

NABOR BEZERRA DE MOURA JÚNIOR

Estudo anátomo-funcional de gânglios da
cadeia simpática torácica na hiperidrose
primária

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

Programa de: Cirurgia Torácica e
Cardiovascular
Orientador: Prof. Dr. José Ribas
Milanez de Campos

São Paulo
2012

NABOR BEZERRA DE MOURA JÚNIOR

Estudo anátomo-funcional de gânglios da
cadeia simpática torácica na hiperidrose
primária

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

Programa de: Cirurgia Torácica e
Cardiovascular
Orientador: Prof. Dr. José Ribas
Milanez de Campos

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moura Júnior, Nabor Bezerra de

Estudo anátomo-funcional de gânglios da cadeia simpática torácica na
hiperidrose primária / Nabor Bezerra de Moura Júnior. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: José Ribas Milanez de Campos.

Descritores: 1.Hiperidrose/fisiopatologia 2.Gânglios simpáticos 3.Acetilcolina
4.Receptores nicotínicos 5.Imunoistoquímica 6.Morte encefálica

USP/FM/DBD-007/12

DEDICATÓRIA

Dedicatória

A Deus, fonte da vida e da sabedoria.

“A luz da sabedoria brilha forte e não se apagará; aqueles que a amam a vêem facilmente, e quem a procura acha. Ela está pronta para se apresentar aos que a querem. (...) Ela mesma sai à procura daqueles que merecem encontrá-la; com gentileza, aparece a eles no caminho e se encontra com eles em todos os seus pensamentos.”

Sb 6:13-14;17.

Aos meus pais, Nabor e Teresinha, pois tudo o que sou devo a eles.

“Não chores, meu filho;

Não chores, que a vida

É luta renhida:

Viver é lutar.

A vida é combate,

Que os fracos abate,

Que os fortes, os bravos

Só pode exaltar.”

Gonçalves Dias

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Em especial, à Ana Cecília que, além do companheirismo e da fonte de inspiração, tem sido fundamental em todas as fases deste trabalho, desde o projeto até a revisão do texto final, passando pela captação de gânglios às noites e aos finais de semana. Te amo!

Ao Prof. Dr. José Ribas Milanez de Campos, orientador desta tese, pelo estímulo constante e por nortear meu cominho na busca pelo conhecimento.

Ao Dr. Leonardo Borges de Barros e Silva, em nome de quem agradeço a toda a equipe da OPO-HC, por acolher minhas idéias e pelo trabalho incansável na busca pela melhoria da qualidade de vida de tantas pessoas.

Aos colegas Israel Lopes de Medeiros e Alessandro Wasum Mariani, pelo incomensurável auxílio na captação dos gânglios.

Ao Dr. João Carlos das Neves Pereira, pelas idéias que tanto contribuíram para o enriquecimento deste trabalho e pelo enorme auxílio com a análise imuno-histoquímica.

Ao Dr. Wanderley Marques Bernardo, pelas imprescindíveis contribuições ao projeto inicial e pela instrução durante a pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Fabio Biscegli Jatene, pelos ensinamentos desde o período da residência em Cirurgia Torácica até o doutorado, que extrapolam os aspectos técnicos.

Aos Drs. Helio Minamoto e Miguel Lia Tedde, por me acolherem em suas equipes e compartilharem seus conhecimentos durante a realização desta tese.

Aos colegas Marcello José Scatena, Elias Albino Theophilo e Flávio Henrique Savazzi, por repartirem comigo suas experiências em cirurgia.

Aos preceptores e residentes de Cirurgia Torácica, sobretudo aos colegas Fernando Conrado Abrão, Artur Eugênio Azevedo Pereira, Caio Cesar Inaco Cirino, Letícia Leone Lauricella e André Portela Alcolea, pela ajuda, paciência e compreensão durante os procedimentos cirúrgicos.

A toda a equipe do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mormente a Sandra de Moraes Fernezlian, pela dedicação e brilhantismo com que conduziu as técnicas de imuno-histoquímica, e a Kely Cristina Soares Bispo, pela preparação das lâminas e

pelo enorme esforço, nas inúmeras tentativas de adequação da técnica histoquímica.

Ao Dr. Edwin Roger Parra-Cuentas e à Prof^a. Dr^a. Vera Luiza Capelozzi, pelas sugestões e orientações em Anatomia Patológica, sobretudo quanto à quantificação dos anticorpos.

Ao estimado amigo Aristides Tadeu Correia, pelo trabalho de revisão de toda a estatística desta pesquisa.

