UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

ANA PAULA FRIGO MOURA

Plasticidade da inervação cardíaca durante o desenvolvimento pós-natal em preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831)

São Paulo
2014

ANA PAULA FRIGO MOURA

Plasticidade da inervação cardíaca durante o desenvolvimento pós-natal em preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831)

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moura, Ana Paula Frigo
Plasticidade da inervação cardíaca durante o desenvolvimento pós-natal em preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831) / Ana Paula Frigo Moura. -- São Paulo, 2014.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Francisco Javier Hernandez Blazquez.

Descritores: 1.Roedores/crescimento & desenvolvimento 2.Gânglio estrelado 3.Contagem de células 4.Envelhecimento 5.Proliferação de células 6.Apoptose

USP/FM/DBD-248/14

Plasticidade da inervação cardíaca durante o desenvolvimento pós-natal em preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831).

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Estereologia Estocástica e Anatomia Química (LSSCA) do Departamento de Cirurgia (VCI) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/ USP) e financiada com Bolsa de Mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Cota Institucional (Demanda Social) do Programa de Fisiopatologia Experimental.

São Paulo

2014

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MOURA, Ana Paula Frigo
Título: Plasticidade da inervação cardíaca durante o desenvolvimento pós-natal em preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831)

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

Dedico esse trabalho aos meus pais, ***Elizete de Jesus Frigo*** *e* ***José Joaquim Ferreira Moura****, que me proporcionaram tudo de melhor, acreditando em mim e me dando forças para lutar pelos meus sonhos. Quero expressar que, graças ao apoio de vocês, foi possível concluir esta etapa de minha vida. Amo muito vocês!*

À minha irmã, ***Bianca Cristina Frigo Moura****, por ser minha amiga e, em vários momentos de angústia, ter me escutado e encorajado diante às dificuldades.*

À ***Mindy****, minha cachorrinha que eu amo tanto, por sua fidelidade e por fazer dos meus dias tristes mais alegres.*

Às minhas avós, ***Benedita de Jesus Frigo*** *e* ***Nair Cortez de Freitas Moura*** *(In Memoriam), que me criaram e educaram, com princípios, amor e fé.*

AGRADECIMENTOS

À energia que me inspira e guia!

*Ao **Professor Dr. Antonio Augusto Coppi** pela orientação, pela utilidade das suas recomendações e pela cordialidade que sempre me recebeu. Por ter me ensinado a alcançar o êxito através de muito estudo e dedicação, pois, mesmo que de maneira rígida, aprendi muito durante esses cinco anos no laboratório. Estou grata pela oportunidade que tive de trabalhar com um verdadeiro profissional que sabe o que é ciência e pesquisa de qualidade.*

*Ao **Professor Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez** que me acolheu e orientou na etapa final deste trabalho, passando-me segurança e ajudando-me a solucionar as dificuldades neste momento de tensão.*

*Ao **Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Experimental** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, tornando-me mestre em ciências.*

*À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Experimental, **Professora Dra. Elia Garcia Caldini**, por me proporcionar a oportunidade de ser aluna deste Programa.*

*À secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Experimental, **Tania Regina de Souza**, por estar sempre pronta a me informar e tirar dúvidas de forma eficiente e rápida.*

*Ao órgão de fomento **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** – Programa de Demanda Social – que financiou o estudo em questão tornando possível minha dedicação exclusiva à pesquisa e à condução desta dissertação.*

*Meus respeitosos agradecimentos aos **membros da banca** pela contribuição para este trabalho.*

*Manifesto aqui meu agradecimento aos **colegas do Laboratório de Estereologia Estocástica e Anatomia Química (LSSCA)** por todo o apoio e convivência durante este período.*

*À **Aliny Antunes Barbosa Lobo Ladd** que, além de colega de trabalho, é minha tutora, minha segunda mãe, minha amiga! Foi quem sempre me ajudou e aconselhou, portanto, graças a ela, meu sonho se tornou realidade.*

*Ao **Fernando Vagner Lobo Ladd**, o "cabeça" da equipe, meu amigo, meu irmão, que sempre me aconselhou e com paciência me ensinou e ajudou. Saiba que tenho muito orgulho e me inspiro em você.*

*À **Andréa Almeida Pinto da Silva**, por sua amizade, pelo seu apoio, pelas dicas e pelos momentos de descontração, que foram muito importantes.*

*À **Lays dos Anjos Neto**, por me ouvir e aconselhar em todos os momentos. Obrigada pela sua amizade.*

À **Amanda Lopez Moreira**, pelos momentos de descontração no L.S.S.C.A. e pela amizade que foi construída.

À **Caroline Gonçalves**, minha irmãzinha, pelo carinho e cuidado, sempre com a sua doçura de ser.

À **Aparecida Joana Moreto**, por ser essa pessoa boa, linda e de garra, que hoje está longe, mas sempre perto em meu coração!

Ao **Donald Lincoln Scena** por ser sincero e paciente comigo, por me escutar e tentar entender este trabalho, apoiando-me e ajudando-me e, por me encorajar e confiar em mim. Você me mostrou que a vida pode ter cores e cheiros! "*Ainda bem que agora encontrei você...*" (Marisa Monte)

À **Daniela Marchetti de Oliveira**, minha grande amiga que, mesmo longe, sempre está presente, aconselhando-me e animando-me.

À **Maria Carolina Lucchiari Putini**, por sempre me ouvir, sendo minha psicóloga e amiga há mais de 15 anos.

Às meninas, **Aline Louise de Sá Gil**, **Denise Macedo de Souza Gregolin** e **Patrícia Vieira Antoniassi** pela amizade e pelos momentos de descontração, que mesmo com dificuldade, sempre que possível, nos encontramos para dar boas risadas.

Aos **preás** que tanto me ensinaram, mesmo *post-mortem*, contribuindo em âmbito científico.

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."

Charles Chaplin

RESUMO

Moura, A. P. F. **Plasticidade da inervação cardíaca durante o desenvolvimento pós-natal em preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831).** 2014. 77f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2014.

O gânglio estrelado (GE) é o principal componente da inervação cardíaca extrínseca e está envolvido na gênese de diversas cardiomiopatias. Durante o envelhecimento, o controle neural do coração dos mamíferos é alterado de forma complexa e não clara, geralmente ocasionando decremento da função cardíaca e maior propensão a doenças degenerativas. A ocorrência de resultados dissonantes quanto aos parâmetros morfoquantitativos durante o envelhecimento, como o aumento ou diminuição do número total de neurônios simpáticos, é assunto para discussões interessantes. Esta pesquisa foi conduzida em preás machos (*Galea spixii*), um pequeno roedor da fauna brasileira. Desta forma, estudou-se o efeito do desenvolvimento pós-natal (maturação e envelhecimento) na macro e microestrutura do gânglio estrelado esquerdo (GEe) de preás, por meio de microscopia quantitativa tridimensional (Estereologia) associada a técnicas de imuno-histoquímica. De acordo com a fase específica do desenvolvimento pós-natal, os animais foram alocados nos seguintes grupos etários: Neonatos, Jovens, Adultos e Senis. Inicialmente, os animais foram submetidos à eutanásia e seus gânglios estrelados esquerdos coletados e fixados em solução de formaldeído (4%) em PBS. Foi realizada amostragem sistemática e uniformemente aleatória (SURS), estimando-se: volume do GEe, volume neuronal e número total de neurônios do GEe. Os principais achados deste estudo foram: i) aumento do comprimento do gânglio - 42% entre Neonato e Senil; 34% entre Jovem e Senil e 35% entre Adulto e Senil; ii) hipertrofia do GEe - 171% entre os grupos Neonato e Adulto; iii) aumento do tecido não neuronal – 268% entre os grupos Neonato e Adulto; iv) estabilidade no número total de neurônios uninucleados, binucleados e total (uni+bi); v) estabilidade no tamanho (volume) dos neurônios uninucleados e binucleados; e vi) estabilidade no número total de neurônios imunorreativos ao Ki-67 (uni+bi). Espera-se que os resultados gerados por esta pesquisa possam esclarecer alguns aspectos estruturais da plasticidade neural durante o desenvolvimento pós-natal de preás, avançando assim o conhecimento acerca da inervação cardíaca extrínseca.

Descritores: Roedores/Crescimento & desenvolvimento; Gânglio estrelado; Contagem de células; Envelhecimento; Proliferação de células.

ABSTRACT

Moura, A. P. F. **Plasticity of cardiac innervation during postnatal development in preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831).** 2014. 77f. Dissertation, São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", São Paulo; 2014.

The stellate ganglion (SG) is a main component of extrinsic cardiac innervation and is involved in the genesis of various cardiomyopathies. During ageing, the neural control of heart in mammals is altered in the complex shape and unclear, generally cause decrement in the cardiac function and a greater propensity to degenerative diseases. The occurrence of discordant results regarding the morphoquantitative parameters during ageing, such as increase or decrease in the total number of sympathetic neurons, is a subject for interesting discussions. This research was conducted in males preas (Galea spixii), a small rodent of the Brazilian fauna. Therefore, this work aimed to study the effect of postnatal development (maturation and ageing) in the macro and microstructure of the left stellate ganglion (LSG) in preas by dimensional quantitative microscopy (Stereology) associated to immunohistochemistry techniques. According to a specific stage of postnatal development, the animals were allocated into the following age groups: Newborn, Young, Adult and Elderly. The animals were euthanised and the left stellate ganglia were collected and fixed in 4% formaldehyde solution in PBS. A systematic uniformly random sampling (SURS) was performed to estimate: the volume of LSG, neuron volume and the total number of LSG neurons. The main findings of this study were: i) increase in length ganglia - 42% between Newborn and Elderly; 34% between Young and Elderly and 35% between Adult and Elderly; ii) hypertrophy of LSG - 171% between the groups Newborn and Adult; iii) increase of non-neuronal tissue – 268% between the groups Newborn and Adult; iv) stability for the total number of uninucleate neurons, binucleate neurons and total (uni+bi); v) stability in the size (volume) of uninucleate and binucleate neurons; and, vi) stability for the total number of neurons immunorreactive to Ki-67 (uni+bi). It is expected that the results generated for this research may clarify structural aspects of neural plasticity during the postnatal development of preas, thus advancing the knowledge about the extrinsic cardiac innervation.

Descriptors: Rodents/ Growth & development; Stellate ganglion; Cell count; Ageing; Cell proliferation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Localização do gânglio estrelado. Fonte: Gabella, 2004. 25

Figura 2- Preá, Ga*lea spixii* do grupo Adulto. Escala de barra: 5cm..... 32

Figura 3- Gânglio estrelado esquerdo (GEe) do grupo Adulto. Escala de barra: 1mm 33

Figura 4- Gânglios isotropizados através do método *do i*-sector..... 34

Figura 5- Esquema representando a amostragem do GEe de forma sistemática e uniformemente aleatória (SURS). (As escalas entre as diferentes etapas não correspondem à escala real)..... 35

Figura 6- Fotomicrografia do GEe de preá do grupo Senil demonstrando a aplicação do Princípio de Cavalieri para a estimativa do volume ganglionar através do sistema teste de pontos ((a/p) 21.586,19 μm^2). Giemsa. Escala de barra: 300µm..... 36

Figura 7- Fotomicrografias de secções histológicas sequenciais do GEe de um preá do grupo Senil, exemplificando a aplicação do método do Disector óptico em que neurônios uni (U) e binucleado (B) foram amostrados em planos focais ópticos sucessivos (A, B, C, D, E e F) espaçados em 5 µm e, os núcleos que foram surgindo em foco e elegíveis pelos critérios estereológicos, foram contados em diferentes alturas. Giemsa. Escalas de barra: 30µm. 39

Figura 8- Fotomicrografias do GEe de um preá do grupo Neonato, exemplificando a aplicação do método Rotator planar, em que um neurônio uninucleado foi elegível e teve o seu volume médio estimado. Giemsa. Escalas de barra: 30µm..... 41

Figura 9- Fotomacrografia dos gânglios estrelados esquerdos de preás do grupo Neonato (A), Jovem (B), Adulto (C) e Senil (D) demonstrando a diferença macromorfométrica para o comprimento. Escala de barra: 1mm. 45

Figura 10- Fotomicrografia do gânglio estrelado esquerdo (GEe) de preás dos grupos Neonato (A), Jovem (B), Adulto (C) e Senil (D). Observam-se neurônios uninucleados (setas) e binucleados (cabeças de seta) que são densamente distribuídos nos animais Neonatos e Jovens, embora, nos animais dos grupos Adulto (C) e Senil (D), os neurônios estão dispersos e separados por neurópilo (*). Giemsa. Escalas de barra: 20µm..... 46

Figura 11- Fotomicrografia do gânglio estrelado esquerdo (GEe) de um preá Adulto evidenciando um neurônio uninucleado (seta), dois neurônios binucleados (cabeças de seta) e o neurópilo (*). Giemsa. Escala de barra: 20µm..... 47

Figura 12- Fotomicrografia do gânglio estrelado esquerdo (GEe) de um preá Adulto evidenciando neurônios imunorreativos para Ki-67 (setas apontando núcleos destes neurônios uninucleados e cabeças de seta apontando núcleos de um neurônio binucleado ambos corados em marrom). 3,3′-Diaminobenzidine (DAB). Escala de barra: 30µm..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição dos grupos etários e pesos corpóreos médios de preás. São Paulo, Agosto - 2014. 31

Tabela 2- Parâmentros macromorfométricos – comprimento, largura e espessura do GEe de preás dos grupos Neonato, Jovem, Adulto e Senil. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida do seu coeficiente de variação (CV) - São Paulo, Agosto – 2014. 44

Tabela 3- Parâmetros estereológicos - Volume do GEe; Volume total do tecido não neuronal; Volume total do tecido neuronal; Volume médio dos neurônios do GEe (uni; bi) e Volume médio dos neurônios imunorreativos ao KI-67(uni; bi) do GEe de preás dos grupos Neonato, Jovem, Adulto e Senil. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida do seu coeficiente de variação (CV) - São Paulo, Agosto – 2014. 50

Tabela 4- Parâmetros estereológicos - Número total de neurônios do GEe (uni; bi; uni+bi) e Número total de neurônios imunorreativos ao Ki-67 (uni; bi; uni+bi) do GEe de preás dos grupos Neonato, Jovem, Adulto e Senil. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida do seu coeficiente de variação (CV) - São Paulo, Agosto – 2014. 51

LISTA DE SIGLAS

BAVT: Bloqueio Atriventricular Total

ChAT: Colina Acetiltransferase

CE: Coeficiente de erro

CV: Coeficiente de variação

GCS: Gânglio Cervical Superior

GE: Gânglio Estrelado

GEd: Gânglio Estrelado direito

GEe: Gânglio Estrelado esquerdo

GRD: Gânglio da Raiz Dorsal

IP: Intraperitoneal

MI: Infarto do Miocárdio

NGF: *Nerve Growth Factor* (Fator de Crescimento do Nervo)

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

TH: Tirosina Hidroxilase

VD: Ventrículo direito

VE: Ventrículo esquerdo

VIP: Polipeptídeo Intestinal Vasoativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

1.1. HIPÓTESE 18

2 OBJETIVO 20

2.1. PARÂMETROS 20

2.1.1. Macroestrutura do GEe 20

2.1.1.1. Forma e localização 20

2.1.1.2. Macromorfometria: peso, comprimento, largura e espessura 20

2.1.1.3. Volume do GEe (V_{GEe}) 20

2.1.2. Microestrutura do GEe 20

2.1.2.1. Estudo histológico qualitativo 20

2.1.2.2. Número total de neurônios do GEe (N_{GEe}): 20

2.1.2.3. Volume médio dos neurônios do GEe ($\bar{v}_{N\ GEe}$): 20

2.1.2.4. Volume total do tecido neuronal ($V_{tot\ neuronal}$) 20

2.1.2.5. Volume total do tecido não neuronal ($V_{tot\ não\ neuronal}$) 20

2.1.3. Código químico dos neurônios do GEe 20

3 REVISÃO DE LITERATURA 22

3.1. SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO EM ROEDORES 22

3.2. DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL E GÂNGLIO ESTRELADO 23

3.3. PLASTICIDADE NEURONAL DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL 27

3.4. PROLIFERAÇÃO CELULAR 28

4 MATERIAIS E MÉTODOS 31

4.1. MATERIAIS 31

4.2. MÉTODOS 32

4.2.1. Eutanásia, coleta e preparação histológica 32

4.2.2. Código químico dos neurônios do GEe 34

4.2.2.1. Reação de imuno-histoquímica enzimática de campo claro 34

4.2.3. Estudo Estereológico 35

4.2.3.1. Volume do GEe (V_{GEe}) 36

4.2.3.1.1. Coeficiente de Erro da estimativa de volume do GEe 36

4.2.3.1.2. Variação devido à amostragem sistematicamente aleatória ($Var_{(surs)}$): 37

4.2.3.1.3. Variação total e precisão (Var[total]): 37

4.2.3.2. Número total de neurônios do GEe ($N_{totalGEe}$) 37

4.2.3.3. Volume médio dos neurônios do GEe ($\bar{v}_{N\ GEe}$) 40

4.2.3.4. Volume total do tecido neuronal ($V_{tot\ neuronal}$) 41

4.2.3.5. Volume total do tecido não neuronal ($V_{tot\ não\ neuronal}$) 42

4.2.4. Análise estatística inferencial 42

5 RESULTADOS 44

5.1. MACROESTRUTURA DO GEE 44

5.1.1. Forma e localização 44

5.1.2. Macromorfometria *44*
5.2. MICROESTRUTURA DO GEE 45
5.2.1. Estudo histológico qualitativo *45*
5.2.2 Parâmetros estereológicos *49*
6 DISCUSSÃO 53
6.1. PRINCIPAIS ACHADOS 53
6.2. MACROESTRUTURA DO GEE 53
6.2.1. Forma e localização *53*
6.2.2. Macromorfometria *53*
6.2.3. Volume do GEe (V_{GEe}) *54*
6.3. MICROESTRUTURA DO GEE 55
6.3.1. Estudo histológico qualitativo *55*
6.3.2. Número total de neurônios do GEe ($N_{TotalGEe}$) *56*
6.3.3. Volume médio dos neurônios do GEe ($\bar{v}_{N\ GEe}$) *57*
6.3.4. Proliferação celular *58*
7 CONCLUSÃO 61
REFERÊNCIAS 62
ANEXOS 75

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso autônomo (SNA) está envolvido na manutenção da homeostase do sistema circulatório, entre outros sistemas. O coração dos mamíferos é duplamente inervado pelo SNA, apresentando assim uma inervação intrínseca e outra extrínseca (HOU et al., 2007; HASAN; SMITH, 2009; LIN et al., 2009).

