

**MARCAÇÃO NEURONAL DOS GÂNGLIOS DA CADEIA SIMPÁTICA DE RATOS  
(*R. Norvegicus*) UTILIZANDO O HRP COMO TRAÇADOR †**

**ALEXANDRE MOTTA BITTENCOURT**

Prof. Adjunto do Depto. de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

**DIÓGENES LUÍS DA MOTA**

Prof. Adjunto do Depto. de Histologia da UFPE.

**ADELMAR AFONSO AMORIM JUNIOR**

Prof. Adjunto do Depto. de Anatomia da UFPE.

**MARLEYNE JOSÉ AFONSO ACCIOLY LINS AMORIM**

Prof. Auxiliar do Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE.

A investigação tem como objetivo o estudo da inervação simpática do timo de rato. A peroxidase do rábano silvestre foi utilizada como marcador dos corpos celulares que irão originar as fibras nervosas responsáveis pela inervação desta glândula. Em 19 animais (albino wistar) foram submetidos a anestesia geral com hidrato de cloral a 10% e injetado no timo o HRP-WGA bilateralmente em ambos polos apicais do timo. Após 3 dias de sobrevivência, estes animais eram novamente anestesiados e perfundidos transcardiacamente com Karnovsky como fixador. Em seguida foram retiradas as cadeias simpáticas direita e esquerda e submetidas a reação histoquímica para evidenciação do marcador. Os neurônios distribuíram-se desde o primeiro gânglio cervical até o décimo nono torácico, embora estas marcações tenham sido encontradas em maior número no gânglio cervical superior e gânglio estrelado. Estes achados dão contribuição no entendimento desta inervação do timo, em relação ao sistema nervoso autônomo.

---

† Trabalho apresentado no IX Encontro de Zoologia do Nordeste, Recife, em setembro de 1992.

## INTRODUÇÃO

A noção da ligação funcional entre o sistema nervoso e o timo tem sido objeto de frequentes estudos com o auxílio das mais variadas técnicas. Assim, Serqeeva (1974), Williams e Felten (1981), Williams et al. (1981) e Singh (1985) demonstraram a inervação simpática do timo, que para Stein, Schiavi e Lomerino (1976), Bulloch e Moore (1981) e Bulloch Pomerantz (1984) é proveniente dos gânglios torácicos da cadeia simpática.

A concepção da mútua interação entre o sistema nervoso central e o timo, não pode ser separada de um mecanismo de retroalimentação, onde o timo pode enviar informações para o sistema nervoso central através de mensagens químicas ou neuronais que posteriormente retornam ao longo das fibras nervosas (Magni, Bruschi e Kastí, 1987). Levando-se em consideração a importância da interação entre o sistema nervoso e o sistema imune, utilizamos no presente trabalho a técnica de demonstração do HRP (Peroxidase do Rábano Silvestre), a fim de evidenciarmos na parte simpática do sistema nervoso autônomo a localização dos corpos neuronais destinados ao timo, procurando fornecer bases anatômicas mais apropriadas para um melhor conhecimento da sua inervação.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 22 ratos albinus Wistar de ambos os sexos, de um a três meses de idade, pesando entre 90 a 250 g, distribuídos em dois grupos: grupo I (controle), três animais; grupo II (experimental), 19 animais.

Os animais do grupo II (19 ratos), após anestesia eram submetidos a cirurgia, sob lupa estereoscópica, onde se realizou uma incisão sagital mediana que se estendeu da porção inferior do pescoço à parte média do esterno. Exposto o timo (região apical) foram injetados lentamente com auxílio de micro-seringa 20 ul de HRP a 20% (tipo VI, Sigma) dissolvidos em DMSO (Dimetilsulfóxido) e conjugado com aglutinina do germe do trigo/peroxidase do rábano silvestre (WGA-, Vector), sendo 15 ul para o lobo direito e 15 ul para o lobo esquerdo. Após a injeção do marcador neuronal nos 19 animais do grupo II (experimental), os mesmos eram suturados e mantidos por um período de sobrevivência de 72 horas, ao fim do qual eram novamente anestesiados e submetidos a perfusão através do ventrículo esquerdo, com o auxílio de uma bomba de perfusão peristáltica, onde 400 ml de solução salina em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,3, foram perfundidos seguidos de 400 ml de solução fixadora de Karnovsky (1% paraformaldeído e 2% glutaraldeído) em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,3, e 50 ml de sacarose a 10%. Desta forma, foram retirados sob lupa estereoscópica, as cadeias simpáticas direita e esquerda (C<sub>1</sub> a T<sub>10</sub>), sendo este material imediatamente imerso em solução fixadora de Karnovsky por um período