À equipe do Laboratório Anatômico Cirúrgico do Instituto do Coração, Rosângela Monteiro, Márcia Cristina Augusto e Eliana Ogata, pelo subsídio ao andamento adequado da pesquisa.

Ao colega Flávio Roberto Garbelini de Oliveira, por dividir o árduo trabalho de coleta do material e análise dos dados.

Ao Prof. Dr. Nelson Wolosker, pelas valiosas sugestões à redação final desta tese.

De modo especial, aos pacientes que participaram deste estudo, pela compreensão e por propiciar a realização desta pesquisa; em especial, às famílias dos doadores que, mesmo com a dor da perda, encontram hombridade para benefício de outrem. Sem vocês, nada disso seria possível.

Normalização adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Resumo

Summary

| | |
|--|----|
| 1 Introdução | 1 |
| 1.1 Fisiopatologia da hiperidrose primária | 3 |
| 1.1.1 Atividade simpática cutânea | 3 |
| 1.2 Breve histórico do conhecimento sobre o sistema nervoso autônomo | 4 |
| 1.3 Anatomia e fisiologia do sistema nervoso autônomo | 7 |
| 1.4 Receptor nicotínico neuronal da acetilcolina | 11 |
| 1.4.1 A subunidade α_3 | 12 |
| 1.4.2 A subunidade α_7 | 13 |
| 1.4.3 As subunidades α_4 e α_5 | 13 |
| 1.4.4 As subunidades β | 14 |
| 2 Objetivos | 15 |
| 3 Métodos | 17 |
| 3.1 Desenho da pesquisa | 18 |
| 3.2 Ambientação da pesquisa | 18 |
| 3.3 Tamanho da amostra | 19 |

| | |
|---|----|
| 3.4 Critérios de inclusão e exclusão | 20 |
| 3.5 Procedimentos cirúrgicos e analíticos | 20 |
| 3.6 Técnica de imuno-histoquímica | 21 |
| 3.7 Quantificação da expressão dos anticorpos | 21 |
| 3.7.1 Cegamento | 22 |
| 3.8 Análise estatística | 23 |
| 3.8.1 Análise estatística descritiva | 23 |
| 3.8.2 Análise estatística inferencial | 24 |
| 4 Resultados | 25 |
| 5 Discussão | 37 |
| 6 Conclusões | 45 |
| 7 Anexos | 47 |
| 8 Referências | 54 |
| Apêndice | |

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

(em ordem alfabética)

© – *Copyright*

° – Grau

°C – Grau Celsius

µL – Microlitro

µm² – Micrômetro quadrado

ab37010 – Anticorpo primário contra acetilcolina

ab55773 – Anticorpo primário contra a subunidade α₃ do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina

ab10096 – Anticorpo primário contra a subunidade α₇ do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina

AC – Antes de Cristo

BSA – Albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*)

CAPPesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

cm - Centímetro

DAB – Diaminobenzidina

F – Feminino

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HCl – Ácido clorídrico

HP – Hiperidrose primária

IGg – Imunoglobulina do tipo G

IMC – Índice de massa corpórea

IQ_{25-75%} – Intervalo interquartil

Kg/m² – quilograma por metro quadrado

M – Masculino

MA – *Massachusetts*

mg – Miligrama

min – Minuto

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mmHg – Milímetro de mercúrio

nAChR – Receptor nicotínico da acetilcolina (*nicotinic acetylcholine receptor*)

OPO-HC – Organização de Procura de Órgãos do Hospital das Clínicas

PAM – Pressão arterial média

PBS – Solução tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*)

pH – Potencial de hidrogênio

RE7280-K – *Novolink Max Polymer*

UK – *Reino Unido (United Kingdom)*

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNC – Sistema nervoso central

SPSS – Pacote estatístico para as ciências sociais (*statistical package for the social sciences*)