A inervação extrínseca compreende nervos provenientes dos gânglios simpáticos paravertebrais: cervicais (gânglio cervical, médio e caudal) e torácicos (SCHERLAG; PO, 2006; HOU et al., 2007; ZHOU et al., 2007; LIN et al., 2009) como, por exemplo, o gânglio estrelado (GE), que é o principal componente da inervação extrínseca do coração, pois dele se originam neurônios e fibras pós-ganglionares para o músculo cardíaco.

O GE é o principal responsável pela inervação simpática para os órgãos da região cervical, cavidade torácica e vasos da extremidade cranial do tórax (MASLYUKOV et al. 2003; MASLYUKOV; TIMMERMANS, 2004; RUIZ-VELASCO et al., 2005; MASLYUKOV et al., 2006; MASLYUKOV et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2009). Está envolvido na gênese de diversas afecções, como: a fibrilação atrial (BATULEVICIUS et al., 2008; SWISSA et al., 2008), a paralisia do nervo trigêmeo (HANAMATSU et al., 2002), a sensibilidade baroreflexa (SONG et al., 2009), as arritmias ventriculares, a hiperidrose e a angina intratável (TAN et al., 2008; LUJAN et al., 2009).

Sob o ponto de vista terapêutico, as técnicas de ablação, eletro-estimulação e bloqueio do GE têm sido utilizadas como tratamento para todas as doenças supracitadas (STRICKMAN; DEAR, 1982; OURIEL; MOSS, 1995; HANAMATSU et al., 2002; LI et al., 2008; SWISSA et al., 2008; TAN et al., 2008; LUJAN et al., 2009; PETERSON et al., 2009; SONG et al., 2009).

Em relação ao desenvolvimento pós-natal (maturação e envelhecimento), especificamente o envelhecimento, pode ocasionar a diminuição das funções fisiológicas e a instalação de doenças degenerativas (RUTTEN et al., 2003). Processos degenerativos similares podem ocorrer sobre o SNA, principalmente na fisiologia do GE (ARMOUR, 1983). As características dos neurotransmissores dos neurônios simpáticos estão sujeitas a mudanças durante este período. A existência de dados discrepantes quanto aos parâmetros morfoquantitativos durante o envelhecimento, como o aumento ou diminuição do número total de neurônios simpáticos é assunto para discussões interessantes (BRUGNARO et al., 2003; FAREL, 2003; MASLYUKOV; TIMMERMANS,

2004; GAGLIARDO et al., 2005; MASLYUKOV, 2005; MASLYUKOV et al., 2006; RIBEIRO, 2006; MASLYUKOV et al., 2007; ABRAHÃO et al., 2009; TOSCANO et al., 2009).

Com o advento de técnicas modernas de estereologia, poderemos contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos neste processo, pois diferentemente de outros métodos morfométricos**,** o delineamento estereológico é acurado e preciso, e tem integrado a política editorial de revistas científicas internacionais de relevância (STERIO, 1984; PAKKENBERG; GUNDERSEN, 1988; MAYHEW; GUNDERSEN, 1996; CAVALCANTI et al., 2009; MELO et al., 2009; HOWARD; REED, 2010; LADD et al., 2012).

Sendo assim, propomo-nos a estudar, quantitativamente e qualitativamente, o desenvolvimento pós-natal dos neurônios do gânglio estrelado do preá (*Galea spixii*, Wagler, 1831), um pequeno roedor, pertencente à ordem Rodentia, família Caviidae, gênero Galea, encontrado em todos os Estados do Nordeste do Brasil, onde são uma importante fonte de proteína animal (LACHER, 1981; BARBOSA et al., 2008).

Este trabalho integra uma das linhas de investigação científica do Laboratório de Estereologia Estocástica e Anatomia Química (LSSCA), na qual foram conduzidas análises sobre os efeitos do desenvolvimento pós-natal em outras espécies e órgãos.

Esta pesquisa experimental poderá contribuir fornecendo base de dados para outros estudos das áreas de cirurgia e neurocirurgia, quanto à localização, topografia e aspectos microestruturais e quantitativos do GE em roedores silvestres (preás), evitando assim intervenções cirúrgicas inacuradas que podem causar injúrias na região cervical, desencadeando disfunções simpáticas.

Espera-se que os resultados gerados por esta pesquisa possam esclarecer alguns aspectos estruturais da plasticidade neural durante o desenvolvimento pós-natal (maturação e envelhecimento) de preás, avançando assim o conhecimento acerca da inervação cardíaca extrínseca.

1.1. Hipótese

Hipotetizamos neste trabalho que, durante o desenvolvimento pós-natal de preás pode ocorrer uma estabilidade no número de neurônios do GEe, possivelmente devido à mecanismos para a manutenção destes neurônios e consequentemente do gânglio estrelado e de seu órgão-alvo (coração).

Objetivo

2 OBJETIVO

Estudar o efeito do desenvolvimento pós-natal (maturação e envelhecimento) na macro e microestrutura do gânglio estrelado esquerdo (GEe) de preás. Para que fosse possível alcançar o objetivo proposto, os seguintes parâmetros foram investigados:

2.1. Parâmetros

2.1.1. Macroestrutura do GEe

2.1.1.1. Forma e localização

2.1.1.2. Macromorfometria: peso, comprimento, largura e espessura

2.1.1.3. Volume do GEe (V_{GEe})

2.1.2. Microestrutura do GEe

2.1.2.1. Estudo histológico qualitativo

2.1.2.2. Número total de neurônios do GEe (N_{GEe}):

a) Número total de neurônios uninucleados (N_{uniGEe})

b) Número total de neurônios binucleados (N_{biGEe})

c) Número total de neurônios uninucleados + binucleados ($N_{totalGEe}$)

2.1.2.3. Volume médio dos neurônios do GEe ($\bar{v}_{N\ GEe}$):

a) Volume médio dos neurônios uninucleados ($\bar{v}_{N\ uniGEe}$)

b) Volume médio dos neurônios binucleados ($\bar{v}_{N\ biGEe}$)

2.1.2.4. Volume total do tecido neuronal ($V_{tot\ neuronal}$)

2.1.2.5. Volume total do tecido não neuronal ($V_{tot\ não\ neuronal}$)

2.1.3. Código químico dos neurônios do GEe

a) Número total de neurônios imunorreativos para Ki-67 uni + bi ($N_{uni+biki-67}$)

b) Volume médio dos neurônios imunorreativos para Ki-67 uni + bi ($\bar{v}_{N\ uni+biki-67}$)

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Sistema nervoso autônomo em roedores

Segundo Song et al. (2009), o sistema nervoso autônomo (SNA) é uma parte essencial do sistema de regulação envolvido na manutenção da estabilidade do sistema circulatório, sendo a função vagal cardíaca um importante mecanismo de homeostasia do batimento cardíaco e da pressão arterial em mamíferos.

Gabella (2004) descreve que os neurônios do SNA estão situados nos gânglios e podem ser divididos sistematicamente em pré-vertebrais, paravertebrais, intramurais e para-viscerais. Em humanos, a cadeia simpática dispõe-se verticalmente, passando pelos colos das costelas na região cósto-vertebral e é facilmente identificada abaixo da pleura parietal (LI et al., 2008).

Nos mamíferos, o SNA possui uma estrutura comum, sendo compreendido pelos neurônios eferentes que inervam toda a musculatura lisa do corpo e glândulas e, pelos neurônios aferentes que recebem e transmitem reflexos e sensações dos órgãos viscerais (GABELLA, 2004).

A inervação autônoma do coração compreende dois contingentes do SNA: extrínseco e intrínseco. O SNA extrínseco consiste em cadeias de gânglios ao longo da medula espinal, portanto, são gânglios paravertebrais, sendo um deles o gânglio estrelado (GE). O SNA intrínseco consiste em gânglios e fibras nervosas que estão localizados no próprio coração (ARDELL et al., 1994; SHERLAG; PO, 2006; HOU et al., 2007; ZHOU et al., 2007; HASAN; LIN et al., 2009; SMITH, 2009).

Os componentes e a estrutura do sistema nervoso cardíaco extrínseco são descritos, predominantemente em roedores, dentre eles as cobaias (LEGER et al., 1999; CALUPCA et al., 2000), os ratos (HANAMATSU et al., 2002; MASLYUKOV; TIMMERMANS, 2004; RUIZ-VESLASCO et al., 2005; MASLYUKOV et al., 2006; FIRAT et al., 2008; CAVALCANTI et al., 2009; HASAN; LUJAN et al., 2009; SMITH, 2009) e os camundongos (MASLYUKOV; TIMMERMANS, 2004; MASLYUKOV et al., 2006).

Neurônios de gânglios simpáticos de mamíferos são geralmente uninucleados. Entretanto, em gânglios de médios e grandes roedores, como cobaias e capivaras, tem sido descrita maior ocorrência de neurônios binucleados (FORSMAN et al., 1989; SASAHARA et al., 2003; RIBEIRO, DAVIS, GABELLA, 2004).

O preá (*Galea spixii*, Wagler, 1831) é um mamífero pertencente à ordem Rodentia, família Caviidae, gênero Galea. Esta espécie tem uma cauda curta, pelos acinzentados na superfície dorsal e brancos na superfície ventral. Estes roedores são morfologicamente semelhantes às demais espécies, porém sua característica diferenciadora é o seu incisivo amarelo. Seu peso ao nascer varia de 75 a 100gr. e, quando adultos, entre 800gr. a 1,5Kg. e comprimento de cerca de 25 a 30cm. Possui hábitos basicamente noturnos (CORRADELLO, 1987; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A vida média destes animais é de quatro anos e, a maturidade sexual (idade adulta resultante) é alcançada em cerca de três meses e senescência a partir da idade de 36 meses (LACHER, 1981; JONES, 1982; NOWAK, 1999; ROWE; HONEYCUTT, 2002; LADD et al., 2012).

Estes roedores são encontrados em todos os estados do Nordeste do Brasil, habitando uma variedade de formações abertas, como savanas do Cerrado, Floresta Atlântica e Caatinga no semi-árido nordestino (LACHER, 1981; BARBOSA et al., 2008) e, possuem crescente importância econômica, representando importante fonte de proteína animal para populações rurícolas pouco favorecidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; ROWE; HONEYCUTT, 2002; WILSON; REEDER, 2005).

Além disso, o preá é um modelo animal apropriado para estudar o desenvolvimento do sistema nervoso simpático, uma vez que eles caem em uma categoria de tamanho corporal que os coloca entre os ratos amplamente estudados e maiores roedores silvestres, como pacas e capivaras (WILSON; REEDER, 2005).

3.2. Desenvolvimento pós-natal e gânglio estrelado

Desenvolvimento pós-natal compreende duas fases, ou seja, maturação (de neonato a adulto) e envelhecimento (de adulto a senil) e, durante estas fases, vários mecanismos adaptativos ocorrem em gânglios simpáticos, embora ainda haja uma carência de conhecimento destes mecanismos (FINCH, 1993; VEGA et al., 1993).

O envelhecimento começou a ter maior importância em ser estudado recentemente nos países em desenvolvimento. Isso ocorreu devido ao aumento acelerado da população acima de 60 anos (longevidade) em relação à população geral (DIAS et al., 2006; BEZERRA et al., 2012).

No Brasil, o número de idosos com idade acima de 60 anos passou de três milhões em 1960 para 20 milhões em 2010, um aumento de 600% em 50 anos e estima-se que em 2020 tal número alcançará 32 milhões. Os sistemas de saúde precisarão arcar com uma crescente demanda por procedimentos diagnósticos e terapêuticos de doenças crônicas não-transmissíveis, principalmente as cardiovasculares e as neurodegenerativas (LIMA-COSTA; VERAS, 2003; BEZERRA et al., 2012).

O processo de envelhecimento é um evento natural e inevitável que ocorre em todas as espécies animais. Nos mamíferos, este processo é associado a déficits celular e das funções fisiológicas levando a maior incidência de doenças degenerativas (SZWEDA et al., 2003).

No sistema nervoso, os efeitos do envelhecimento são evidenciados por um declínio funcional que envolve o sistema nervoso central e periférico. As alterações mais frequentemente relacionadas são a perda de neurônio, a atrofia ou a hipertrofia neuronal (CABELLO et al., 2002). No entanto, estas alterações têm sido discutidas e, já foram relatadas diferenças entre os vários componentes do sistema nervoso e entre espécies animais (FINCH, 1993; VEGA et al., 1993).

A perda neuronal foi muitas vezes associada aos efeitos do processo de envelhecimento do sistema nervoso (WEST, 1994). Pesquisas em meados da década de 1950 demonstraram uma diminuição na densidade neuronal por área no envelhecimento cerebral, mas erradamente descreveram uma diminuição no número total de neurônios (GAGLIARDO et al., 2005). Além disso, com o desenvolvimento de técnicas precisas e procedimentos imparciais para a quantificação de células, foi possível verificar que a diminuição no número total de neurônios não é um padrão durante o processo de envelhecimento (MORRISON; HOF, 1997).

O tronco simpático é uma estrutura bilateral simétrica, estendendo-se da base do crânio até o sacro. Cada tronco simpático cervical tem no mínimo dois gânglios proeminentes, o gânglio cervical superior (ou cranial) e o gânglio cervical inferior (ou caudal) (HEDGER; WEBBER, 1976; BALJET; DRUKKER, 1979; EVANS; SURPRENANT, 1996).

O GE (ou gânglio cervicotorácico) é o maior gânglio do tronco simpático, já que este é a junção dos três primeiros gânglios torácicos com o gânglio cervical caudal e, está localizado ao nível das primeiras vértebras torácicas com forma irregular (Fig. 1) (GABELLA, 2004).

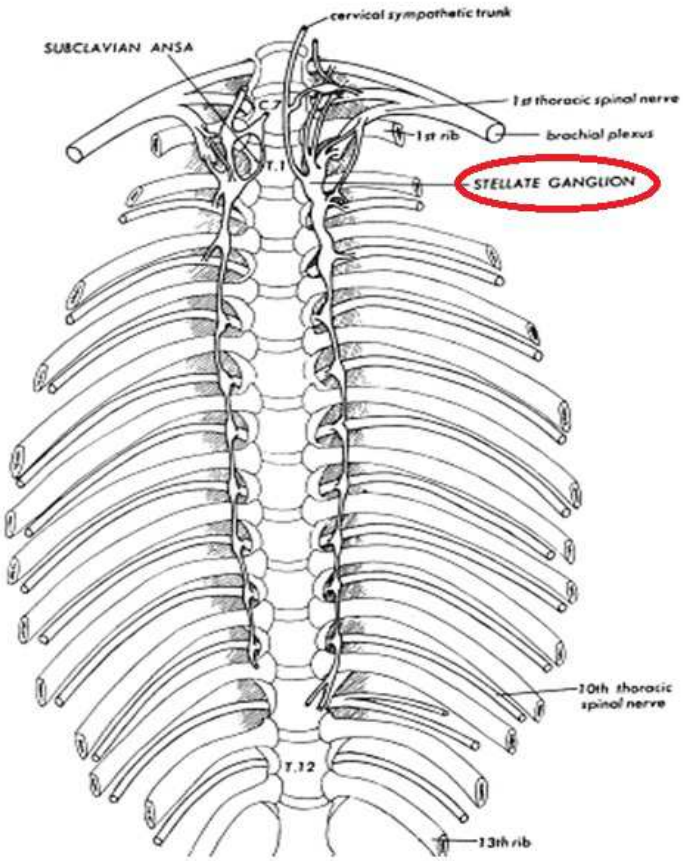

Figura 1- Localização do gânglio estrelado. **Fonte:** Gabella, 2004.

A partir do GE se originam neurônios e fibras nervosas pós-ganglionares que se direcionam para o plexo cardíaco no septo interatrial inervando o músculo cardíaco. O GE é considerado um importante centro de inervação simpática de órgãos da cavidade torácica, pescoço, membros torácicos e vasos da extremidade cranial do tórax (MASLYUKOV et al., 2003; MASLYUKOV; TIMMERMANS, 2004; RUIZ-VELASCO et al., 2005; MASLYUKOV et al., 2006; MASLYUKOV et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2009).

Cao et al. (2000) relataram que a infusão do fator de crescimento do nervo (NGF sigla em inglês para *Nerve Growth Factor*) no gânglio estrelado esquerdo (GEe) induz brotamento do nervo cardíaco e hiperinervação simpática, tanto em cães normais e em cães com infarto do miocárdio (MI) e bloqueio atriventricular total (BAVT). É provável que a infusão de NGF no gânglio estrelado direito (GEd) reduza a incidência de arritmia e morte súbita cardíaca devido a redução do tônus simpático e, a estimulação do GEe leva ao prolongamento do intervalo QT, enquanto que esta estimulação do GEd induz à redução do intervalo QT (ZHOU et al., 2001; ZHOU et al., 2005).

Estudos relatam que a infusão do NGF no GEe é pró-arrítmico (SCHWARTZ; STONE 1980; CINCA et al., 1985; VASEGHI et al., 2012), o que pode induzir a hiperinervação simpática (SCHWARTZ et al., 1998; CAO et al., 2000; ZHOU et al., 2005). Sob o ponto de vista terapêutico, estudos analisam os efeitos das técnicas de ablação, eletroestimulação e bloqueio do GEe para tratamento e prevenção das cardiomiopatias, como: a fibrilação atrial, as arritmias ventriculares e a morte súbita cardíaca em pacientes com doenças cardiovasculares (CINCA et al., 1985; CAO et al., 2000; DOCIMO et al., 2008), pois através destes tratamentos é possível reduzir a incidência das doenças supracitadas, que tem sido associadas à hiperinervação simpática e, assim, diminuir as taxas de morbidade e mortalidade desses pacientes (DOCIMO et al., 2008 ; WOOD et al., 2010; WINTERS et al., 2012).