de duas horas sendo transferidos para tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,3 a 4°C por três horas e mantidas em sacarose a 30% a 4°C em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,3, por doze horas. Em seguida, as cadeias simpáticas foram submetidas a reação para demonstração histoquímica do HRP utilizando-se como cromógeno o tetrametilbenzidina (TMB, Sigma), segundo a técnica de Mesulan (1978). Os preparados totais das cadeias simpáticas foram montados sobre lâmina de vidro recobertas por gelatina, secos a temperatura ambiente por 24 horas, e estabilizados com salicilato de metila.

Utilizou-se a mesma sequência para os animais do grupo I (controle), exceto a injeção de HRP/HRP-WGA. Os preparados totais das cadeias simpáticas foram observados e microscopia óptica em campo claro, onde se evidenciou a localização dos corpos neuronais marcados em cada gânglio. Os resultados da contagem de neurônios na cadeia simpática foram submetidos ao teste do qui quadrado ( $X^2$ ), (Vieira, 1983), à 0,01 grau de significância.

## RESULTADOS

Foram observadas nas cadeias simpáticas direita e esquerda a frequência dos gânglios simpáticos de C<sub>1</sub> a T<sub>10</sub>. Em 15 casos a fusão dos gânglios C<sub>i</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> proporcionou a formação de três tipos de gânglios estrelados (Figura 1). Os neurônios marcados nas cadeias, distribuem-se de acordo com a Tabela 1 do apêndice, onde se verificou a sua presença desde os gânglios cervicais até o 9º gânglio torácico (Figura 2), apresentando-se com formas ovóides e alongadas, em tonalidades azul escura com tendência ao preto.

O teste do qui quadrado ( $X^2$ ) a 0,01 grau de significância avaliou as frequências observadas e esperadas, para as diferentes entidades (gânglios), bem como o total de neurônios (Tabela 1).

A análise de cada entidade em separado, comparando a frequência do lado direito com a do lado esquerdo, encontra-se expressa na Tabela 2, onde se evidenciou as frequências observadas e esperadas.

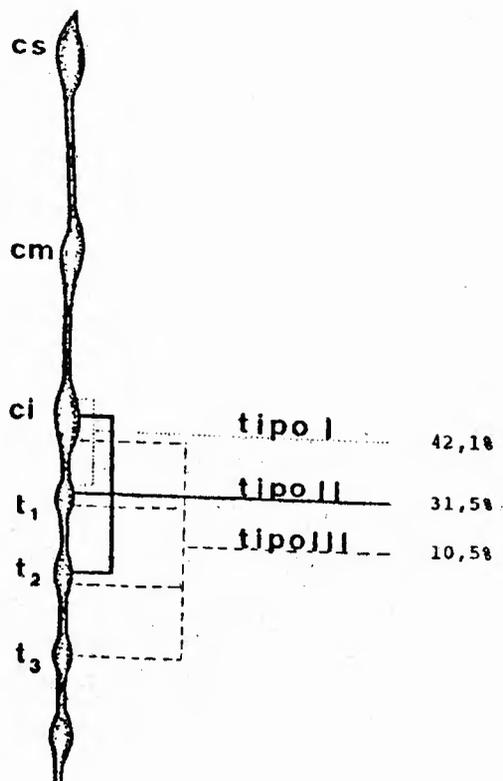


FIGURA 1 - Esquema da cadeia simpática de rato, evidenciando a frequência dos tipos de gânglios estrelados  
 Tipo I ( $C_i + T_1$ )  
 Tipo II ( $C_i + T_1 + T_2$ )  
 Tipo III ( $C_i + T_1 + T_2 + T_3$ )

