve plexus in mouse heart. Heart Rhythm. 2011 ;8(3):448-54.

Saburkina I, Rysevaite K, Pauziene N, Mischke K, Schauerte P, Jalife J, Pauza DH.Epicardial neural ganglionated plexus of ovine heart: anatomic basis for experimental cardiac electrophysiology and nerve protective cardiac surgery. Heart Rhythm. 2010;7(7):942-50.

Saburkina I, Pauza DH.Location and variability of epicardiac ganglia in human fetuses. Anat Embryol (Berl). 2006; 211(6):585-94.

Sant'ana, Débora MG, Miranda-Neto MH, Molinari SL, Sant'anna, MA. Neuron number in the myenteric plexus of the ascending colon of rats: a comparative study using two staining techniques. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* [online]. 1997, vol.55, n.3A, pp. 460-466

Santos UP, Terra-Filho M, Lin CA, Pereira LA, Vieira TC, Saldiva PH, Braga AL. Cardiac arrhythmia emergency room visits and environmental air pollution in Sao Paulo, Brazil. J Epidemiol Community Health. 2008;62(3):267-72.

Schwartz, J. Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. Environ Health Perspect. 2002. 109:405-9p.

Schwartz, J. What are people dying of on high air pollution days? Environ. Res. 64. 1994. 26– 35p.

Scorzoni Filho A, Nakamura E J, Faria SM; Marchetti AH, Brandão JM, Aranha AL, Mattar LA, Vicente VAV, Garcia SB. Um modelo experimental de ablação do Sistema Nervoso Intrínseco Cardíaco reduz a contratilidade do coração de ratos. Rev Bras Cir Cardiovasc 2004; 19(3): 314-319.

Scorzoni Filho, Adilson et al. Um modelo experimental de ablação do Sistema Nervoso Intrínseco Cardíaco reduz a contratilidade do coração de ratos. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, Set 2004, vol.19, no.3, p.314-319.

Shvalev VN, Sosunov AA. A light and electron microscopic study of cardiac ganglia in mammals. Z Mikrosk Anat Forsch. 1985;99(4):676-94.

Shvalev VN, Sosunov AA. Electron microscopic study of cardiac ganglia in human fetuses. J Auton Nerv Syst. 1989.26:1–9.

Singh S, Johnson PI, Lee RE, Orfei E, Lonchyna VA, Sullivan HJ, Montoya A, Tran H, Wehrmacher WH, Wurster RD. Topography of cardiac ganglia in the adult human heart. J Thorac Cardiovasc Surg. 1996 Oct;112(4):943-53.

Smith RB. The topography of the intrinsic cardiac ganglia of the 120 mm human foetus. J Anat. 1969; 105:202.

Smith RB.Intrinsic innervation of the avian heart. Acta Anat (Basel). 1971;79(1):112-9.

Sommer EW, Kazimierczak J, Droz B. Neuronal subpopulations in the dorsal root ganglion of the mouse as characterized by combination of ultrastructural and cytochemical features. Brain Res. 1985;346(2):310-26.

Tsai SS, Chiu HF, Wu TN, Yang CY.Air pollution and emergency room visits for cardiac arrhythmia in a subtropical city: Taipei, Taiwan.Inhal Toxicol. 2009;21(13):1113-8.

Tsuji H, Larson MG, Venditti FJ Jr, Manders ES, Evans JC, Feldman CL, Levy D: Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events. The Framingham Heart Study. Circulation 1996, 94(11):2850-2855

Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Maciel Ribeiro AA, Mayhew TM, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Particulate urbana ir pollution affects the functional morphology of mouse placenta. Biology of Reproduction. v. 79. p. 578-584. set. 2008.

Veras, Mariana Matera. Aspectos morfológicos do aparelho reprodutor em bugios (Alouatta guariba clamitans e Alouatta caraya): o modelo feminino [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2004 [acesso 2012-04-02]. Disponível em: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10132/tde-14072005-163825/.

Wallis D, Watson AH, Mo N. Cardiac neurones of autonomic ganglia. Microsc Res Tech. 1996;35(1):69-79. Review

Walton WH. Feret's Statistical Diameter as a Measure of Particle Size Nature, Volume 162, Issue 4113, 1948; 329-330.

Wang X, Ding H, Ryan L, et al. Association between air pollution and low birth weight: a community- based study. Environ Health Perspect 1997;105:514–20.

Watkinson WP, Campen MJ, Costa DL. Cardiac arrhythmia induction after exposure to residual oil fly ash particles in a rodent model of pulmonary hypertension. Toxicol Sci. 1998; 41(2):209–216.

Watkinson WP, Campen MJ, Dreher KL, Su W-Y, Kodavanti UP, Highfill JW, Costa DL. Thermoregulatory effects following exposure to particulate matter in healthy and cardiopulmonary-compromised rats. J. Thermal Biol. 2000, 131–137.

Weigert C. Ùber eine Methode zur Farbung elastisher Fasern. Zbl. All. Path. Pathol. Anat 1898; 9: 289-292.

Wellenius GA, Coull BA, Godleski JJ, Koutrakis P, Okabe K, Savage ST, Lawrence JE, Murthy GG, Verrier RL.Inhalation of Concentrated Ambient Air Particles Exacerbates Myocardial Ischemia in Conscious Dogs. *Environ Health Perspect*. 2003.111(4):402–408p.

Wellenius GA, Saldiva PH, Batalha JR, Krishna Murthy GG, Coull BA, Verrier RL, Godleski JJ.. Electrocardiographic changes during exposure to residual oil fly ash (ROFA) particles in a rat model of myocardial infarction. Toxicol Sci. 2002;66(2):327-35.

Wotherspoon G, Priestley JV. Expression of the 5-HT1B receptor bysubtypes of rat trigeminal ganglion cells. Neuroscience 1999; 95:465–471.

Yan YH, Huang CH, Chen WJ, Wu MF, Cheng TJ. Effects of Diesel Exhaust Particles on Left Ventricular Function in Isoproterenol-Induced Myocardial Injury and Healthy Rats. Inhalation Toxicology, 2008, 20:199–203p.

Yankeelov TE, Arlinghaus LR, Li X, Gore JC. The role of magnetic resonance imaging biomarkers in clinical trials of treatment response in cancer. Seminars in Oncology. 2011;38(1):16–25.

Yuan BX, Ardell JL, Hopkins DA, Losier AM, Armour JA. Gross and microscope anatomy of the canine intrinsic cardiac nervous system. Anat. Rec. 1994; 239(1):75-87.

Zareba W, Nomura A, Couderc JP.Cardiovascular Effects of Air Pollution: What to Measure in ECG? Environ Health Perspect. 2001;109(4):533–538.