Além disso, estudos eletrofisiológicos têm mostrado uma predominância para a inervação da parede anterior do ventrículo esquerdo (VE) e ventrículo direito (VD) através do GEd enquanto que esta inervação para a parede posterior do VE e VD ocorre através do GEe, representando uma inervação heterogênea coordenada para regular a função cardíaca (UEDA et al., 1964; YANOWITZ et al., 1966; RAMIREZ et al., 2011; ZHOU et al., 2012), entretanto estes efeitos funcionais não estão bem estabelecidos na literatura.

De acordo com algumas observações, a maturação do sistema nervoso simpático em mamíferos termina ao final do segundo mês de vida (FRIEDMAN et al., 1968; HADDAD; ARMOUR, 1991). Resultados dos estudos de Maslyukov (2005) com GE de gatos evidenciam que, os neurônios da medula espinal que emitem fibras para o GE se alteram no início do desenvolvimento pós-natal. O número destes neurônios aumenta até o décimo dia de vida e depois diminui até os seis meses de idade, o que corrobora o decréscimo do número de neurônios pós-ganglionares durante este período.

Um estudo imuno-histoquímico realizado para investigar o desenvolvimento pós-natal de neurônios no GE de ratos e camundongos demonstra que, durante a fase pós-natal, a proporção de neurônios expressando o Polipeptídeo Intestinal Vasoativo (VIP), Tirosina Hidroxilase (TH), bem como Colina Acetiltransferase (ChAT) aumentou desde o nascimento até o décimo dia de vida e teve um decréscimo gradativo após esse período (MASLYUKOV; TIMMERMANS, 2004).

Na ontogênese pós-natal, os elementos neurais do GE passam por estágios de desenvolvimento acompanhados pela reorganização morfológica e funcional

(MASLIUKOV et al., 2000a). O número e tamanho médio dos neurônios que inervam diferentes órgãos-alvo se alteram no decorrer do desenvolvimento pós-natal do animal (MASLIUKOV et al., 2000b).

3.3. Plasticidade neuronal durante o desenvolvimento pós-natal

Análises dos neurônios em gânglios cervicais superiores (GCS) de ratos adultos jovens sobre intervalos de até três meses mostram que os dendritos destes neurônios mudam durante este intervalo, alongando-se, retraindo-se ou até mudando seu formato (PURVES; HADLEY; VOYVODIC, 1986).

Em relação à ocorrência de neurônios binucleados, Eranko (1972) cita que em GCS de ratos ocorrem mitoses nos neurônios após o nascimento. No entanto, o número total final de neurônios é estabelecido durante a vida fetal, e que a partir da primeira semana após o nascimento, o número de neurônios principais permanece inalterado ou mostra um pequeno decréscimo. Com isso, Forsman et al. (1989) sugerem que a ocorrência de células neuronais binucleadas pode ser devido a uma interrupção de mitoses durante o processo de diferenciação das mesmas. A determinação dos tipos neuronais pode ser verificada também quanto à sua funcionalidade (GUADIX et al., 1979).

Toscano et al. (2009) demonstram alterações em relação ao número de neurônios uninucleados e binucleados durante o desenvolvimento pós-natal em GCS de cobaia, e levantam a hipótese de que a qualidade da inervação ao longo do desenvolvimento possa explicar as mudanças na estrutura do neurônio nesse período. A significância funcional desse fenômeno de células binucleadas ainda não é conhecida, mas é possível, segundo os mesmos autores, que a ocorrência de dois núcleos seja uma adaptação a alguma demanda específica imposta às células em função de maior síntese protéica.

Smith (1970) reportou que as células binucleadas marcam presença no momento do desenvolvimento da inervação do coração quando os neuroblastos imaturos observados em estágios recentes estão aparecendo em pequeno número e quando sua migração, através das fibras nervosas, passando pelo plexo cardíaco, está quase terminada. Células binucleadas têm sido reportadas em roedores silvestres brasileiros, 36% e 13% em capivaras jovens e adultas, respectivamente (RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004; RIBEIRO, 2006).

Não obstante, autores ainda têm postulado sobre o significado funcional da binuclearidade, por exemplo, Ribeiro (2006) sugeriu que a ocorrência de dois núcleos nas células ganglionares simpáticas no GCS de capivaras representaria uma adaptação compensatória ao bloqueio do processo mitótico e, portanto, ocorreria uma diferenciação tardia destas mesmas células.

Farel (2003) cita que, em ratos, o número de neurônios no gânglio de raiz dorsal (GRD) lombar é quase 35% maior em adultos do que em neonatos, sem proliferação neuronal. Este resultado sugere que o GRD de ratos jovens contém uma população de neurônios que não sofre diferenciação completa, vindo esta a ocorrer tardiamente durante a fase pós-natal.

Populações de neurônios do GE com diferentes códigos químicos se desenvolvem em momentos diferentes. Existem populações separadas de neurônios que têm diferenças em termos de localização, tamanho e características histoquímicas e funcionais (MASLYUKOV et al., 2006).

3.4. Proliferação celular

A proliferação celular é o aumento do número de células que são resultantes da complementação do ciclo celular através de uma cascata de eventos que asseguram a duplicação fiel dos componentes celulares em uma sequência lógica e, a divisão destes componentes em duas células filhas (LEVINE et al., 1994). O ciclo celular é composto por quatro fases distintas: o período antes da síntese de DNA (G1), a fase de síntese de DNA (S), o período após a replicação do DNA (G2) e a fase mitótica (M) que é o ponto mais elevado na divisão celular (LEVINE et al., 1994; RABENHORST et al., 1994). As células fora do ciclo celular estão na fase de repouso (G0) e, podem permacer nesta fase por tempo indeterminado (HALL; LEVINSON, 1990; ALBERTS et al., 1994; RABENHORST et al., 1994).

Dois grupos de marcadores de proliferação celular podem ser distinguidos: análogos de base nitrogenada e marcador de proliferação celular endogênica. Por ser um marcador endógeno de células em proliferação, o Ki-67 é um indicador muito seguro porque é expresso durante a mitose e tem uma meia-vida curta. Além disso, pode ser facilmente detectado por imuno-histoquímica. Assim, embora o papel do Ki-67

permaneça desconhecido, parece ser um bom marcador para a detecção de células proliferantes durante a neurogênese do cérebro adulto (KIM et al., 2009).

O Ki-67 é uma proteína nuclear não-histona expressa altamente nas células em fase G1, S, G2 e M do ciclo celular, mas ausente nas células em repouso. Pode ser utilizado para medir a fração de crescimento normal dos tecidos e também para tumores malignos. Ultimamente, a proliferação celular tem sido medida pela expressão do Ki-67 (IAMAROON et al., 2004).

A atividade proliferativa de qualquer tecido, ou neoplasia, pode ser determinada pela taxa de crescimento, isto é, o número de células ciclizantes e o tempo que estas levam para completar este ciclo (BROWN; GATTER, 1990). O Ki-67 avalia o número de células presentes no ciclo celular, mas não fornece informações sobre o tempo em que cada célula completa o seu ciclo celular, sendo assim, é perfeitamente possível que um grande número de células positivas não indique uma alta atividade proliferativa, e sim um maior tempo de permanência no ciclo (ARISAWA et al., 1999).

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Esta pesquisa foi conduzida utilizando-se 20 gânglios estrelados esquerdos (GEe) de 20 preás machos (*Galea spixii)* (Fig. 2), oriundos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-árido Nordestino (UFERSA), Mossoró – RN, entidade credenciada e registrada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) como criadouro científico sob registro n° 1478912.

Os procedimentos usados no estudo foram aprovados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** da **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP)** (2242/2011) e pelo **Comitê de Ética em Pesquisa** da **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP)** (273/11).

Estes animais foram alocados, posteriormente, em quatro grupos, contendo cinco animais cada um, de acordo com a fase etária do desenvolvimento pós-natal, como evidenciado na Tabela 1.

Tabela 1- Distribuição dos grupos etários e pesos corpóreos médios de preás. São Paulo, Agosto - 2014.

Grupo etário (n=5)	**Idade**	**Peso corpóreo médio (g)/ Desvio Padrão (DP) (g)**
Neonato	01 a 03 dias	48 ± 2DP
Jovem	01 mês	187 ± 2DP
Adulto	12 meses	338 ± 2DP
Senil	36 meses	347 ± 2DP

Figura 2- Preá, G*alea spixii* do grupo Adulto. Escala de barra: 5cm

4.2. Métodos

4.2.1. Eutanásia, coleta e preparação histológica

Os animais foram previamente tranquilizados com aplicação de azaperone (4mg/kg) intraperitoneal (IP), seguida da aplicação de sulfato de atropina (0,06mg/kg) (IP). Para a eutanásia, o cloridrato de quetamina (20mg/kg) foi associado ao cloridrato de xilazina (1,5mg/kg), ambos na mesma seringa, e foi injetado também por via IP, visando a indução da anestesia. Subsequentemente, os animais receberam uma sobredose de anestésico: tiopental sódico (80mg/100g) (IP).

Por meio de uma incisão mediana e ventral desde o manúbrio até o processo xifóide e secção das junções costo-condrais, foi realizada a exposição da cavidade torácica com fácil acesso ao coração. Uma cânula bulbada foi introduzida no ventrículo esquerdo e foi perfundida uma solução de lavagem (PBS, nitrito de sódio e heparina), seguido da solução fixadora: formaldeído (4%) em PBS (pH 7,4; 0,1 M).

Os GEes (Fig. 3) foram dissecados e ainda medidos nos seus três eixos: comprimento, largura e espessura, usando o paquímetro digital Digimess e pesados em

balança analítica Q-500L210C Quimis. Posteriormente, os gânglios foram imersos em solução fixadora de formaldeído (4%), permanecendo nesta por um período de 48 horas. À seguir, os gânglios foram embebidos em solução aquosa de Ágar (10%), gerando assim estruturas circulares e, isotropizados pelo método *do* "*i-sector*", em que cada gânglio foi seccionado de maneira randômica, através da rotação destas estruturas circulares, não permitindo que fosse escolhido a orientação que o GEe seria cortado, tendo então o seccionamento deste material tanto na vertical, como na horizontal e na diagonal (NYENGAARD; GUNDERSEN, 1992) (Fig. 4). Subsequentemente, os GEes foram crioprotegidos com solução de 15% de sacarose em PBS por 24 horas, congelados em isopentano e nitrogênio líquido, seccionados exaustivamente em criostato à espessura de 20µm e, finalmente, montados em lâminas cobertas com *Poly-lisine* para maior aderência das criosecções e corados com GIEMSA e desidratas em séries crescentes de álcoois (Merck).

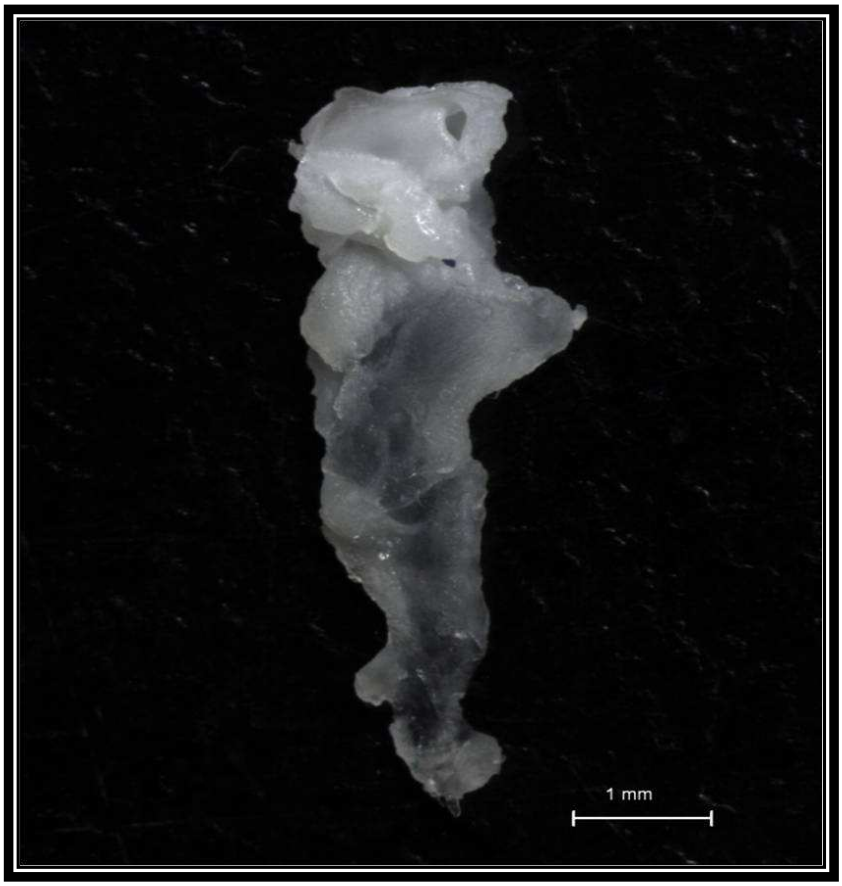

Figura 3- Gânglio estrelado esquerdo (GEe) do grupo Adulto. Escala de barra: 1mm

Figura 4- Gânglios isotropizados através do método *do i*-sector

4.2.2. Código químico dos neurônios do GEe

4.2.2.1. Reação de imuno-histoquímica enzimática de campo claro

A reação de imuno-histoquímica foi conduzida de fato nos cortes histológicos - do GEe - anteriormente montados em lâminas (vide seção 4.2.1). As secções histológicas foram processadas como se segue: bloqueios de avidina, biotina e da peroxidase endógena, utilizando-se "kits" anti-avidina, anti-biotina (Vector) e peróxido de hidrogênio (1% em $H_2O_{destilada}$) durante 30 minutos, seguido de bloqueio com soro normal de cabra (10% em PBS, pH 7,4, 0,1M) durante uma hora, outra lavagem em PBS (15 minutos) e incubação individualizada no anticorpo primário produzido em coelho anti-Ki-67 humano (1:100) durante 24 horas. A seguir, as secções foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário produzido em caprino, conjugadas com "horseradish peroxidase" (HRP) (1:200) (por três horas). Subsequentemente, uma nova lavagem foi feita com PBS e a reação finalmente visualizada com a "3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride" (DAB, Sigma) por 3 minutos. Posteriormente, as criosecções foram lavadas em PBS (15 minutos), desidratadas em séries crescentes de

etanóis e xilóis, montadas sob lamínula com DPX (Fluka) (STEELE et al., 2006; KIM et al., 2009), e à seguir, visualizadas por meio da estação de microscopia de luz Leica DM 6000.

4.2.3. Estudo Estereológico

Os parâmetros estereológicos descritos à seguir foram estimados por meio do software estereológico *newCAST™ by Visiopharm* (Versão 4.5.1.324).

A amostragem do GEe (Fig. 5) foi sistemática e uniformemente aleatória (SURS) (GUNDERSEN et al., 1999).

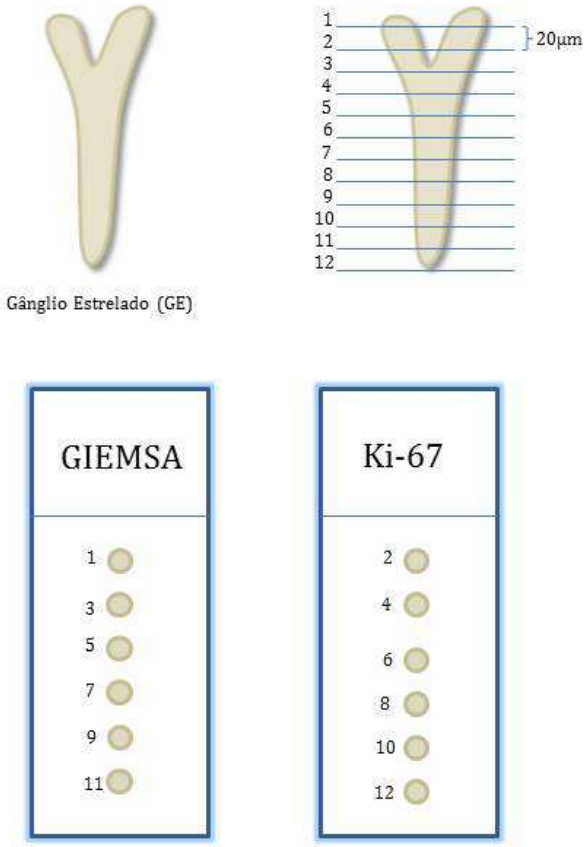

Figura 5- Esquema representando a amostragem do GEe de forma sistemática e uniformemente aleatória (SURS). (As escalas entre as diferentes etapas não correspondem à escala real).

4.2.3.1. Volume do GEe (V_{GEe})

Para estimar o volume do GEe usou-se o Princípio de Cavalieri (MAYHEW; OLSEN, 1991), que foi aplicado em criosecções (Fig. 6). O GEe foi cortado seccionado por inteiro (sequencialmente), gerando um conjunto de criosecções com espessura média T= 20 µm. A localização da primeira secção foi tomada como um número aleatório entre 1-K como o procedimento adotado por Ribeiro; Davis; Gabella (2004).