Lista de quadros e tabelas

| | |
|---|----|
| Quadro 01 – Critérios de inclusão e exclusão | 20 |
| Quadro 02 – Fichas de dados dos participantes | 23 |
| Tabela 01 – Dados demográficos | 26 |
| Tabela 02 – Distribuição dos sítios de hiperidrose | 27 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 01 – Representação esquemática de corpúsculos de Nissl em neurônio | 8 |
| Figura 02 – Neurotransmissores das fibras pré e pós-ganglionares dos sistemas simpático e parassimpático | 10 |
| Figura 03 – Representação esquemática do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina | 12 |
| Figura 04 – Diagrama de fluxo dos participantes | 26 |
| Figura 05 – Expressão do anticorpo contra a subunidade α_3 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático | 28 |
| Figura 06 – Área de expressão forte do anticorpo contra a subunidade α_3 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático..... | 28 |
| Figura 07 – Área de expressão fraca do anticorpo contra a subunidade α_3 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático..... | 29 |
| Figura 08 – Expressão do anticorpo contra a subunidade α_7 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático | 30 |
| Figura 09 – Área de expressão forte do anticorpo contra a subunidade α_7 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático..... | 31 |

| | |
|--|----|
| Figura 10 – Área de expressão fraca do anticorpo contra a subunidade α_7 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático..... | 32 |
| Figura 11 – Expressão do anticorpo contra acetilcolina no gânglio simpático..... | 33 |
| Figura 12 – Área de expressão forte do anticorpo contra acetilcolina no gânglio simpático | 33 |
| Figura 13 – Área de expressão fraca do anticorpo contra acetilcolina no gânglio simpático | 34 |
| Figura 14 – Método de quantificação da expressão do anticorpo contra acetilcolina | 52 |
| Figura 15 – Controle de artefatos na quantificação da expressão dos anticorpos | 53 |

Lista de gráficos

- Gráfico 01** – Quantificação da área de expressão forte do anticorpo contra a subunidade α_3 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático, por grupo 29
- Gráfico 02** – Quantificação da área de expressão fraca do anticorpo contra a subunidade α_3 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático, por grupo 30
- Gráfico 03** – Quantificação da área de expressão forte do anticorpo contra a subunidade α_7 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático, por grupo 31
- Gráfico 04** – Quantificação da área de expressão fraca do anticorpo contra a subunidade α_7 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático, por grupo 32
- Gráfico 05** – Quantificação da área de expressão forte do anticorpo contra acetilcolina no gânglio simpático, por grupo 34
- Gráfico 06** – Quantificação da área de expressão fraca do anticorpo contra acetilcolina no gânglio simpático, por grupo 35
- Gráfico 07** – Distribuição dos diâmetros dos gânglios ressecados, por grupo..... 36

Resumo

Moura Júnior NB. *Estudo anátomo-funcional de gânglios da cadeia simpática torácica na hiperidrose primária*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 63p.

Introdução: A hiperidrose primária (HP) é uma desordem que afeta negativamente a qualidade de vida de seus portadores. A fisiopatologia da HP não é bem compreendida e acredita-se que uma complexa disfunção do sistema nervoso simpático esteja relacionada com sua etiologia. A ressecção de um ou mais gânglios da cadeia simpática torácica constitui-se como o método mais eficiente de controle da HP; apesar disso, pouco se sabe sobre o funcionamento dos gânglios simpáticos em indivíduos normais e em portadores de HP. **Objetivos:** Analisar a expressão de acetilcolina e das subunidades α_3 e α_7 de seu receptor nicotínico neuronal em gânglios da cadeia simpática torácica de portadores de HP palmar e comparar estes resultados com os obtidos de não portadores; avaliar se existe diferença de tamanho entre esses gânglios. **Métodos:** Estudo transversal, no qual foram analisados dois grupos de 20 participantes: no grupo Hiperidrose, portadores de HP palmar, candidatos a simpatectomia torácica; no grupo Controle, doadores falecidos de órgãos sem história prévia de sudorese excessiva. Em todos os indivíduos foram realizados: ressecção do 3º gânglio simpático esquerdo; aferição do maior diâmetro do gânglio; avaliação imuno-histoquímica pela quantificação das áreas de expressão forte e fraca de anticorpos primários contra acetilcolina e contra as subunidades α_3 e α_7 de seu receptor nicotínico neuronal. **Resultados:** A mediana da idade dos participantes foi menor no grupo Hiperidrose em relação ao Controle; a proporção de homens e mulheres foi de 3:17 no grupo Hiperidrose e 9:11 no Controle. A expressão da subunidade α_3 foi semelhante em ambos os grupos ($p = 0,78$ para expressão forte e $p = 0,31$ para expressão fraca). A área de expressão forte da subunidade α_7 correspondeu a 4,85% da área total em portadores de HP e a 2,34% nos controles ($p < 0,001$), enquanto a área de expressão fraca foi de 11,48% no grupo Hiperidrose e de 4,59% no Controle ($p < 0,001$). Expressão forte da acetilcolina foi encontrada em 4,95% da área total no grupo Hiperidrose e 1,19% no Controle ($p < 0,001$); expressão fraca foi encontrada em 18,55% e 6,77%, respectivamente ($p < 0,001$). O diâmetro dos gânglios ressecados foi de 0,71cm no grupo Hiperidrose e de 0,53cm no Controle ($p < 0,001$). **Conclusões:** Existe um aumento da expressão de acetilcolina e da subunidade α_7 do seu receptor nos gânglios simpáticos de portadores de HP; a subunidade α_3 do receptor nicotínico de acetilcolina tem expressão semelhante em gânglios simpáticos de portadores de HP e de não portadores; gânglios da cadeia simpática torácica apresentam diâmetro maior em portadores de HP.