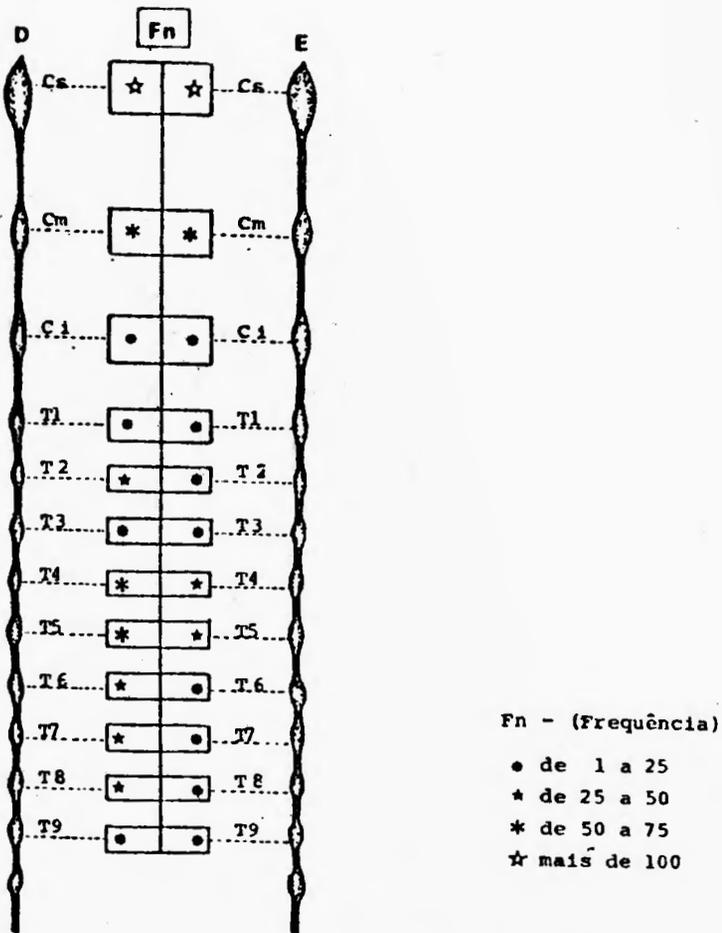


FIGURA 2 - Esquema das cadeias simpáticas direita e esquerda de rato, destacando a distribuição e a frequência dos corpos celulares marcados com o HRP (Fn - Frequência de neurônios)

TABELA 1 - Frequência observada e esperada para as diferentes entidades e o total de neurônios marcados

C <sub>a</sub>	C <sub>m</sub>	C <sub>1</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	Tipo I	Tipo II	Tipo III	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>8</sub>	T <sub>9</sub>	Total
(87,87)	(87,87)	(87,87)	(87,87)	(87,87)	(87,87)	(87,87)	(87,87)	(87,87)	(87,87)	(87,87)	(87,87)	(87,87)	(87,87)	(87,87)	
228	123	29	30	52	30	275	71	85	88	85	63	50	42	14	1318
$\chi^2 = 848,42$															

TABELA 2 - Frequências observadas e esperadas para as diferentes entidades tanto para o lado diestro como esquermo e o total de neurônios marcados

	C <sub>a</sub>	C <sub>m</sub>	C <sub>1</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>9</sub>	Tipo I	Tipo II	Tipo III	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>8</sub>
Direito	(140,5)	(61,5)	(14,5)	(15)	(26)	(15)	(7)	(137,5)	(35,5)	(42,5)	(44)	(42,5)	(31,5)	(25)	(21)
	150	64	7	6	27	20	7	106	40	66	54	54	40	26	28
Esquerdo	(140,5)	(61,5)	(14,5)	(15)	(26)	(15)	(7)	(137,5)	(35,5)	(42,5)	(44)	(42,5)	(31,5)	(25)	(21)
	131	59	22	24	25	10	7	169	31	19	34	27	23	24	14
Total	281	123	29	30	52	30	14	275	71	85	88	85	63	50	42
$\chi^2$	1,28	0,2	7,75	7,80	0,08	3,33	0	14,43	1,14	25,99	4,54	11,30	4,58	0,08	4,66
	ns	ns	s	s	ns	ns	ns	s	ns	s	s	s	s	ns	s

## DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram após a injeção de HRP no timo do rato, a presença de neurônios marcados em vários gânglios da cadeia simpática direita e esquerda, distribuídos desde o gânglio cervical superior até o 9º gânglio torácico, o que evidencia a atuação do sistema nervoso simpático no timo. Estes dados são confirmados por Williams e Felten (1981), Williams et al. (1981) e Singh (1984), que utilizando técnicas histofluorescentes e imunocitoquímicas conseguiram visualizar a presença de fibras simpáticas na região perivascular e no parênquima do timo, além da presença de fibras isoladas no parênquima sem nenhuma associação vascular, fato por nos constatado com o auxílio das técnicas utilizadas. Observando a presença de fibras simpáticas em nervos cardíacos de cães, Armour e Hopkins (1981) evidenciaram corpos neuronais marcados com HRP no gânglio médio da cadeia simpáticas, bilateralmente. Já Shih et al. (1985) utilizando o mesmo tipo de traçador para várias regiões do coração de gatos, descreveram neurônios marcados retrogradamente, ao nível do gânglio cervical superior e médio, estes em maior quantidade; além disso, neurônios marcados que se distribuíram até T<sub>9</sub> foram também evidenciados através do HRP, e por Norris, Foreman e Wurster (1974), com a utilização da técnica de eletroestimulação em gânglios da região cervical e torácica da cadeia simpática de cães. McKibben e Getty (1968) em estudos sobre a inervação em cães descreveram nervos cardíacos torácicos projetando-se ao mesmo nível de marcação do oitavo segmento medular torácico. Em nossos achados sobre o timo do rato, embora em alguns casos o gânglio cervical médio estivesse ausente, verificamos a marcação de um maior número de corpos neuronais ao nível do gânglio cervical superior e do gânglio estrelado. Segundo Marino et al. (1987) o timo se origina da terceira ou quarta bolsa faríngea, apresenta-se situado na região torácica, atingindo inferiormente o nível medular T<sub>8</sub>, ou na parte da região cervical e parte na região torácica, apresentando-se do tipo cérvico-torácico com limite inferior ao nível do segmento medular T<sub>3</sub>, razão pela qual observamos corpos celulares marcados ao nível dos segmentos torácicos mais baixos, em muito se assemelhando aos resultados observados pelos estudos dos autores acima citados e descritos. Neurônios até T<sub>9</sub> também foram observados, embora em menor quantidade. Williams et al. (1981) são da opinião que a inervação simpática atua como um sistema modulador da resposta imune humoral, sugerindo que a inervação do timo se faz por fibras nervosas simpáticas. Tal fato está de acordo com o trabalho de Soloviyev (1966) que removeu o gânglio cervical superior, médio e inferior da cadeia simpática de gatos e observou a degeneração de fibras nervosas miélicas e amielínicas no tecido glandular. Quando o gânglio estrelado era extirpado provocava a degeneração de um grande número de fibras nervosas do timo, demonstrando que, possivelmente, os ramos penetram em sua grande maioria ao nível do gânglio estrelado podendo seguir trajetos ascendentes ou

descendentes dentro da cadeia simpática. Levando-se em consideração as várias maneiras de disposição das cadeias simpáticas direita e esquerda em relação à distribuição dos seus gânglios, assim como a presença de gânglios estrelados do tipo I, II, e III, percebemos que a maioria dos gânglios marcados retrogradamente pela injeção de HRP, está situada ao nível dos gânglios estrelados, mais que ao nível do gânglio cervical superior, como talvez fosse de se esperar, devido à situação predominantemente cérvico-torácica dos timos estudados.

Em nossos resultados, comparando-se as cadeias direita e esquerda verificamos diferenças significativas quanto ao número de neurônios marcados nos gânglios C<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub> e T<sub>8</sub> e estrelados do tipo I e III, demonstrando uma maior marcação nos gânglios T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub> e T<sub>8</sub> e estrelado do tipo III para o lado direito e C<sub>1</sub>, T<sub>1</sub> e estrelado do tipo I para o lado esquerdo. Notamos desta forma uma discreta predominância dos gânglios da cadeia simpática direita, sugerindo uma maior difusão do marcador neuronal no lobo direito, e não uma grande quantidade de inervação deste lobo.

## CONCLUSÕES

- a) o timo apresenta inervação proveniente da parte simpática do sistema nervoso autônomo;
- b) a maior quantidade de neurônios destinados ao timo está localizada nos gânglios estrelado e cervical superior das cadeias simpáticas direita e esquerda.