A seguinte fórmula foi usada para estimar o volume do gânglio:

$$V_{GEe} := T.K.\sum p.a / p$$

Onde:

T = espessura média das secções ganglionares

K= distância entre as secções

a/p= área de cada secção histológica do GEe

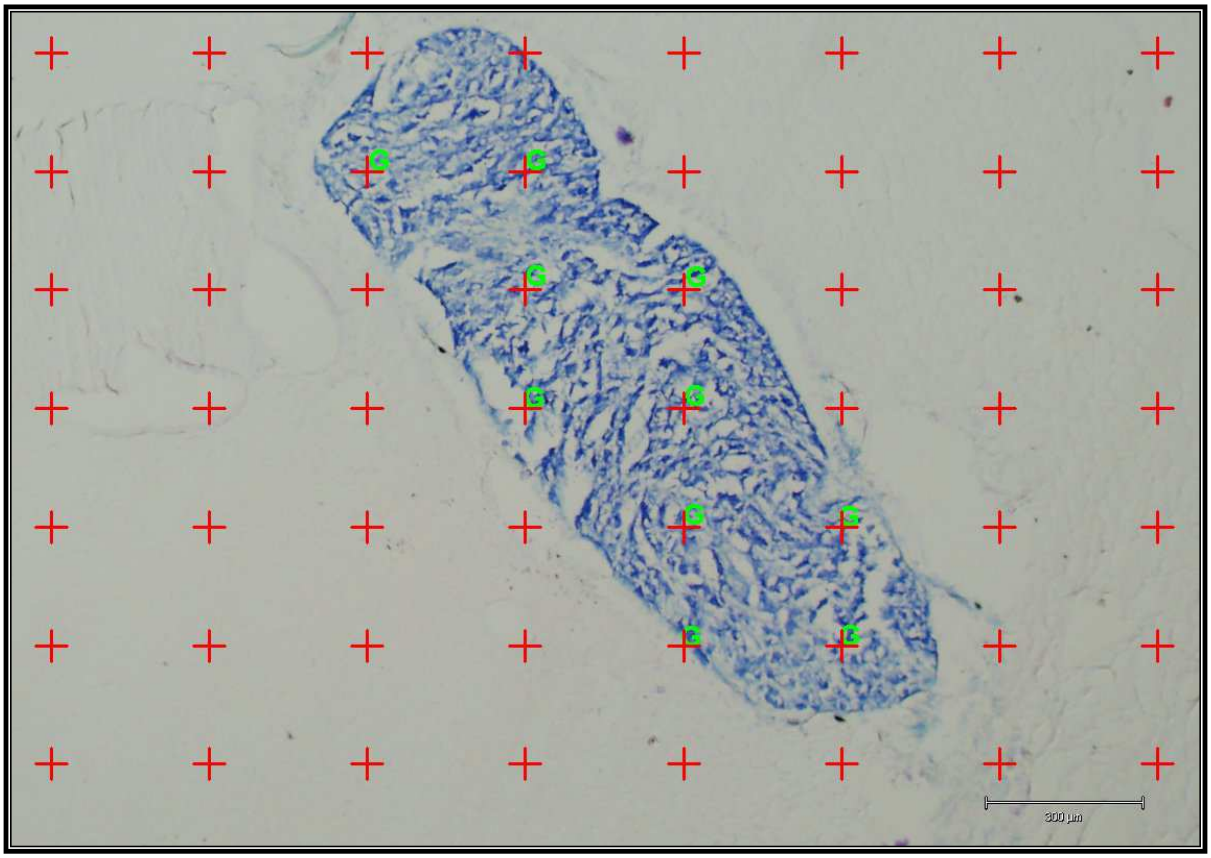

Figura 6- Fotomicrografia do GEe de preá do grupo Senil demonstrando a aplicação do Princípio de Cavalieri para a estimativa do volume ganglionar através do sistema teste de pontos ((a/p) 21.586,19 µm²). Giemsa. Escala de barra: 300µm.

Variância "noise" da contagem de pontos:

Var [noise] := c. (b/√a).(√n. ΣP)

Onde **c** é uma constante (c = 0,0724)
b/√a expressa a forma ou complexidade dos perfis analisados
n é o número de secções utilizadas
ΣP é o número total de pontos utilizados para estimar a área das secções

4.2.3.1.2. Variação devido à amostragem sistematicamente aleatória (Var $_{(surs)}$):

$Var_{(surs)}$:= (3(A – $Var_{(noise)}$) – 4B+C)/240

4.2.3.1.3. Variação total e precisão (Var[total]):

Var[total] := ($Var_{(noise)}$ + $Var_{(surs)}$)/(∑P)^2
CE := Var[total]

4.2.3.2. Número total de neurônios do GEe ($N_{totalGEe}$)

- Número total de neurônios uninucleados, número total de neurônios binucleados e número total de neurônios imunorreativos para Ki-67

De acordo com o método do *Fractionator óptico*, que é uma combinação do *fractionator* (um princípio de amostragem) com o disector óptico, os neurônios foram amostrados em planos focais ópticos sucessivos (Fig. 7) e, os núcleos que foram surgindo em foco e elegíveis pelos critérios estereológicos, foram contados em diferentes alturas, estimando-se o número total de neurônios uninucleados (N_{uniGEe}), binucleados (N_{biGEe}) e total (uni+bi) ($N_{totalGEe}$) do GEe para população inespecífica (GIEMSA) e específica (Ki-67). Em seguida, multiplicou-se o número total de partículas amostradas pelo inverso das

frações de amostragem (GUNDERSEN et al., 1988, GUNDERSEN, 2002; ANDERSEN et al., 2003), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$N := \sum Q^{-} . \frac{1}{ssf} . \frac{1}{asf} . \frac{1}{hsf}$$

Onde:
ssf é a fração das secções amostradas
asf é a fração de área de cada secção usada para a quantificação
hsf é a fração da espessura da secção efetivamente utilizada para contagem
Q^{-} é o número de neurônios amostrados em disectors ópticos

Com o método descrito acima, foram estimados o número total de neurônios uninucleados (N_{uniGEe}) e o número total de neurônios binucleados (N_{biGEe}). Adicionalmente, estimamos o número total de neurônios ($N_{totalGEe}$) obtido pelo somatório de N_{uniGEe} e N_{biGEe}.

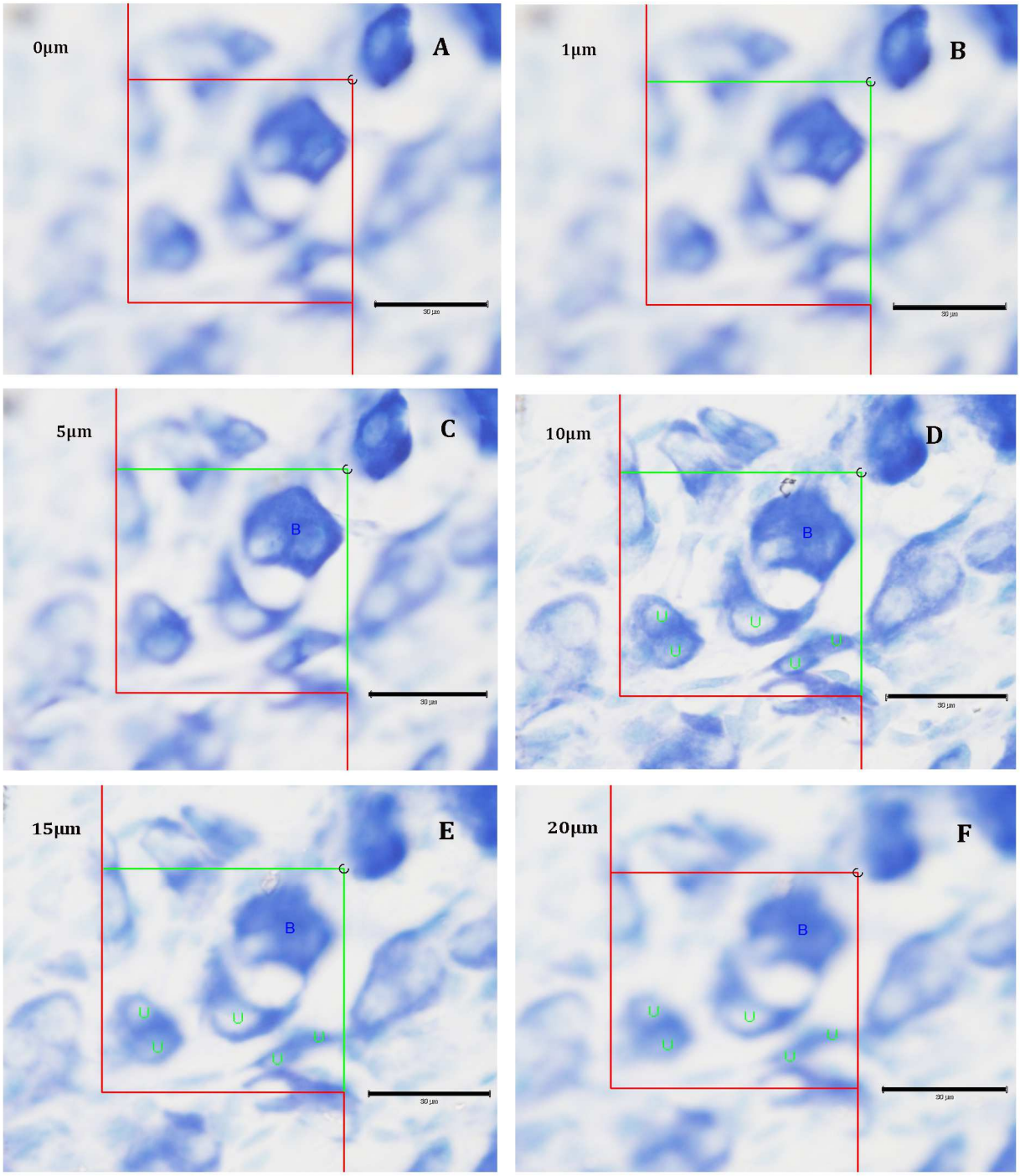

Figura 7- Fotomicrografias de secções histológicas sequenciais do GEe de um preá do grupo Senil, exemplificando a aplicação do método do Disector óptico em que neurônios uni (U) e binucleado (B) foram amostrados em planos focais ópticos sucessivos (A, B, C, D, E e F) espaçados em 5 µm e, os núcleos que foram surgindo em foco e elegíveis pelos critérios estereológicos, foram contados em diferentes alturas. Giemsa. Escalas de barra: 30µm.

4.2.3.3. Volume médio dos neurônios do GEe ($\bar{v}_{N\ \mathrm{GEe}}$)

- Volume médio dos neurônios uninucleados, volume médio dos neurônios binucleados e volume médio dos neurônios imunorreativos para Ki-67

O volume neuronal foi estimado pelo método do *Rotator planar* (Fig. 8). Este método permite estimar o volume médio e a distribuição volumétrica das partículas, independentemente da sua forma, distribuição ou orientação (VEDEL-JENSEN; GUNDERSEN, 1993).

A seguinte fórmula foi utilizada para a estimativa do volume neuronal:

$$\bar{v}_N := \pi \,.\, \mathrm{t} \,.\sum_{\mathrm{i}} l_i^2$$

Onde**:** l_i^2 é uma distância medida a partir de um ponto fixo da célula ou fora dela, até uma borda arbitrariamente escolhida na mesma. As estimativas para $\bar{v}_N$ foram feitas separadamente**:** volume médio de neurônios uninucleados ($\bar{v}_{N\ \mathrm{uniGEe}}$) e volume médio de neurônios binucleados ($\bar{v}_{N\ \mathrm{biGEe}}$).

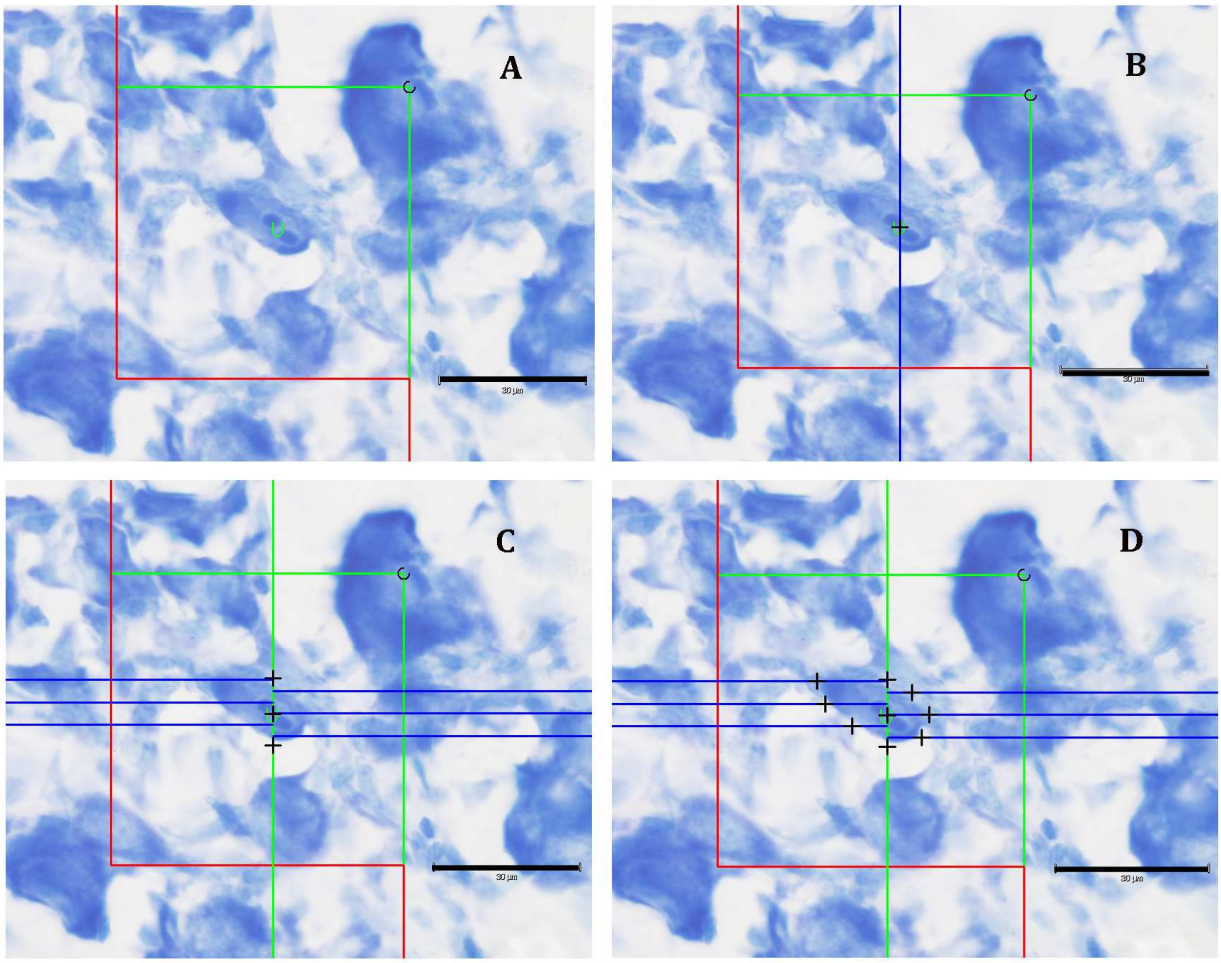

Figura 8- Fotomicrografias do GEe de um preá do grupo Neonato, exemplificando a aplicação do método Rotator planar, em que um neurônio uninucleado foi elegível e teve o seu volume médio estimado. Giemsa. Escalas de barra: 30µm.

4.2.3.4. Volume total do tecido neuronal ($V_{tot\ neuronal}$)

O volume do tecido neuronal foi calculado indiretamente, multiplicando o número total de neurônios uninucleados (N_{uniGEe}) pelo volume médio dos neurônios uninucleados ($\bar{v}_{N\ uniGEe}$) e, o número total de neurônios binucleados (N_{biGEe}) pelo volume médio dos neurônios binucleados ($\bar{v}_{N\ biGEe}$), obtendo o volume total de neurônios uninucleados e binucleados. Em seguida, calculou-se o volume total do tecido neuronal através do somatório do volume total de neurônios uninucleados com o volume total dos neurônios binucleados dos GEes (de LIMA et al., 2007).

A seguinte fórmula foi utilizada para a estimativa do volume do tecido neuronal:

$$Vtot_{neuronal} = (N_{uniGEe} \cdot \bar{v}_{N\,uniGEe}) + (N_{biGEe} \cdot \bar{v}_{N\,biGEe})$$

4.2.3.5. Volume total do tecido não neuronal ($V_{tot\ não\ neuronal}$)

O volume do tecido não neuronal foi indiretamente calculado subtraindo-se o volume total do tecido neuronal ($V_{tot\ neuronal}$) do volume do GEe (V_{GEe}) (HOWARD; REED, 2010).

A seguinte fórmula foi utilizada para a estimativa do volume do tecido não neuronal:

$$Vtot_{Nãoneuronal} = V_{GEe} - Vtot_{neuronal}$$

4.2.4. Análise estatística inferencial

A análise estatística foi conduzida com o auxílio do software estatístico Minitab, versão 16 (2010). As médias e distribuições de frequências de cada grupo foram comparadas pelo teste one-way ANOVA. Para os parâmetros que apresentaram diferenças significantes entre grupos ($p \leq 0,05$), foram aplicados os testes *post-hoc* de comparações múltiplas: Tukey e Fisher.

Nos resultados, os valores representam a média de cada grupo seguida de seu coeficiente de variação (CV) sendo este último o quociente entre o desvio padrão e a média. O coeficiente de erro (CE) das estimativas estereológicas foi calculado de acordo com Gundersen et al. (1999).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1. Macroestrutura do GEe

5.1.1. Forma e localização

Em todos os animais, independentemente dos grupos etários, os GEes tinham forma irregular e, em seu polo cranial, observamos que o tronco simpático se continuava como alça subclávia que, por sua vez, se fusionava ao gânglio cervical médio. Quanto à sua localização, não houve alterações macroscópicas, sendo identificados dorsalmente ao nível da primeira e segunda vértebra torácica. O polo caudal do GEe se continuava como tronco simpático torácico.

5.1.2. Macromorfometria

Tabela 2- Parâmentros macromorfométricos – comprimento, largura e espessura do GEe de preás dos grupos Neonato, Jovem, Adulto e Senil. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida do seu coeficiente de variação (CV) - São Paulo, Agosto – 2014.

Variáveis	Neonato	Jovem	Adulto	Senil
Comprimento (mm)*	4,35 (0,21)[a]	7,50 (0,14) [a]	6,57 (0,08) [a]	6,77 (0,14) [a]
Largura (mm)[NS1]	1,33 (0,45) [a]	1,30 (0,32) [a]	1,34 (0,36) [a]	1,26 (0,41) [a]
Espessura(mm)[NS2]	0,69 (0,19) [a]	0,69 (0,34) [a]	0,93 (0,23) [a]	0,86 (0,35) [a]

[a, b, c,] Médias assinaladas com uma mesma letra não diferem entre si, estatisticamente. Porém, médias assinaladas com letras diferentes, diferem significativamente. *p=0,0001; [NS](Não Significante) [NS1]p=0,993; [NS2]p=0,297.

Foi possível observar qualitativamente essa diferença no comprimento do gânglio entre o grupo Neonato e os demais grupos (Fig. 9).