Descritores: Hiperidrose/fisiopatologia. Gânglios Simpáticos. Acetilcolina. Receptores Nicotínicos. Imunoistoquímica. Morte Encefálica.

SUMMARY

Summary

Moura Junior NB. *Anatomofunctional study of thoracic sympathetic chain ganglia in primary hyperhidrosis*. [thesis]. Sao Paulo: Medical School, University of Sao Paulo; 2012. 63p.

Introduction: Primary hyperhidrosis (PH) is a disorder that impairs the quality of life of its bearers. The PH physiopathology is not well understood and a complex sympathetic nervous system dysfunction seems to be related with its etiology. The resection of one or more thoracic sympathetic chain ganglia is the most effective PH treatment; however sympathetic ganglia function in normal subjects and in PH patients is unknown. **Objectives:** Analyzing the immunohistochemical expression of acetylcholine and its neuronal nicotinic receptor's α_3 and α_7 subunits in thoracic sympathetic ganglia of PH patients and compare the results with those obtained from subjects without this disorder; identifying possible differences in size of these ganglia. **Methods:** Cross-sectional study, in which two groups of 20 subjects were analyzed: the Hyperhidrosis group, with palmar PH patients eligible to thoracic sympathectomy and the Control group, with organ donators after brain death without hyperhidrosis historical. For each subject it were performed: resection of the third left sympathetic ganglion; measurement of the ganglion's diameter; immunohistochemical evaluation by quantification of intense and mild expression areas of primary antibodies against acetylcholine and its neuronal nicotinic receptor's α_3 and α_7 subunits. **Results:** The median of participants' age was smaller in Hyperhidrosis group than in Control; the male/female ratio was 3:17 in Hyperhidrosis group and 9:11 in Control. The α_3 subunit expression was similar in both groups ($p = 0.78$ for intense expression and $p = 0.31$ for mild expression). Intense α_7 subunit expression area was 4.85% in PH patients and 2.34% in controls ($p < 0.001$) whereas mild expression area was 11.48% in Hyperhidrosis group and 4.59% in Control ($p < 0.001$). Intense acetylcholine expression was found in 4.95% of total area in Hyperhidrosis group and in 1.19% in Control ($p < 0.001$); mild expression was found in 18.55% and 6.77%, respectively ($p < 0.001$). Ganglia diameter was 0.71cm in Hyperhidrosis group and 0.53cm in Control ($p < 0.001$). **Conclusions:** There is a higher expression of acetylcholine and its neuronal nicotinic receptor's α_7 subunit in sympathetic ganglia of PH patients; the α_3 subunit of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor shows similar expression in sympathetic ganglia of PH patients and subjects without this disorder; thoracic sympathetic chain ganglia diameter is bigger in PH patients.

Descriptors: Hyperhidrosis/physiopathology. Ganglia, Sympathetic. Acetylcholine. Receptors, Nicotinic. Immunohistochemistry. Brain Death.

1 Introdução

A sudorese é um processo fisiológico responsável, sobretudo, pela regulação da temperatura corporal, que pode aumentar em situações como exercício, calor excessivo no ambiente ou situações estressantes. As glândulas sudoríparas são classificadas em écrinas, quando lançam o suor diretamente na superfície cutânea, ou apócrinas, quando estão associadas a um folículo piloso¹⁻⁶.

A hiperidrose, definida como sudorese excessiva das glândulas écrinas em situações não fisiológicas, é uma desordem que afeta negativamente a qualidade de vida de seus portadores, desde o trabalho até as relações afetivas. Pode ser generalizada ou focal, acometendo principalmente as palmas das mãos, plantas dos pés, axilas e face^{1-4,6,7}.

Ocasionalmente, existe uma etiologia subjacente que justifica a hiperidrose, como obesidade, doenças neurológicas, endocrinológicas e metabólicas; no entanto, em muitas pessoas, a sudorese excessiva ocorre na ausência de outras condições que a justifiquem, quando é chamada de hiperidrose primária (HP)^{1-3,8}.