## ABSTRACT

The investigation was to study the sympathetic innervation of the thymus. The enzyme horseradish peroxidase (HRP) was used to retrogradely label the cell bodies of origin of the nerve fibers responsible for the innervation of the gland. In 19 albino rats the thymus was exposed under general anesthesia and a conjugate of HRP-WGA was injected bilaterally into the parenchyma of the gland. After a survival time of 3 days, animals were again anesthetized and perfused transcardially with karnovsky's fixative. The right and left sympathetic chains were removed from the animals. The sympathetic chains were processed as wholemounts for HRP demonstration. Labeled neurons were present from the first cervical ganglion to 9<sup>th</sup> thoracic, although they were found in higher number in the superior cervical ganglion and stellate ganglia. These findings give additional data for a better understanding of the innervation of the thymus by the autonomic nervous system.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ARMOUR, J. A.; HOPKINS, D. A. Localization of sympathetic postganglionic neurons of physiologically identified cardiac nerves in the dog. *Journal of Comparative Neurology*, New York, v. 202, p. 169-184, 1981.
- 2 BULLOCH, K.; MOORE, R. Innervation of the thymus gland by brain and spinal cord in mouse and rat. *American Journal of Anatomy*, New York, v. 162, p. 157-166, 1981.

- 3 —; POMERANTZ, W. Autonomic nervous system innervation of the thymic related lymphoid tissue in wild type and nude mice. *Journal of comparative Neurology*, New York, v. 228, p. 57-78, 1984.
- 4 MCKIBBEN, J.; GETTY, R. A comparative morphologic study of the cardiac innervation in domestic animals. I. The canine. *American Journal of Anatomy*, New York, v. 122, p. 533-544, 1968.
- 5 MAGNI, F.; BRUSCHI, F.; KASTI, M. The afferent innervation of the thymus gland in the rat. *Brain Research*, Amsterdam, v. 424, p. 379-385, 1987.
- 6 MARINO, D.; ARGÈME, M.; BRUNET, C. et al. Macroscopic study of the adult thymus. *Surgical and Radiologic*, v. 9, p. 51-62, 1987.
- 7 MESULAM, M. -M. Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferentes and efferents. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, New Brunswick, v. 26, p. 106-117, 1978.
- 8 NORRIS, J.; FOREMAN, R.; WURSTTER, R. Responses of the canine heart to stimulation of the first five ventral thoracic roots. *American Journal of Physiology*, Bethesda, v. 227, p. 9-12, 1974.
- 9 SERGEEVA, V. Histotopography of catecholamines in the mammalian thymus. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, New York, v. 77, p. 456-458, 1974.
- 10 SHIH, C.; CHUANG, K.; TSAI, S. et al. Horseradish peroxidase localization of the sympathetic postganglionic neurons innervating the cat heart. *Journal of Autonomic Nervous System*, v. 13, p. 179-189, 1985.
- 11 SINGH, U. Lymphopoiesis in the nude fetal thymus following sympathetomy. *Cellular Immunology*, San Diego, v. 93, p. 222-228, 1985.
- 12 SINGH, U. Sympathetic innervation of fetal mouse thymus. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 14, p. 757-759, 1984.
- 13 SOLOVIYEV, V. On the sources of innervation of the thymus blaupp. *Arkhiv Anatomii Gistologii i Embriologii*, Moscow, v. 51, p. 76-82, 1966.
- 14 STEIN, M.; SCHIAMI, R.; CAMERINO, M. Influence of brain and behavior on the immune system. *Science*, Washington, v. 191, p. 435-440, 1976.
- 15 VIEIRA, S. *Introdução à bioestatística*. 2. ed. Rio de Janeiro : Ed. Campus, 1983. p. 195-199: O teste de  $X^2$ .
- 16 WILLIAMS, J.; FELTEN, D. Sympathetic innervation of murine and spleen: a comparative histofluorescence study. *Anatomical Record*, New York, v. 199, p. 531-532, 1981.
- 17 —; PETERSON, R.; SHEA, P. et al. Sympathetic Innervation of murine thymus and spleen: evidence for a functional link between the nervous and immune system. *Brain Research Bulletin*, New York, v. 6, p. 83-94, Jan. 1981.

Recebido para publicação em 22 de dezembro de 1992