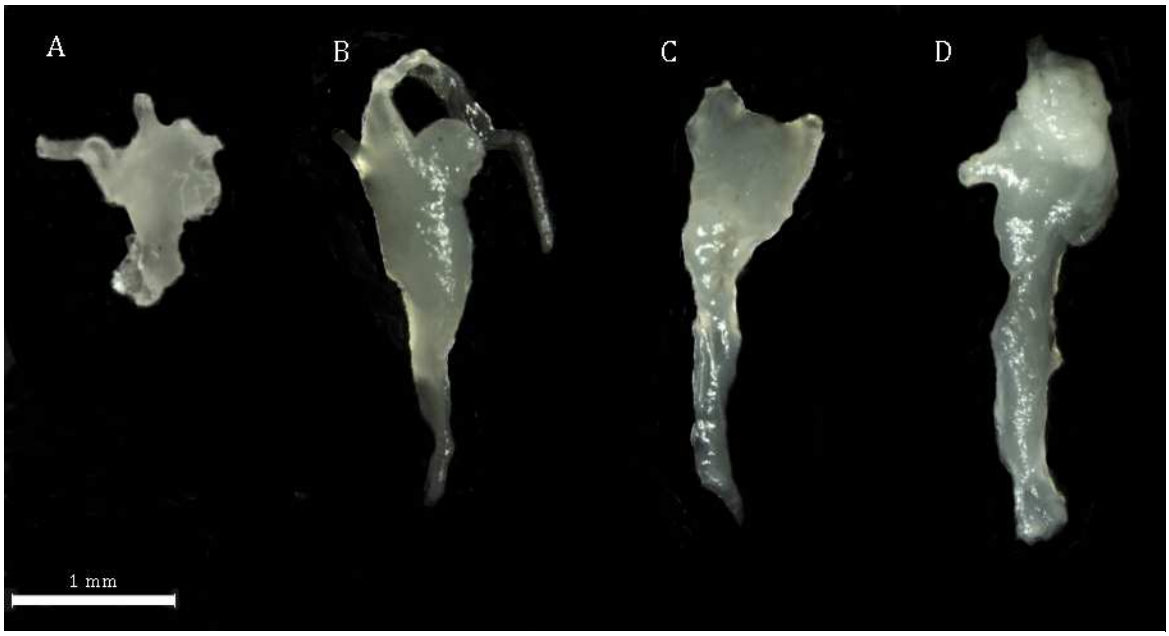

Figura 9- Fotomacrografia dos gânglios estrelados esquerdos de preás do grupo Neonato (A), Jovem (B), Adulto (C) e Senil (D) demonstrando a diferença macromorfométrica para o comprimento. Escala de barra: 1mm.

5.2. Microestrutura do GEe

5.2.1. Estudo histológico qualitativo

Os gânglios estrelados esquerdos consistiam de aglomerados de neurônios separados por fibras nervosas, vasos sanguíneos e septos de tecido conjuntivo proeminente. Os perfis dos neurônios eram circulares ou, mais comumente, ovais. Qualitativamente os neurônios foram densamente distribuídos nos grupos Neonato e Jovem, mas nos grupos Adulto e Senil, os neurônios eram distantes e separados por espaços ocupados principalmente por neurópilo (neuritos e processos gliais) e por vasos sanguíneos e tecido conjuntivo (Fig. 10). Foi possível observar na microestrutura do GEe de preás os seguintes tipos celulares: neurônios uninucleados, neurônios binucleados e neurópilo (Fig. 11).

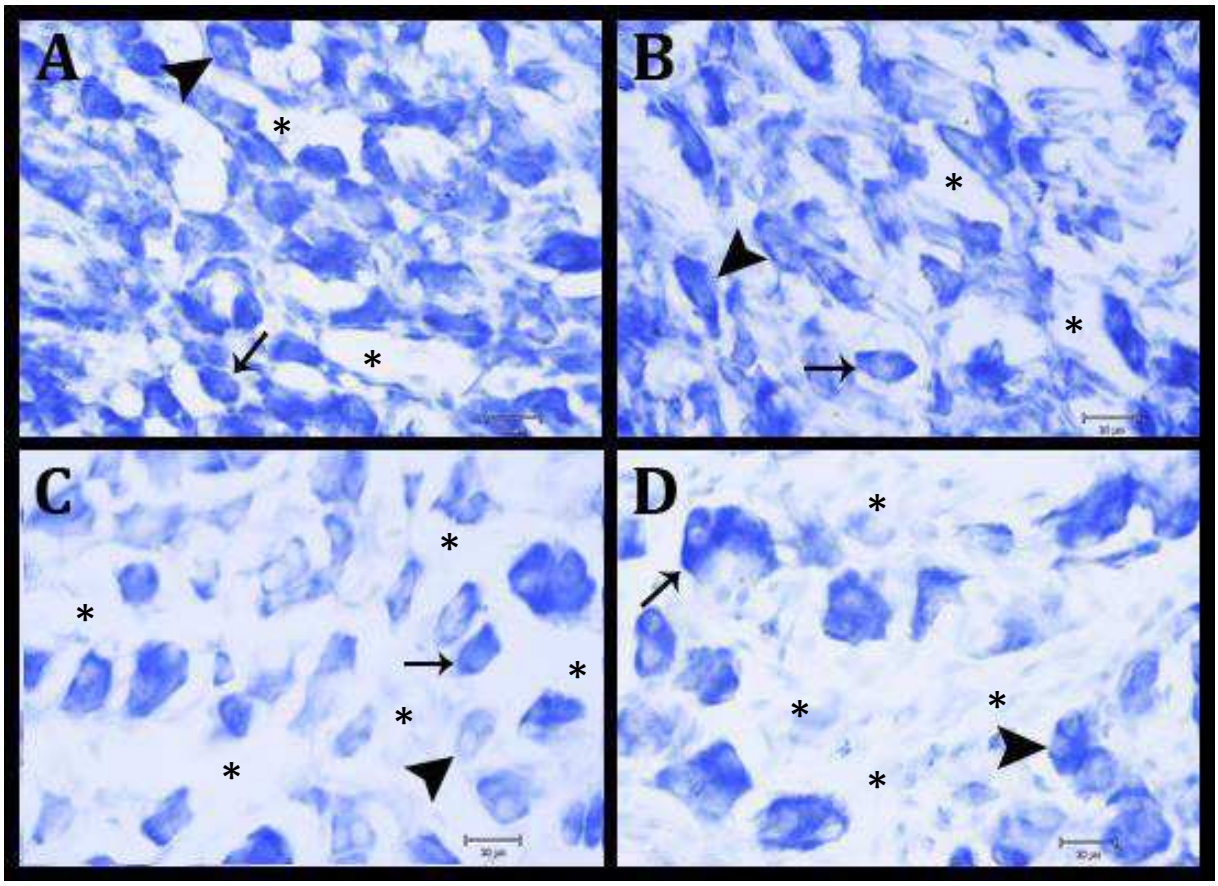

Figura 10- Fotomicrografia do gânglio estrelado esquerdo (GEe) de preás dos grupos Neonato (A), Jovem (B), Adulto (C) e Senil (D). Observam-se neurônios uninucleados (setas) e binucleados (cabeças de seta) que são densamente distribuídos nos animais Neonatos e Jovens, embora, nos animais dos grupos Adulto (C) e Senil (D), os neurônios estão dispersos e separados por neurópilo (*). Giemsa. Escalas de barra: 20µm.

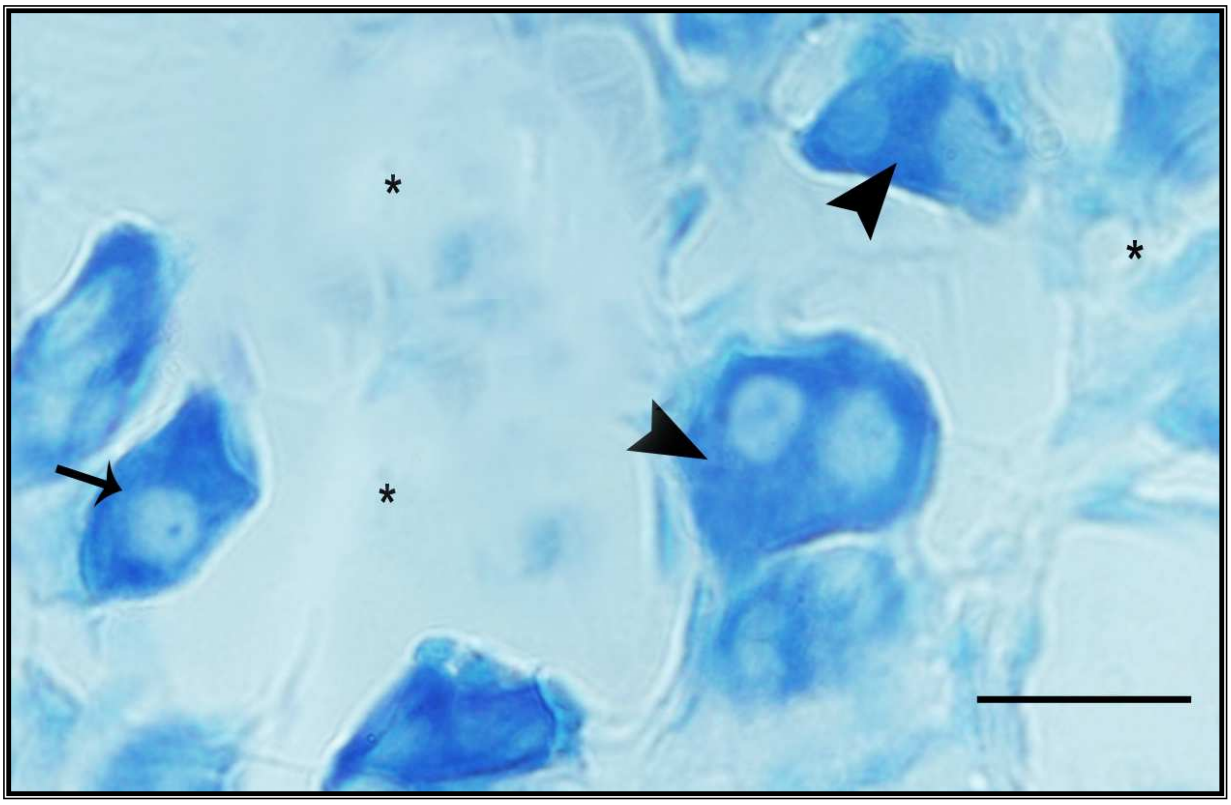

Figura 11- Fotomicrografia do gânglio estrelado esquerdo (GEe) de um preá Adulto evidenciando um neurônio uninucleado (seta), dois neurônios binucleados (cabeças de seta) e o neurópilo (*). Giemsa. Escala de barra: 20μm.

5.2.1.1. Código químico dos neurônios do GEe

Foi realizado imuno-histoquímica para o marcador de ciclo celular Ki-67, os quais foram adaptados para cortes histológicos espessos. Foram identificados neurônios do GEe de preás imunorreativos para esta proteína (Fig. 12).

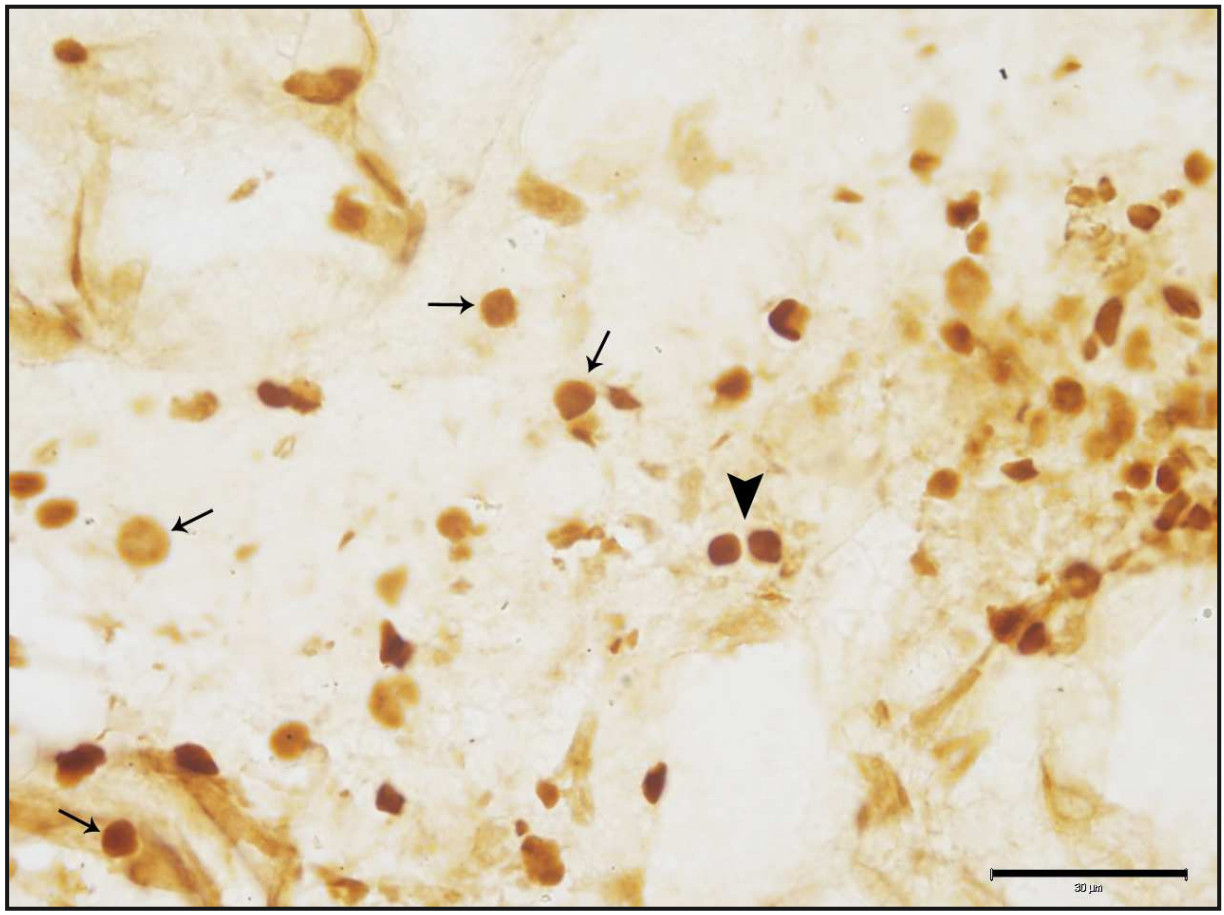

Figura 12- Fotomicrografia do gânglio estrelado esquerdo (GEe) de um preá Adulto evidenciando neurônios imunorreativos para Ki-67 (setas apontando núcleos destes neurônios uninucleados e cabeças de seta apontando núcleos de um neurônio binucleado ambos corados em marrom). 3,3′-Diaminobenzidine (DAB). Escala de barra: 30µm.

5.2.2 Parâmetros estereológicos

- Volume do GEe (V_{GEe}), Volume total do tecido neuronal ($V_{tot\ neuronal}$), Volume total do tecido não neuronal ($V_{tot\ não\ neuronal}$), Número total de neurônios do GEe ($N_{TotalGEe}$) e Volume médio dos neurônios do GEe ($\bar{v}_{N\ GEe}$),

Os valores para os parâmetros Volume do GEe, Volume médio dos neurônios uninucleados e binucleados do GEe (GIEMSA e Ki-67), Volume total do tecido neuronal e Volume total do tecido não neuronal, estão sumarizados na Tabela 2. Os valores para Número de neurônios uninucleados, binucleados e total do GEe (GIEMSA e Ki-67), estão sumarizados na Tabela 3.

Os valores médios do Coeficiente de erro (CE) para o Volume do GEe (V_{GEe}) nos grupos etários estudados foram: Neonato - 2,82%; Jovem - 3,1%; Adulto - 2,36% e Senil - 6,6%.

Tabela 3- Parâmetros estereológicos - Volume do GEe; Volume total do tecido não neuronal; Volume total do tecido neuronal; Volume médio dos neurônios do GEe (uni; bi) e Volume médio dos neurônios imunorreativos ao KI-67(uni; bi) do GEe de preás dos grupos Neonato, Jovem, Adulto e Senil. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida do seu coeficiente de variação (CV) - São Paulo, Agosto – 2014.

Variáveis	Neonato	Jovem	Adulto	Senil
Volume do GEe (mm^3)*	0,702 (0,33)[b]	0,954 (0,38)[ab]	1,904 (0,45)[a]	1,576 (0,33)[ab]
Volume total do tecido não neuronal (mm^3)**	0,4160 (0,37)[b]	0,6470 (0,55)[b]	1,530 (0,44)[a]	1,116 (0,37)[ab]
Volume total do tecido neuronal (mm^3)[NS1]	0,2852 (0,33)[a]	0,3068 (0,55)[a]	0,3748 (0,51)[a]	0,4604 (0,35)[a]
Volume médio dos neurônios Uni do GEe (μm^3)[NS2]	2.456 (0,17)[a]	2.380 (0,32)[a]	2.808 (0,17)[a]	3.298 (0,33)[a]
Volume médio dos neurônios Bi do GEe (μm^3)[NS3]	4.618 (0,30)[a]	4.327 (0,27)[a]	4.241 (0,23)[a]	5.498 (0,31)[a]
Volume médio dos neurônios imunorreativos ao Ki-67 Uni do GEe (μm^3)[NS4]	3.244 (0,41)[a]	4.379 (0,32)[a]	1.428 (0,27)[a]	4.492 (0,44)[a]
Volume médio dos neurônios imunorreativos ao Ki-67 Bi do GEe (μm^3)[NS5]	3.317 (0,45)[a]	6.088 (0,63)[a]	3.038 (0,82)[a]	5.317 (0,18)[a]

[a, b, c,] Médias assinaladas com uma mesma letra não diferem entre si, estatisticamente. Porém, médias assinaladas com letras diferentes, diferem significativamente. *p=0,011; **p=0,005; [NS](Não Significante) [NS1]p=0,334; [NS2]p=0,464; [NS3]p=0,236; [NS4]p=0,094; [NS5]p=0,400.

Tabela 4- Parâmetros estereológicos - Número total de neurônios do GEe (uni; bi; uni+bi) e Número total de neurônios imunorreativos ao Ki-67 (uni; bi; uni+bi) do GEe de preás dos grupos Neonato, Jovem, Adulto e Senil. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida do seu coeficiente de variação (CV) - São Paulo, Agosto – 2014.