Sua prevalência pode chegar a 2,8% da população, acomete ambos os sexos de forma semelhante e em todas as faixas etárias, variando apenas a idade de início dos sintomas de acordo com a parte do corpo mais atingida: infância para a hiperidrose palmar e plantar, adolescência para a axilar e

idade adulta para a crânio-facial. Existe história familiar associada entre 12,5% e 56,5% dos pacientes, segundo estudos epidemiológicos^{1,9,10}.

1.1 Fisiopatologia da hiperidrose primária

A fisiopatologia da HP não é bem compreendida. Estudos morfológicos nas glândulas sudoríparas de portadores de HP não evidenciaram alterações em seu número ou histologia e acredita-se que uma complexa disfunção do sistema nervoso autônomo (SNA) simpático, responsável por sua inervação, esteja relacionada com sua etiologia^{2,3,5-7,11,12}. Tal disfunção pode ser demonstrada, por exemplo, a partir da menor variabilidade da frequência cardíaca (às manobras de Valsalva e da imersão da face em água fria) em portadores de HP comparada com indivíduos normais, que se eleva a níveis considerados normais após a simpatectomia¹³.

Logo, uma adequada compreensão da fisiopatologia da HP deve passar pelo estudo dos aspectos funcionais das estruturas anatômicas que compõem o sistema nervoso autônomo.

1.1.1 Atividade simpática cutânea

A atividade simpática em determinada parte do corpo pode ser estimada através da aferição da resistência cutânea à condução elétrica, uma medida indireta da função sudomotora simpática. Estudos prévios mostram resposta simpática cutânea elevada em portadores de HP em

comparação com indivíduos sadios, embora alguns autores tenham encontrado resposta próxima à normal; para esclarecer a dúvida, foi avaliada a curva de recuperação de excitabilidade da atividade simpática cutânea (duração do período de refratariedade a um segundo estímulo elétrico, após administração de um estímulo inicial), mais confiável, confirmando o achado de alteração da mesma em portadores de HP^{5,12,14-16}.

1.2 Breve histórico do conhecimento sobre o sistema nervoso autônomo

Cabe a Galeno (130-200 AC) a primeira descrição conhecida do sistema nervoso autônomo. Galeno chamou de “sexto nervo craniano” o conjunto dos nervos glossofaríngeo, vago e acessório, além da cadeia simpática; àquela ocasião, consideravam-se os nervos que descendiam do cérebro como “macios” e, necessariamente, sensitivos; além disso, Galeno considerou-o como um nervo oco, permitindo aos espíritos animais transitar de um órgão a outro, formando a cooperação e coordenação dos diversos órgãos, fenômeno à época batizado de: “simpatia”.

Apenas no século XVII houve progresso significativo nessa área e Thomas Willis (1621-1675), em 1664, sugeriu a diferenciação entre movimentação voluntária (regida pelo cérebro) e involuntária (comandada pelo cerebelo e de onde o vago e a cadeia simpática descenderiam); a “simpatia” transitaria entre os dois sistemas pelos ramos comunicantes.

Já no século XVIII, François Pourfour Du Petit (1664-1741), produziu miose, ptose e enoftalmia em um cão (tríade que seria identificada em humanos no século seguinte e batizada como síndrome de Horner), através da secção da cadeia simpática, demonstrando que esta estrutura produzia impulsos no sentido caudal-cranial e, portanto, não apenas descenderia a partir do cérebro. Cinco anos depois, Jacobus Benignus Winslow (1669-1760) sugeriu que a cadeia simpática seria um produto dos gânglios, com origem espinhal, logo, uma estrutura independente; os gânglios seriam “pequenos cérebros” independentes.

No final do mesmo século, Marie François Xavier Bichat (1771-1802) propôs uma separação anátomo-funcional da vida (e do sistema nervoso) em duas formas: a “vida orgânica”, caracterizada pela continuidade, assimetria, desarmonia e independência em relação aos hábitos e à educação, seria comandada pelos gânglios e chegaria ao fim com a morte do coração; já a “vida animal” seria caracterizada pela descontinuidade, simetria, harmonia e influenciada pelo meio externo, seu comando proviria do cérebro e terminaria com a morte deste, o que poderia acontecer antes da morte de diversos outros órgãos; a cadeia simpática não seria um nervo, mas um conjunto de “pequenos cérebros” (assim como propôs Winslow), por fim, propôs a denominação: sistema nervoso ganglionar.