Variáveis	Neonato	Jovem	Adulto	Senil
Número total de neurônios Uni do GEe NS6	136.005 (0,37)[a]	100.088 (0,23)[a]	120.368 (0,38)[a]	110.379 (0,22)[a]
Número total de neurônios Bi do GEe NS7	7.067 (0,27)[a]	16.136 (0,26)[a]	28.111(0,59)[a]	29.007 (0,51)[a]
Número total (uni+bi) de neurônios do GEeNS8	143.072 (0,34)[a]	116.224 (0,23)[a]	148.479 (0,35)[a]	139.386 (0,28)[a]
Número total de neurônios Ki-67 Uni do GEeNS9	28.141 (0,18)[a]	29.005 (0,32)[a]	31.134 (0,81)[a]	7.170 (0,22)[a]
Número total de neurônios Ki-67 Bi do GEeNS10	4.096 (0,47)[a]	4.094 (0,17)[a]	5.130 (0,89)[a]	2.272 (0,05)[a]
Número total de neurônios Ki-67 (uni+bi) do GEe NS11	32.237(0,21)[a]	33.099 (0,27)[a]	36.264 (0,82)[a]	9.442 (0,18)[a]

[a, b, c,] Médias assinaladas com uma mesma letra não diferem entre si, estatisticamente. Porém, médias assinaladas com letras diferentes, diferem significativamente. [NS](Não Significante) [NS6]p=0,602; [NS7]p=0,053; [NS8]p=0,731; [NS9]p=0,196; [NS10]p=0,592; [NS11]p=0,231.

Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1. Principais achados

Os principais achados deste trabalho foram: i) aumento de 171% (hipertrofia) no volume do GEe entre os grupos Neonato e Adulto (maturação); ii) aumento de 268% no volume total do tecido não neuronal entre os grupos Neonato e Adulto (maturação); iii) estabilidade no número de neurônios uninucleados, binucleados e no número total de neurônios do GEe durante o desenvolvimento pós-natal; iv) estabilidade no volume dos neurônios do GEe durante o desenvolvimento pós-natal; e, v) estabilidade no número de neurônios imunorreativos ao Ki-67 (uni+bi) durante o desenvolvimento pós-natal.

6.2. Macroestrutura do GEe

6.2.1. Forma e localização

Independentemente da idade, todos os gânglios estrelados esquerdos (GEes) eram de forma irregular e envolvidos por uma cápsula de conjuntivo, que produziu septos de tecido conjuntivo no interior do gânglio, dividindo-os em várias unidades ganglionares. Este padrão geral está em linha com estudos qualitativos anteriores com foco no gânglio simpático de vários grandes mamíferos, como cães (RIBEIRO et al., 2002; GAGLIARDO et al., 2005), coelhos (SASAHARA et al., 2003) capivaras e cavalos (RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004; LOESCH et al., 2010). Quanto à sua localização e posicionamento, não apresentou alterações relevantes durante o desenvolvimento pós-natal, estando em concordância com as descrições feitas em outros roedores e mamíferos (GABELLA, 2004; CAVALCANTI et al., 2009).

6.2.2. Macromorfometria

Em relação aos parâmetros macromorfométricos, observou-se o efeito do desenvolvimento pós-natal através de um aumento no comprimento do gânglio de 42% entre Neonato e Jovem, 34% entre Neonato e Adulto e 35% entre Neonato e Senil. Este achado está de acordo com outras pesquisas realizadas em roedores (ABRAHÃO et al., 2009; MELO et al., 2009; TOSCANO et al., 2009).

6.2.3. Volume do GEe (V_{GEe})

A hipertrofia do gânglio é amplamente conhecida como um mecanismo adaptativo durante o desenvolvimento pós-natal em muitos gânglios autonômicos para mamíferos de médio e grande porte (MIOLAN; NIEL, 1996; GAGLIARDO et al., 2005; FIORETTO et al., 2007; TOSCANO et al., 2009; LADD et al., 2012). Este fenômeno pode acontecer devido a um acompanhamento alométrico durante o desenvolvimento pós-natal dos animais (RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004; GAGLIARDO et al., 2005; RIBEIRO, 2006; TOSCANO et al., 2009; LADD et al., 2012), e devido ao acréscimo de estruturas intraganglionares, porém não neuronais (RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004; RIBEIRO, 2006; ABRAHÃO et al., 2009; MELO et al., 2009), ao aumento no número neuronal (MELO et al., 2009) e/ou do volume neuronal (LADD et al., 2012).

Dentre as estruturas intraganglionares não neuronais, torna-se mais evidenciado, o tecido conjuntivo e o tecido vascular, representados principalmente por fibras colágenas e capilares sanguíneos, respectivamente, como observado em outros roedores silvestres (RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004; RIBEIRO, 2006; ABRAHÃO et al., 2009; MELO et al., 2009). Esta variação no volume total dos tecidos vasculares e dos tecidos conjuntivos pode ocorrer devido a uma possível sobrecarga funcional provocada pelo crescimento de órgãos-alvo do gânglio durante o desenvolvimento pós-natal (ANDREWS, 1996; MIOLAN; NIEL, 1996; TOSCANO et al., 2009).

O volume do tecido não neuronal em GEes de preás representou 59% no grupo Neonato, 68% no grupo Jovem, 80% no grupo Adulto e 71% no grupo Senil, apresentando um aumento de 268% durante o período de maturação (entre Neonato e Adulto) o que refletiu na hipertrofia de 171% no gânglio no mesmo período acompanhado por um aumento de 600% no peso do corpo do animal, assim como em estudos anteriores (RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004; GAGLIARDO et al., 2005; RIBEIRO, 2006; TOSCANO et al., 2009) que foi marcado por aumento do volume de gânglios simpáticos também acompanhado por aumento no peso do corpo do animal (TOSCANO et al., 2009; LADD et al., 2012) durante o desenvolvimento pós-natal.

6.3. Microestrutura do GEe

6.3.1. Estudo histológico qualitativo

Neste estudo, verificou-se qualitativamente a distribuição dos neurônios associados ao desenvolvimento pós-natal, demonstrando neurônios densamente distribuídos nos grupos Neonato e Jovem, enquanto nos grupos Adulto e Senil os neurônios eram esparsamente distribuídos e separados por espaços ocupados principalmente por neurópilo (neuritos e células gliais), vasos sanguíneos e tecido conjuntivo. Pela mesma razão, os neurônios dos gânglios simpáticos de outros roedores durante o desenvolvimento pós-natal, por exemplo, cobaias e pacas, são também distribuídos de maneira não uniforme e separados por tecido não neuronal, especialmente o tecido conjuntivo (ABRAHÃO et al., 2009; MELO et al., 2009; TOSCANO et al., 2009).

Quanto aos tipos celulares observados nos GEes de preás, neurônios uninucleados e binucleados, foram também documentados em gânglios simpáticos de outros roedores silvestres (FORSMAN et al., 1989; SASAHARA et al., 2003; RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004; RIBEIRO, 2006; ABRAHÃO et al., 2009; MELO et al., 2009).

Neurônios do gânglio simpático de mamíferos são geralmente uninucleados, mas as células com dois núcleos são também encontradas (HUBER, 1899; SMITH, 1970; FILICHKINA, 1981; DALSGAARD; ELFVIN, 1982; MACRAE et al., 1986; PURVES et al., 1986). As células binucleadas podem auxiliar na demanda exigida pela inervação extrínseca, representando um mecanismo para aumentar o número de células ganglionares no coração, por um processo de divisão ativa, uma vez que os neuroblastos imaturos vistos em estágios iniciais estão se tornando menor em número e sua migração ao longo de feixes nervosos, que passam a partir do plexo cardíaco, quase cessou (SMITH, 1970). É possível também que a ocorrência dos dois núcleos seja uma adaptação de uma procura específica aplicada às células no que diz respeito à síntese de proteínas (RIBEIRO, 2006), porém seu significado funcional ainda é obscuro.

6.3.2. Número total de neurônios do GEe ($N_{TotalGEe}$)

Em relação às alterações induzidas pelo desenvolvimento pós-natal, algumas partes do sistema nervoso podem reagir de forma diferente e as razões para isso ainda não são claras (TOSCANO et al., 2009).

No sistema nervoso central (SNC), as alterações frequentemente relatadas durante o desenvolvimento pós-natal, são a perda de neurônios do neocórtex, atrofia dos neurônios restantes (ESIRI, 2007) e perda de ambas as células de Purkinje e granular no lóbulo anterior do cerebelo (ANDERSEN et al., 2003). Em estudos do SNA, Ribeiro (2006) encontrou uma diminuição de 23% no número total de neurônios binucleados do GCS em capivaras durante a maturação. Bergman e Ulfhake (1998), comparando gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos com 30 dias e três meses de idade, observaram redução do número de neurônios, e esta redução neuronal também foi relatada por Santer (1991) no GCS de ratos entre quatro e 24 meses de idade.

Perda de neurônios durante o desenvolvimento pós-natal tem sido atribuída a uma diminuição na produção de esteróides neuroativos, isto é, éster de sulfato de dehidroepiandrosterona e alopregnanolona, que são inibidores de apoptose neuronal e que protegem o SNC e os neurônios simpáticos de agentes nocivos (CHARALAMPOPULOS et al., 2006).

No entanto, estes resultados são controversos, porque há diferenças entre os vários componentes do sistema nervoso e também entre as espécies (FINCH, 1993; VEGA et al., 1993). Por exemplo, Melo et al. (2009) identificaram um aumento no número total de neurônios do GCS, porém este aumento ocorreu em neurônios uninucleados e sem alterações nos neurônios binucleados. Farel (2003) relatou um aumento no número de neurônios do GRD de ratos, que não foi associada a uma neurogênese, sugerindo ser o resultado de maturação tardia ou diferenciação incompleta de células nervosas (MIOLAN; NIEL, 1996; CIARONI et al., 2000).

Neste estudo, observou-se uma estabilidade no número de neurônios uninucleados, binucleados e total no GEe de preás, estando de acordo com estudo de Ladd et al. (2012), que também demonstraram uma estabilidade no número total de neurônios em gânglios responsáveis pela inervação extrínseca de roedores.

Sugerimos que pode estar ocorrendo um equilíbrio entre neurogênese e morte neuronal, refletindo assim nesta estabilidade numérica dos neurônios dos GEes de preás durante o desenvolvimento pós-natal.

6.3.3. Volume médio dos neurônios do GEe ($\bar{v}_{N\ \mathrm{GEe}}$)

Durante o desenvolvimento pós-natal, pode ocorrer uma hipertrofia neuronal, sendo este um mecanismo comum, pelo menos em algumas partes do sistema nervoso, para compensar a perda neuronal no mesmo período por degeneração ou necrose celular, além de outros mecanismos que possam garantir a homeostase funcional (CABELLO et al., 2002; SANCHEZ et al., 2008) como um acompanhamento alométrico encontrado por Ladd et al. (2012), que apresentou aumento de 130% nos neurônios uninucleados em GCS de preás.

Porém, essa hipertrofia neuronal não representa um padrão para o desenvolvimento pós-natal. Por exemplo, Toscano et al. (2009) observaram uma diminuição (atrofia) de 27,5% no volume de neurônios uninucleados e 40% no volume de neurônios binucleados nos GCS de cobaias durante o envelhecimento, que pode ser atribuído a uma atrofia relacionada com a idade seletiva e neurodegeneração mediada por um aumento na expressão de sortilina em neurônios do GCS, agravados com a elevada expressão de níveis de pró NGF em alguns órgão-alvos (AL-SHAWI et al., 2008).

Neste estudo não foi observado mudanças no volume neuronal durante o desenvolvimento pós-natal assim como em outros estudos em GCS de roedores silvestres (RIBEIRO, 2006; MELO et al., 2009; LADD et al., 2012).

Sugerimos que a estabilidade no volume neuronal ocorreu porque os mecanismos que normalmente podem influenciar na atrofia ou hipertrofia dos neurônios não foram observados neste estudo. Como discutido anteriormente, encontramos estabilidade do número total de neurônios e a hipertrofia observada no GEe de preás diante de um acompanhamento alométrico, foi refletida pelo aumento do volume total do tecido não neuronal. Sendo assim, acreditamos que não foi necessária uma alteração do volume neuronal para adaptação estrutural deste gânglio durante o desenvolvimento pós-natal.

6.3.4. Proliferação celular

A existência da neurogênese adulta no sistema nervoso central da maioria dos mamíferos, incluindo humanos, é hoje em dia amplamente reconhecida (ALTMAN; DAS, 1965; ERIKSSON et al., 1998; SPALDING et al., 2013). Entretanto, proliferação em outras partes do sistema nervoso em desenvolvimento pós-natal pode ocorrer de maneira diferente (ROTHMAN et al., 1978; ROHRER; THOENEN, 1987; HENDERSHOT et al., 2008; REIFF et al., 2011).

No SNC, a diferenciação neuronal pós-natal é acompanhada por permanente retirada do ciclo celular, já no desenvolvimento pós-natal de gânglios simpáticos, a proliferação continua a seguir a diferenciação neuronal, ou seja, neurogênese em gânglios simpáticos procede principalmente pela proliferação de imaturos, mas já diferenciados neurônios (DICICCO-BLOOM et al., 1990; TSAROVINA et al., 2008).

Neuroblastos simpáticos são os precursores imediatos dos neurônios simpáticos pós-mitóticos, e eles passam por vários ciclos de divisão celular para expandir o *pool* precursor e aumentar o tamanho dos gânglios simpáticos antes de sair do ciclo celular. No entanto, os eventos moleculares que regulam a expansão destes neuroblastos permanecem desconhecidos (ARMSTRONG et al., 2011).

Publicações recentes - e este estudo - descrevem a existência de neurônios binucleados em gânglios simpáticos de roedores silvestres sugerindo que a neurogênese pós-natal pode realmente existir nestes gânglios, já que a ocorrência de neurônios binucleados poderia implicar em processos de divisão celular não finalizados, ou seja, cariocinese sem a finalização da citocinese (RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004; RIBEIRO, 2006; LADD et al., 2012).

Em nosso estudo, observamos que os preás apresentaram uma estabilidade no número de neurônios uninucleados, binucleados e no número total destes neurônios (uni+bi) durante o desenvolvimento pós-natal tanto para a população inespecífica (GIEMSA) quanto para a população específica (imunorreativos para Ki-67) e, visualizamos a ocorrência de neurogênese - evidenciada pela marcação através do Ki-67 - em todos os grupos (Neonato, Jovem, Adulto e Senil).

Estudos sobre a diferenciação neuronal, plasticidade e regeneração celular levaram aos pesquisadores a compreender que o dano neuronal pode ser compensado pela reinervação dos órgãos-alvo, a remodelação dos circuitos neuronais e até mesmo

geração de novos neurônios no sistema nervoso periférico (SNP) em adultos (CZAJA; FORNARO; GEUNA, 2012).

Sabendo-se que, o envelhecimento em mamíferos pode acarretar alterações como perda de cardiomiócitos, hiperplasia destes cardiomiócitos e hipertrofia do miocárdio (ANVERSA et al., 1990; BETSUYAKU et al., 2002; LAKATTA, 2003; VINCIGUERRA et al., 2009) e, que esse aumento no tamanho do coração é devido a um remodelamento ventricular sendo um mecanismo adaptativo que ocorre durante o desenvolvimento pós-natal (SUTTON; SHARPE, 2000), sendo o gânglio estrelado o principal componente da inervação extrínseca do coração, sugere-se que esta neurogênese ocorre para compensar a demanda exigida pelo órgão-alvo.

Um equilíbrio entre a neurogênese e morte celular, provavelmente, garante um balanço homeostático no cérebro adulto. Esta hipótese, com base na observação de que as estruturas de origem neural não aumentam em tamanho, implica que a morte celular proporciona um estímulo para aumentar a neurogênese (ABROUS et al., 2005).

Sendo assim, observamos que o GEe de preás demonstram uma neuroplasticidade durante o desenvolvimento pós-natal e, que esta acontece para obter um equílibrio que, hipoteticamente, é estimulado pela apoptose neuronal proporcionando assim, uma neurogênese de forma significativa ao longo da vida, e consequentemente uma dinâmica de rotatividade celular para a homeostase deste gânglio e de seu órgão-alvo.

Entretanto para realizarmos uma análise ampla, e compreendermos melhor esta interação entre a proliferação neuronal e a apoptose destas células, podendo este ser um mecanismo no processo de homeostase, será necessário verificar essa apoptose neuronal através da quantificação do número total de neurônios imunorreativos para Caspase 3, etapa esta que será desenvolvida na próxima fase deste estudo.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados, é possível concluir que durante o desenvolvimento pós-natal (maturação e envelhecimento), o GEe apresentou as seguintes adaptações estruturais:

- aumento no comprimento relacionado com o desenvolvimento pós-natal, sugerindo ser devido a um acompanhamento alométrico que refletiu no volume ganglionar;
- hipertrofia ganglionar durante o período de maturação devido a um acréscimo do componente não neuronal do tecido intraganglionar;
- estabilidade no número de neurônios uninucleados, binucleados e no número total de neurônios durante o desenvolvimento pós-natal, hipoteticamente devido a um equilíbrio entre neurogênese e morte de neurônios;
- estabilidade no volume dos neurônios uninucleados e binucleados durante o desenvolvimento pós-natal, sugerindo (hipoteticamente) que não foi necessária a influência dos mecanismos de compensação envolvidos como a hipertrofia ou atrofia;
- estabilidade no número de neurônios uninucleados, binucleados e no número total de neurônios imunorreativos ao Ki-67 durante o desenvolvimento pós-natal, sugerindo ser um mecanismo para rotatividade celular e homeostase do gânglio e, consequentemente, do coração;

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, L. M. B., NYENGAARD, J. R., SASAHARA, T. H. C., GOMES S. P., OLIVEIRA, F. R., LADD, F. V. L., LADD, A. A. B. L., MELO, M. P., MACHADO M. R. F., MELO, S. R., RIBEIRO A. A. C. M, Asymmetric post-natal development of superior cervical ganglion of paca (Agouti paca). **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, p. 37–45, 2009.

ABROUS, D.N.; KOEHL, M.; LE MOAL, M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. **Physiological Reviews**, v. 85, p. 523–569, 2005.

AL-SHAWI, R.; HAFNER, A.; OLSON, J.; CHUN, S.; RAZA, S.; THRASIVOULOU, C.; LOVESTONE, S.; KILLICK, R.; SIMONS, P.; COWEN, T. Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 2103–2114, 2008.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell.** 3 ed. New York: Garland, 1994, 1294p.

ALTMAN, J.; DAS, G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **The Journal of comparativeneurology**, v. 124, p. 319–335, 1965.

ANDERSEN, B.B.; GUNDERSEN, H.J.G.; PAKKENBERG, B. Aging of the human cerebellum: a stereological study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 466, p. 356–365, 2003.

ANDREWS, T.J. Autonomic nervous system as a model of neuronal aging: the role of target tissues and neurotrophic factors. **Microscopic Research and Technique**, v. 35, p. 2-19, 1996.

ANVERSA, P.; PALACKAL, T.; SONNENBLICK, E.H.; OLIVETTI, G.; MEGGS, L.G.; CAPASSO, J.M. Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. **Circulation Research**, v. 67, n. 4, p. 871-885, 1990.

ARDELL, J. L., Structure and function of mammalian intrinsic cardiac neurons. In: Armour, JA, Ardell JL, editors. Neurocardiology. 2nd edition. New York: Oxford University Press. p. 95-114, 1994.

ARISAWA, E. A. L.; MORAES, E.; ROCHA R. F.; ALMEIDA, J. D. Marcadores biológicos: PCNA e Ki-67 breve revisão. **Brazilian Dental Science**, v. 2, n. 1, p. 54-60, 1999.

ARMOUR, J.A. Synaptic transmission in the chronically decentralized middle cervical and stellate ganglia of the dog. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, v. 61, p. 1149-1155, 1983.

ARMSTRONG, A; RYU, Y. K.; CHIECO,D.; KURUVILLA, R. Frizzled3 is required for neurogenesis and target innervation during sympathetic nervous system development. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, p. 2371–2381, 2011.

AZIZ, G.; AKSELSEN, Ø.W.; HANSEN, T.V.; PAULSEN, R.E. Procaspase-activating compound 1 induces a caspase-3-dependent cell death in cerebellar granule neurons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 247, p. 238–242, 2010.

BALJET, B.; DRUKKER, J. The extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. **Acta Anatomica**, v. 104, p. 243-267, 1979.

BARBOSA, P.B.; DE QUEIROZ, P.V.; JERÔNIMO, S.M.; XIMENES, M.D.E.F. Experimental infection parameters in Galea spixii (Rodentia: Caviidae) with Leishamina infantum cagasi; **Memórias do Insituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 6, p. 548-548, 2008.

BATULEVICIUS, D; SKRIPKA, V.; PAUZIENE, N; PAUZA, D. H, Topography of the porcine nerve plexus as revealed by histochemistry for acetylcholinesterase, **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 138, p. 64-75, 2008.

BERGMAN, E.; ULFHAKE, B. Loss of primary sensory neurons in the very old rat: neuron number estimates using the dissector method and confocal optical sectioning**. Journal of Comparative Neurology**, v. 396, p. 211–222, 1998.

BETSUYAKU, T.; KOVACS, A.; SAFFITZ, J.E.; YAMADA, K.A. Cardiac structure and function in young and senescent mice heterozygous for a connexin43 null mutation. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 34, n. 2, p. 175-184, 2002.

BEZERRA, F. C.; ALMEIDA, M. I.; NOBREGA-THERRIEN, S. M. Estudos sobre envelhecimento no Brasil: Revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Geriatri e Gerontologia**, v. 15, n. 1, p. 155-167, 2012.

BROWN, D. C,; GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki- 67: its use in histopathology. **Histopathology**, v. 17, p. 489-03, 1990.

BRUGNARO, M; DE SOUZA, R. R; RIBEIRO, A. A. C. M. Extrinsic Cardiac Nerve Segments in the Domestic Dog (Canis Familiaris – Linnaeus, 1758). Comparative Study in Young and Adult Dogs. **Anatomia, Histologia, Embryiologia**, v. 32, p. 117-232, 2003.

BURG, E.D., REMILLARD, C.V., YUAN, J.X.J. K+ Channels in Apoptosis. **The Journal of Membrane Biology**, v.209, p. 3–20, 2006.

CABELLO, C.R.; THUNE, J.J.; PAKKENBERG, H.; PAKKENBERG, B. Ageing of substantia nigra in humans: cell loss may be compensated by hypertrophy. **Neuropathology Applied Neurobiology**, v. 28, p. 283–291, 2002.

CALUPCA, M. A.; VIZZARD, M. A.; PARSONS, R. L. Origin of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)- Immunoreactive Fibers Innervating Guinea Pig Parasympathetic Cardiac Ganglia. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 426, p. 26-39, 2000.

CAO, J.M.; CHEN, L.S.; KENKNIGHT, B.H.; OHARA, T.; LEE, M.H.; TSAI, J.; LAI, W.W.; KARAGUEUZIAN, H.S.; WOLF, P.L.; FISHBEIN, M.C.; CHEN, P.S. Nerve sprouting and sudden cardiac death. **Circulation Research**, v. 86, p. 816–821, 2000.

CAVALCANTI, R.A.; DA PUREZA, D.Y.; DE MELO, M.P.; DE SOUZA, R.R.; BERGAMASCHI, C.T.; DO AMARAL, S.L.; TANG, H.; LOESCH, A.; RIBEIRO, A.A. Low-intensity Treadmill Exercise-related Changes in the Rat Stellate Ganglion Neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, p. 1334-1342, 2009.

CHARALAMPOPOULOS, I.; ALEXAKI, V.I.; TSATSANIS, C.; MINAS, V.; DERMITZAKI, E.; LASARIDIS, I.; VARDOULI, L.; STOURNARAS, C.; MARGIORIS, A.N.; CASTANAS, E.; GRAVANIS, A. Neurosteroids as endogenous inhibitors of neuronal cell apoptosis in aging. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1088, p. 139–152, 2006.

CIARONI, S.; CECCHINI, T.; CUPPINI, R.; FERRI, P.; AMBROGINI, P.; BRUNO, C.; DEL GRANDE, P. Are there proliferating neuronal precursors in adult rat dorsal root ganglia? **Neuroscience Letters**, v. 281, p. 69–71, 2000.

CINCA, J.; EVANGELISTA, A.; MONTOYO, J.; BARUTELL, C.; FIGUERAS, J.; VALLE, V.; RIUS, J.; SOLER-SOLER, J. Electrophysiologic effects of unilateral right and left stellate ganglion block on the human heart. **American Heart Journal**, v. 109, n. 1, p. 46-54, 1985.

CORRADELLO, E. **Criação de preá**. Editora Icone, p. 83, 1987.

CZAJA, K.; FORNARO, M.; GEUNA, S. Neurogenesis in the adult peripheral nervous system. **Neural Regeneration Research**, v. 7, n. 14, p. 1047-1054, 2012.

DALSGAARD, C.J.; ELFVIN, L.G. Structural studies on the connectivity of the inferior mesenteric ganglion of the guinea pig. **Journal of Autonomic Nervous System**, v. 5, p. 265–278, 1982.

de LIMA, A.R. DE; NYENGAARD, J.R; JORGE, A.A; BALIEIRO, J.C; PEIXOTO, C; FIORETTO, E.T; AMBRÓSIO, C.E; MIGLINO, M.A; ZATZ, M; RIBEIRO, A.A. Muscular dystrophy-related quantitative and chemical changes in adenohypophysis GH-cells in Golden Retrievers. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 17, n. 6, p. 480-491, 2007.

DIAS JÚNIOR, C.S.; COSTA, C.S.; LACERDA, M.A. O envelhecimento da população brasileira: uma análise de conteúdo das páginas da REBEP. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, 2006.

DICICCO-BLOOM, E.; TOWNES-ANDERSON, E.; BLACK, I.B. Neuroblast mitosis in dissociated culture: regulation and relationship to differentiation. **The Journal of cell biology**, v. 110, p. 2073–2086, 1990.

DOCIMO, S. Jr.; PICCOLO, C.; VAN, A. D.; ELKOWITZ, D.E. Pathology-Dependent Histological Changes of the Left Stellate Ganglia: A Cadaveric Study. **Clinical Medicine: Pathology**, v. 1, p. 105–113, 2008.

ERANKO, L. Postnatal development of histochemically demonstrable Catecholamines in the superior cervical Ganglion of the rat. **The Histochemical Journal**, v.3, p. 225- 236, 1972.

ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, v, 4, n. 11, p. 1313-1317, 1998.

ESIRI, M. Ageing and the brain. **The Journal of Pathology**, v. 211, p. 181–187, 2007.

EVANS, R. J. F.; SURPRENANT, A. P2X receptors in autonomic and sensory neurons. **Seminars in Neuroscience**, v. 8, p. 217-223, 1996.

FAREL, P. B. Late differentiation contributes to the apparent increase in sensory neuron number in juvenile rat. **Developmental Brain Research**, v. 144, p. 91-98, 2003.

FILICHKINA, N.M. Comparative radioautographic analysis of synthesis and slow transport of protein axons of uni- and double nuclear neurocytes in the rabbit. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 11, p. 49–52, 1981.

FINCH, C.E. Neuron atrophy during aging: programmed or sporadic? **Trends in neuroscience**, v. 6, p. 104–110, 1993.

FIORETTO, E.T; DE ABREU, R.N; CASTRO, M.F; GUIDI, W.L; RIBEIRO, A.A. Macro and Microstructure of the Superior Cervical Ganglion in dogs, cats and horses during maturation. **Cells, Tissues, Organs**, v. 186, n. 2, p. 129-140, 2007.

FIRAT, Y.; KIZILAY, A.; OZTURAN, O.; EKICI, N. Experimental otoacoustic emission and auditory brainstem response changes by stellate ganglion blockage in rat. **American Journal of Otolaryngology-Head and Neck Medicine and Surgery**, v. 29, p. 339-345, 2008.

FORSMAN, C. A.; LINDH, B.; ELFVIN, L.; HALLAMN, H. Measurements of the DNA amount in mono and binucleate cells in the celiac superior mesenteric ganglion of the guinea pig. **Anatomy and Embryology**, n. 179, p. 587-590, 1989.

FRIEDMAN, W.F.; POOL, P.E.; JACOBOWITZ, D.; SEAGREN, S.G.; BRAUNWALD, E. Sympathetic innervation of the developing rabbit heart. **Circulation Research**, v. 23, p. 23–32, 1968.

GABELLA, G. Autonomic Nervous System. **The rat nervous system** (Third edition), p. 77-119, Elsevier, 2004.

GAGLIARDO, K.M.; BALIEIRO, J.C.C.; DE-SOUZA, R.R.; RIBEIRO, A.A.C.M. Postnatal-related changes in the size and total number of neurons in the caudal mesenteric ganglion of dogs: total number of neurons can be predicted from body weight and ganglion volume. **The Anatomical Record, Parte A**: 286A. p. 917-929, 2005.

GUADIX, AR.; HERREROS, M.A.P.; GARRIDO, M.V.O.; ABADIA-FENOLL F. Quantitative Analysis of binucleate neurons in the lateral geniculate nucleus of the mouse. **Trabajos del Instituto Cajal de Investigaciones Biológicas**, v. 3, n. 70, p. 247-60, 1979.

GUNDERSEN, H .J. G., BAGGER, P., BENDTSEN, T. F. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, p. 857-881, 1988.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B. V.; KIÊU, K.; NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology — reconsidered. **Journal of Microscopy**, 193: 199–211, 1999.

GUNDERSEN, H. J. G .The smooth fractionator. **Journal of Microscopy**, v. 207, p.191-210, 2002.

HADDAD, C.; ARMOUR, J.A. Ontogeny of canine intrathoracic cardiac nervous system. **The American journal of physiology**, v. 261, p. R920–R927, 1991.

HALL, P. A.; LEVINSON, D. A. Review: assessment of cell proliferation in histological material. **Journal of Clinical Pathology**, v. 43, n. 2, p. 184-192, 1990.

HANAMATSU, N.; YAMASHIRO, M.; SUMITOMO, M.; FURUYA, H. Effectiveness of cervical sympathetic ganglia block on regeneration of the trigeminal nerve following transection in rats**. Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 27, n.3, p. 268-276, 2002.

HASAN, W.; SMITH, P. G. Modulation of rat parasympathetic cardiac ganglion phenotype and NGF synthesis by andrenergic nerves. **Autonomic Neuroscience**: Basic and Clinical, v. 145, p. 17-26, 2009.

HEDGER, J. H.; WEBBER, R. H. Anatomical study of the cervical sympathetic trunk and ganglia in the albino rat (*Mus norvegicus albinus*). **Acta Anatomica**, v. 96, p. 206-217, 1976.

HENDERSHOT, T.J.; LIU, H.; CLOUTHIER, D.E.; SHEPHERD, I.T.; COPPOLA, E.; STUDER, M.; FIRULLI, A.B.; PITTMAN, D.L.; HOWARD, M.J. Conditional deletion of Hand2 reveals critical functions in neurogenesis and cell type-specific gene expression. For development of neural crest-derived noradrenergic sympathetic ganglion neurons. **Developmental Biology**, v. 319, p. 179–191, 2008.

HOU, Y.; SHCERLAG, B. J.; LIN, J.; ZHANG, Y.; LU, Z.; TRUONG, K.; PETTERSON, E.; LAZZARA, R.; JACKMAN, W. M; PO,S. P. Ganglionated Plexi Modulate Extrinsic Cardiac Autonomic Nerve Input. **Journal of the American College of Cardiology**, v.50, n.1, 2007.

HOWARD, C. V.; REED, M. G.; Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy. **Oxford: Bios Scientific Publishers**, 2005.

HUBER, C.G. A contribution on the minute anatomy of the sympathetic ganglia of the different classes of vertebrates. **Journal of Morphology**, v. 16, p. 27–84, 1899.

IAMAROON, A.; KHEMALEELAKUL, U.; PONGSIRIWET, S.; PINTONG, J. Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 33, n. 1, p. 30-6, 2004.

JONES, M.L. Longevity of captive mammals. **Der Zool. Garten**, v. 52, p. 113–128, 1982.

JORDA, E.G.; VERDAGUER, E.; JIMENEZ, A.; GARCIA DE ARRIBA, S.; ALLGAIER, C.; PALLA`S, M.; CAMINS, A. Evaluation of the neuronal apoptotic pathways involved in cytoskeletal disruption-induced apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 470–480, 2005.

KIM, J.S.; JUNG, J.; LEE, H.J.; KIM, J.C.; WANG, H.; KIM, S.H.; SHIN, T.; MOON, C. Differences in immunorreactivities of Ki-67 and double cortin in the adult hippocampus in three strains of mice. **Acta histochemica**, v. 111, p. 150-156, 2009.

LACHER Jr., T.E. The comparative social behaviour of kerodon rupestris and galea spixii and the evolution of behaviour in the cavidade. **Bull Carnegie Museum Natural History**, v. 17, p. 1-71, 1981.

LADD, A.A.; LADD, F.V.; DA SILVA, A.A.; OLIVEIRA, M.F., DE SOUZA, R.R.; COPPI, A.A. SCG postnatal remodelling – hypertrophy and neuron number stability – in Spix's Yellow-toothed Cavies (Galea spixii). **International Journal of Developmental Neuroscience**, 2012.

LAKATTA, E.G. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. **Circulation**, v. 107, n. 3, p. 490-497, 2003.

LEGER, J; CROLL, R.P; SMITH, F.M. Regional distribution and extrinsic innervation of neurons in the guinea-pig atria. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 407, p. 303-317, 1999.

LEVINE, A.J. et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of p53 tumour suppressor gene in tumorigenesis. **British Journal of Cancer**, v. 29, n. 3, p. 409-416, 1994.

LI, J.; LIU, Y.; YANG, F.; JIANG, G.; LI, C.; HU, D.; WANG, J. Video-Assisted Thoracoscopic Left Cardiac Sympathetic Denervation: A Reliable Minimally Invasive Approach for Congenital Long-QT Syndrome. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 86, p. 1955 -1959, 2008.

LIMA-COSTA, M.F.; VERAS, R. Saúde pública e envelhecimento. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, p. 700-701, 2003.

LIN, J.; SCHERLAG, B. J.; NIU, G.; LU, Z.; PATTERSON, E.; LU, S.; LAZZARA, R.; JACKMAN, W. M; PO, S. S. Autonomic Elements Within the Ligamento f Marshall and Inferior Left Ganglionated Plexus Mediate Functions of the Atrial Neural Network. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v. 20, n. 3, 2009.

LOESCH, A.; MAYHEW, T.M.; TANG, H.; LADD, F.V.; LADD, A.A.; DE MELO, M.P.; DA SILVA, A.A.; COPPI, A.A. Stereological and allometric studies on neurons and axodendritic synapses in the superior cervical ganglia of rats, capybaras and horses. **Cell and Tissue Research**, v. 341, p. 223–237, 2010.

LUJAN, H. L.; PALANI, G.; CHEN, Y.; PEDUZZI, J. D.; DiCARLO, S. E. Targeted ablation of cardiac sympathetic neurons reduces resting, reflex and exercise-induced sympathetic activation in conscious rats. **American Journal of Physiology**. Heart and Circulatory Physiology, v. 296, p. 1305-1311, 2009.

MACRAE, I.M.; FURNESS, J.B.; COSTA, M. Distribution of subgroups of noradrenaline neurons in the coeliac ganglion of the guinea pig. **Cell and Tissue Research**, v. 244, p. 173–180, 1986.

MASLIUKOV, P.M.; FATEEV, M.M.; NOZDRACHEV, A.D. Age-dependent changes of electrophysiologic characteristics of the stellate ganglion conducting pathways in kittens. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 83, p. 12–18, 2000a.

MASLIUKOV, P.M.; PANKOV, V.A.; STRELKOV, A.A.; MASLIUKOVA, E.A.; SHILKIN, V.V. NOZDRACHEV, A.D. Morphological features of neurons innervating different viscera in the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 84, p. 169–175, 2000b.

MASLIUKOV, P. M.; SHILKIN, V. V.; NOZDRACHEV, A. D.; TIMMERMANS, J. P. Histochemical features of neurons in the cat stellate ganglion during postnatal ontogenesis. **Autonomic Neuroscience**: Basic and Clinical, v. 106, p. 84-90, 2003.

MASLIUKOV, P. M.; TIMMERMANS, J. P. Immunocytochemical properties of stellate ganglion neurons during early postnatal development. **Histochemistry and Cell Biology**. v. 122, p. 201-209, 2004.

MASLYUKOV, P. M. Preganglionic inputs to the stellate ganglion of the cat during postnatal ontogenesis. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 35, n. 5, 2005.

MASLYUKOV, P. M; SHILKIN, V. V; TIMMERMANS, J. P. Immunocytochemical characteristics of neurons in the stellate ganglion of the sympathetic trunk in mice during postnatal ontogenesis. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 36, n. 8, 2006.

MASLYUKOV, P. M; NOZDRACHEV, A. D; TIMMERMANS, J. P. Age-related characteristics of the neurotransmitter composition of neurons in the stellate ganglion. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 37, n. 4, 2007.

MAYHEW, T.M.; OLSEN, D.R. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. **Journal of Anatomy**, v. 178, p. 133–144, 1991.

MAYHEW, T. M.; GUNDERSEN, H. J. G. 'If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the dissector for stereological counting of particles in 3D space. **Journal of Anatomy**, v. 188, p. 1-15, 1996.

MELO, S. R.; NYENGAARD, J. R.; OLIVEIRA, F. R.; LADD, F.; ABRAHAO, L. M. B.; MACHADO, M. R. F.; SASAHARA, T. H. C.; DE MELO, M. P.; RIBEIRO, A. A. C. M. The developing left superior cervical ganglion of pacas (Agouti paca). **The Anatomical Record**, v. 292, p. 132-142, 2009.

MILANOVIC, D.; POPIC, J.; PESIC, V.; LONCAREVIC-VASILJKOVIC, N.; KANAZIR, S.; JEVTOVIC-TODOROVIC, V.; RUZDIJIC, S. Regional and Temporal Profiles of Calpain and Caspase-3 Activities in Postnatal Rat Brain following Repeated Propofol Administration. **Development Neuroscience**, v. 32, p. 288–301, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Fundação Nacional de Saúde**. Manual de controle de roedores Brasil, p. 132, 2002.

MINITAB (v.16). **Minitab reference manual**. Florence, Wadsworth, 2010.

MIOLAN, J.; NIEL, J. The mammalian sympathetic prevertebral ganglia: integrative properties and role in the nervous control of digestive tract motility. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 58, p. 125–138, 1996.

MORRISON, J.H.; HOF, P.R. Life and death of neurons in the aging brain. **Science**, v. 278, p. 412–418, 1997.

NICHOLSON, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, p. 1028 – 1042, 1999.

NICHOLSON, D.W. Good and bad cell death. **Nature**. v. 457, 2009.

NIKOLAEV, A.; MCLAUGHLIN, T.; O'LEARY, D. D. M.; TESSIER-LAVIGNE, M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. **Nature**, v. 457, p. 981–989, 2009.

NOWAK, R. **Walker's mammals of the world**, vol. 2. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. 1999.

NYENGAARD, J.R.; GUNDERSEN, H.J.G. The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. **Journal of Microscopic**, v. 165, p. 427–431, 1992.

OURIEL, K; MOSS, A.J. Long QT syndrome: an indication for cervicothoracic sympathectomy. **Cardiovascular Sugery**, v.3, n. 5, p. 475-478, 1995.

PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN. H. J. G. Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. **Journal of microscopy**, v. 150, p. 1-20, 1988.

PETERSON, R. C.; PATEL, L.; CUBERT, K.; GULATI, A. Serial stellate ganglion blocks for intractable postherpetic itching in a pediatric patient: a case report. **Pain Physician**, v. 12, p. 629-632, 2009.

PURVES, D.; HADLEY, R.D.; VOYVODIC, J. T. Dynamic changes in the dendritic geometry of individual neurons visualized over periods of up to three months in the superior cervical ganglion of living mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 1051-1060, 1986.

RABENHORST, S. H.; BURINI, R. C.; SCHIMITT, F. C. L. Ciclo celular mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 40, n. 3, p. 141-147, 1994.

RAMIREZ, R. J.; AJIJOLAOA, Z. W.; HOLMSTROM, B.; LUNINGH, L. M. M.; SHIVKUMARK, M. A. A new electrocardiographic marker for sympathetic nerve stimulation: modulation of repolarization by stimulation of stellate ganglia. **Journal of Electrocardiology**, v. 44, p. 694–699, 2011.

REIFF, T.; HUBER, L.; KRAMER, M.; DELATTRE, O.; JANOUEIX-LEROSEY, I.; ROHRER, H. Midkine and Alk signaling in sympathetic neuron proliferation and neuroblastoma predisposition. **Development**, v. 138, p. 4699–4708, 2011.

RIBEIRO, A. A. C. M; Elias, C. F; LIBERTI, E. A; DE LIMA GUIDI, W; DE SOUZA, R. R. Structure and Ultrastructure of the Celiac-Mesenteric Ganglion Complex in the Domestic Dog(*Canis Familiaris*). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 31, p. 344-349, 2002.

RIBEIRO, A. A. C. M.; DAVIS, C.; GABELLA, G. Estimate of size and total number of neurons in superior cervical ganglion of rat, capybara and horse. **Anatomy and Embryology**, v.208, n. 208, p. 367-380, 2004.

RIBEIRO, A. A. C. M. Size and number of binucleate and mononucleate superior cervical ganglion neurons in Young capybaras. **Anatomy and Embryology**, v. 211, p. 607-617, 2006.

ROHRER, H.; THOENEN, H. Relationship between differentiation and terminal mitosis: chick sensory and ciliary neurons differentiate after terminal mitosis of precursor cells, whereas sympathetic neurons continue to divide after differentiation. **The Journal of Neuronscience**, v. 7, p. 3739–3748, 1987.

ROTHMAN, T.P.; GERSHON, M.D.; HOLTZER, H. The relationship of cell division to the acquisition of adrenergic characteristics by developing sympathetic ganglion cell precursors. **Developmental biology**, v. 65, p. 322–341, 1978.

ROWE, D. L; HONEYCUTT, R. L. Phylogenetic relationships, ecological correlates, and molecular evolution within the cavioidea (mammalia, rodentia). **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, p. 263–277, 2002.

RUIZ-VELASCO, V.; PUHL, H. L.; FULLER, B. C.; SUMMER, A. D. Modulation of Ca2+ channels by opioid receptor-like 1 receptors natively expressed in rat stellate ganglion neurons innervating cardiac muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 3, p. 987-994, 2005.

RUTTEN, B.P.F.; KORR, H.; STEINBUSCH, H.W.M.; SCHIMITZ, C. The aging brain: less neurons could be better. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, p. 349-355, 2003.

SANCHEZ, H.L.; SILVA, L.B.; PORTIANSKY, E.L.; HERENU, C.B.; GOYA, R.G.; ZUCCOLILLI, G.O. Dopaminergic mesencephalic systems and behavioral performance in very old rats. **Neuroscience**, v. 154, p. 1598–1606, 2008.

SANTER, R.M. Sympathetic neurone numbers in ganglia of young and old rats**. Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 33, p. 221–222, 1991.

SASAHARA, T.H. DE C.; DE SOUZA, R.R.; MACHADO, M.R.F.; DA SILVA, R.A.; GUIDI, W.L.; RIBEIRO, A.A.C.M. Macro and microstructural organization of the rabbit's celiac-mesenteric ganglion complex (*Oryctolagus cuniculus*). **Annals of Anatomy**, v. 185, p. 441-448, 2003.

SCHERLAG, B. J.; PO, S. The intrinsic cardiac nervous system and atrial fibrillation. **Current Opinion in Cardiology,** v. 21, p. 51-54, 2006.

SCHWARTZ, P.J.; STONE, H.L. Left stellectomy in the prevention of ventricular fibrillation caused by acute myocardial ischemia in conscious dogs with anterior myocardial infarction. **Circulation**, v. 62, p. 1256–1265, 1980.

SCHWARTZ, P.J. Do animal models have clinical value? **American Journal of Cardiology**, v. 81, p. 14D–20D, 1998.

SMITH, R.B. Binucleate neurons in the human foetal heart. **Experientia,** v. 26, p. 772, 1970.

SONG, J.G.; HWANG, G. S.; LEE, E. H.; LEEM, J. G.; LEE, C., PARK, P. H.; SHIN, J. W. Effects of bilateral stellate ganglion block on autonomic cardiovascular regulation. **Circulation Journal**: official journal of the Japanese Circulation Society, v. 73, n. 10, p. 1909 – 1913, 2009.

SPALDING, K.L.; BERGMANN,O.; ALKASS,K.; BERNARD,S.; SALEHPOUR,M.; HUTTNER,H.B.; BOSTROM, E.; WESTERLUND,I.; VIAL,C.; BUCHHOLZ,B.A.; POSSNERT,G.; MASH,D.C.; DRUID,H.; FRISEN,J. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. **Cell**, v. 153, p. 1219–1227, 2013.

STEELE, C.; FIORETTO, E.T.,SASAHARA, T.H.; GUIDI, W.L.; LIMA, A.R.; DE RIBEIRO, A.A.O.; LOESCH, A. On the atrophy of the internal carotid artery in capybara. **Cell and Tissue Research**, v. 326, p. 737–748, 2006.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the dissector. **Journal of Microscopy**, n. 134, p. 127-136, 1984.

STRICKMAN, N. E.; DEAR, W. E. Left Stellate Ganglionectomy for the Long Q_T Interval Syndrome: Nine-Year Follow-up of a Patient. **Texas Heart Institute Journal**, v.9, n. 2, 1982.

SUN, P.; YOSHIZUKA, N.; NEW, L.; MOSER, B.A.; LI, Y.; LIAO, R.; XIE, C.; CHEN, J.; DENG, Q.; YAMOUT, M.; DONG, M.Q.; FRANGOU, C.G.; YATES, JR 3RD; WRIGHT, P.E.; HAN, J. PRAK is essential for Ras-induced senescence and tumor suppression. **Cell**, v. 128, p. 295-308, 2007.

SUTTON, MG..; SHARPE, N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. **Circulation**, v. 101, n. 25, p.2981-2988, 2000.

SWISSA, M.; ZHOU, S.; TAN, A. Y.; FISHBEIN, M. C.; CHEN, P.; CHEN, L. S. Atrial sympathetic and parasympathetic nerve sprouting and hyperinnervation induced by subthreshold eletrical stimulation of the left stellate ganglion in normal dogs. **Cardiovascular Pathology**, v. 17, p. 303-308, 2008.

SZWEDA, P.A.; CAMOUSE, M.; LUNDBERG, K.C.; OBERLEY, T.D.; SZWEDA, L.I. Aging, lipofuscin formation, and free radical-mediated inhibition of cellular proteolytic systems. **Ageing Research Reviews**, v. 2, p. 383–405, 2003.

TAN, A. Y.; ZHOU, S.; OGAWA, M.; SONG, J.; CHU, M.; LI, H.; FISHBEIN; M. C.; LIN, S.; CHEN, L. S.; CHEN, P. Neural Mechanisms of Paroxysmal Atrial Fibrillation and Paroxysmal Atrial Tachycardia in Ambulatory Canines . **Circulation**, v. 118, n.9, p. 916–925, 2008.

TANG, H.; WANG, Y.; XIE, L.; MAO, X.; WON, S.J.; GALVAN, V.; JIN, K. Effect of neural precursor proliferation level on neurogenesis in rat brain during aging and after focal ischemia. **Neurobiology of Aging**, v. 30, n.2, p. 299-308, 2009.

TOSCANO, C. P.; DE MELO, M. P.; MATERA, J. M.; LOESH, A.; RIBEIRO, A. A. C. M. The developing and restructuring superior cervical ganglion of guinea pigs (Cavia porcellus var. albina). **International Journal of Developmental Neurosciencience**, v. 27, p. 329-336, 2009.

TRUZZI, F.; MARCONI, A.; ATZEI, P.; PANZA, M.C.; LOTTI, R.; DALLAGLIO, K.; TIBERIO, R.; PALAZZO, E.; VASCHIERI, C.; PINCELLI, C. p75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes. **Cell Death and Differentiation**, 2010.

TSAROVINA, K,; SCHELLENBERGER, J,; SCHNEIDER, C,; ROHRER, H. Progenitor cell maintenance and neurogenesis in sympathetic ganglia involves Notch signaling. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 37, p. 20–31, 2008.

UEDA, H.; YANAI, Y.; MURAO, S.; HARUMI, K.; MASHIMA, S.; KUROIWA, A.; SUGIMOTO, T.; SHIMOMURA, D. Electrocardiographic and vector cardiographic changes produced by electrical stimulation of the cardiac nerves**. Jpn Heart Journal**, v. 28, p. 359–372, 1964.

VASEGHI, M.; ZHOU, W.; SHI, J.; AJIJOLA, O.; HADAYA, J.; SHIVKUMAR, K.; MAHAJAN, A. Sympathetic innervation of the anterior left ventricular wall by the right and left stellate ganglia. **Heart Rhythm**, v. 9, p. 1303–1309, 2012.

VEDEL JENSEN, E.B.; GUNDERSEN, H.J.G. The rotator. **Journal of Microscopy.** v.170, p.35-44, 1993.

VEGA, J.A.; CALZADA, B.; DEL VALLE, M.E. **Age-related in the mammalian autonomic and sensory ganglia**. In: Amenta, F. (Ed.), Aging of the Autonomic Nervous System. CRC Press, p. 31–61. 1993.

VINCIGUERRA, M.; SANTINI, M.P.; CLAYCOMB, W.C.; LADURNER, A.G.; ROSENTHAL, N. Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity. **Aging (Albany NY)**, v. 2, n. 1, p. 43-62, 2009.

WEST, M.J. Advances in the study of age-related neuron loss. **Seminars in Neuroscience**, v. 6, p. 403–411, 1994.

WILSON, D.E.; REEDER, D.M. **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**, 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, 2142 pp, 2005.

WINTER, J.; TANKO, A.S.; BRACK, K.E.; COOTE, J.H.; NG, G.A. Differential cardiac responses to unilateral sympathetic nerve stimulation in the isolated innervated rabbit heart. **Autonomic Neuroscience**, v. 166, n. 1-2, p. 4-14, 2012.

WOOD, A.; DOCIMO, S.; ELKOWITZ, D.E. Cardiovascular disease and its association with histological changes of the left stellate ganglion. **Clinical Medicine Insights Pathology**, v. 3, p. 19-24, 2010.

YANOWITZ, F.; PRESTON, J. B.; ABILDSKOV, J. A. Functional distribution of right and left stellate innervation to the ventricles. Production of neurogenic electrocardiographic changes by unilateral alteration of sympathetic tone. **Circulation Research**, v. 18, p. 416–428, 1966.

ZHOU, S.; CAO, J.M.; TEBB, Z.D.; OHARA, T.; HUANG, H.L.; OMICHI, C.; LEE, M.H.; KENKNIGHT, B.H.; CHEN, L.S.; FISHBEIN, M.C.; KARAGUEUZIAN, H.S.; CHEN, P.S. Modulation of QT interval by cardiac sympathetic nerve sprouting and the mechanisms of ventricular arrhythmia in a canine model of sudden cardiac death. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v. 12, p. 1068 –1073, 2001.

ZHOU, S.; PAZ, O.; CAO, J.M.; ASOTRA, K.; CHAI, N.N.; WANG, C.; CHEN, L.S.; FISHBEIN, M.C.; SHARIFI, B.; CHEN, P.S. Differential beta adrenoreceptor expression induced by nerve growth factor infusion into the canine right and left stellate ganglia. **Heart Rhythm**, v. 12, p. 1347-1355, 2005.

ZHOU, J.; SCHERLAG, B. J.; EDWARDS, J.; JACKMAN, W. M.; LAZZARA, R.; PO, S. S. Gradients of Atrial Refractoriness and Inducibility of Atrial Fibrillation due to

Stimulation of Ganglionated Plexi. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v.18, p. 83-90, 2007.

ZHOU, X.; WEI, J.; SONG, M.; FRANCIS, K.; YU, S.P. Novel role of KCNQ2/3 channels in regulating neuronal cell viability. **Cell Death and Differentiation**, p. 1–13, 2010.

ZHOU, W.; YAMAKAWA, K.; BENHARASH, P.; AJIJOLA, O.; ENNIS, D.; HADAYA, J.; VASEGHI, M.; SHIVKUMAR, K.; MAHAJAN, A. Effect of stellate ganglia stimulation on global and regional left ventricular function as assessed by speckle tracking echocardiography. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 304, p. H840-847, 2013.

ANEXOS

ANEXO A- Carta de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP)

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **13/07/2011, APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **273/11** intitulado: **"PLASTICIDADE DA INERVAÇÃO CARDÍACA DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM PREÁS (GÁLEA SPIXII, WANGLER, 1831)."** que utilizará **20** animais da espécie **Preá (Galea spixii)**, apresentado pelo **PROGRAMA DE FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi
Pesquisador (a) Executante: Ana Paula Frigo Moura

CEP-FMUSP, 14 de Julho de 2011.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fmusp@honet.usp.br

ANEXO B- Carta de aprovação na Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Plasticidade da inervação cardíaca durante o desenvolvimento pós natal em preás (Gálea spixii, Wangler, 1831)", protocolado sob o nº 2242/2011, utilizando 20 (vinte) preás, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Plasticity of cardiac innervation during postnatal development in preás (Gálea spixii, Wangler, 1831)", protocol number 2242/2011, utilizing 20 (twenty) preás, under the responsibility Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

ANEXO C- Ficha do Aluno na Plataforma do Sistema Administrativo de Pós-Graduação JANUS – Disciplinas cursadas e créditos obtidos

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

5160 - 7782103/1 - Ana Paula Frigo Moura

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MNE5755-2/1	Neuroestimulação na Reabilitação de Doenças Cerebrovasculares	05/12/2011	18/12/2011	60	4	100	A	N	Concluída
MPT5795-1/1	Bases Éticas, Metodológicas e Gerenciais em Pesquisa	07/03/2012	19/06/2012	225	15	100	A	N	Concluída
EDM5102-3/3	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/03/2013	23/04/2013	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	8	16	23
Estágios:			
Total:	8	16	23

Créditos Atribuídos à Dissertação: 80

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2014
Impresso em: 10/08/14 22:13:31