Em meados do século XIX, Robert Remak (1815-1865), reconheceu as fibras amielínicas no sistema simpático, justificando desta forma a existência dos ramos comunicantes branco e cinzento, além de descobrir formações ganglionares no coração, batizadas de gânglios de Remak. Friedrich Bidder

(1810-1894) e Alfred Wilhelm Volkmann (1801-1877), após exaustiva contagem das fibras pré e pós-ganglionares ao microscópio, concluíram que as últimas são muito mais numerosas.

A ação vasoconstritora do sistema simpático foi demonstrada por dois experimentos: Claude Bernard (1813-1878) demonstrou vasodilatação após simpaticotomia em 1851; no ano seguinte, Charles Édouard Brown-Séquard (1817-1894) obteve vasoconstrição ao estimular o coto simpático. Claude Bernard também induziu glicosúria através da punção do quarto ventrículo, sugerindo a presença de interação entre o sistema nervoso autônomo e o sistema nervoso central. Ludwig Julius Budge (1811-1884) e Augustus Volney Waller (1816-1870) mostraram que a cadeia simpática provém parcialmente da medula, confirmando os achados de Pourfour Du Petit e Winslow. Albert Eulenburg (1840-1917) listou, entre outras, a hiperidrose unilateral como doença do sistema nervoso autônomo¹⁷.

O conhecimento anatômico e a classificação atual do sistema nervoso autônomo baseiam-se nos trabalhos de John Newport Langley (1852-1925) e Walter Holbrook Gaskell (1847-1914), que mostrou que a medula comunica-se com a cadeia simpática apenas através dos ramos comunicantes brancos, que os impulsos simpáticos provêm da coluna lateral da medula e postulou a existência de um sistema antagonista ao simpático. Langley desenvolveu a idéia e batizou esse sistema de parassimpático, além de demonstrar os neurônios pré e pós-ganglionares. Seu discípulo, Thomas Renton Elliot (1877-1961) mostrou que a adrenalina produzia os mesmos efeitos que a estimulação simpática^{17,18}.

Walter Rudolf Hess (1881-1973) foi vencedor do prêmio Nobel de Medicina de 1949 pelos seus trabalhos demonstrando a influência do hipotálamo sobre o sistema nervoso autônomo e chamando de “trofotrópico” o sistema parassimpático e de “ergotrópico” o sistema simpático, baseado nas suas funções. Otto Loewi (1873-1961) mostrou que a acetilcolina era responsável pela produção de impulsos no nervo vago e Ulf Svante von Euler (1905-1983) provou que o principal neurotransmissor nas fibras simpáticas era a noradrenalina¹⁷.

Coube a John Carew Eccles (1903-1997), prêmio Nobel de Medicina em 1963, um melhor conhecimento da fisiologia ganglionar, ao demonstrar que a neurotransmissão produzia tanto potenciais excitatórios quanto inibitórios pós-sinapse e que os gânglios autonômicos eram capazes de modular o impulso nervoso, além de simplesmente transmiti-lo^{19,20}.

A primeira simpatectomia com sucesso foi realizada por Thoma Ionescu (1860-1926) para tratamento de *angina pectoris* em 1916; no mesmo ano, René Leriche (1879-1955) introduziu o método para tratamento de doenças vasculares. Já em 1954, Matthias Kux publicou a primeira série de pacientes submetidos à simpatectomia videotoracoscópica^{17,21}.

1.3 Anatomia e fisiologia do sistema nervoso autônomo

O sistema nervoso autônomo, ou visceral eferente, é a porção do sistema nervoso responsável pela homeostase e, portanto, pela regulação da temperatura corporal, dentre outros²². Seu funcionamento independe da

vontade do indivíduo, de onde provém sua denominação. Anatomicamente, é formado por neurônios e fibras pré e pós-ganglionares; os primeiros estão localizados no tronco encefálico, de onde originam alguns nervos cranianos e na medula espinhal, do primeiro segmento torácico ao quarto segmento sacral, formando uma parte da substância cinzenta conhecida como coluna lateral da medula em sua porção tóraco-lombar^{23,24}.

Os corpos celulares dos neurônios pós-ganglionares concentram-se fora do sistema nervoso central (SNC) formando gânglios. Nestes corpos celulares (pericário), pode-se visualizar retículo endoplasmático rugoso associado a polirribossomos livres em grande número, formando os chamados corpúsculos de Nissl, cuja quantidade varia de acordo com o estado funcional do neurônio (figura 01)^{23,24}.

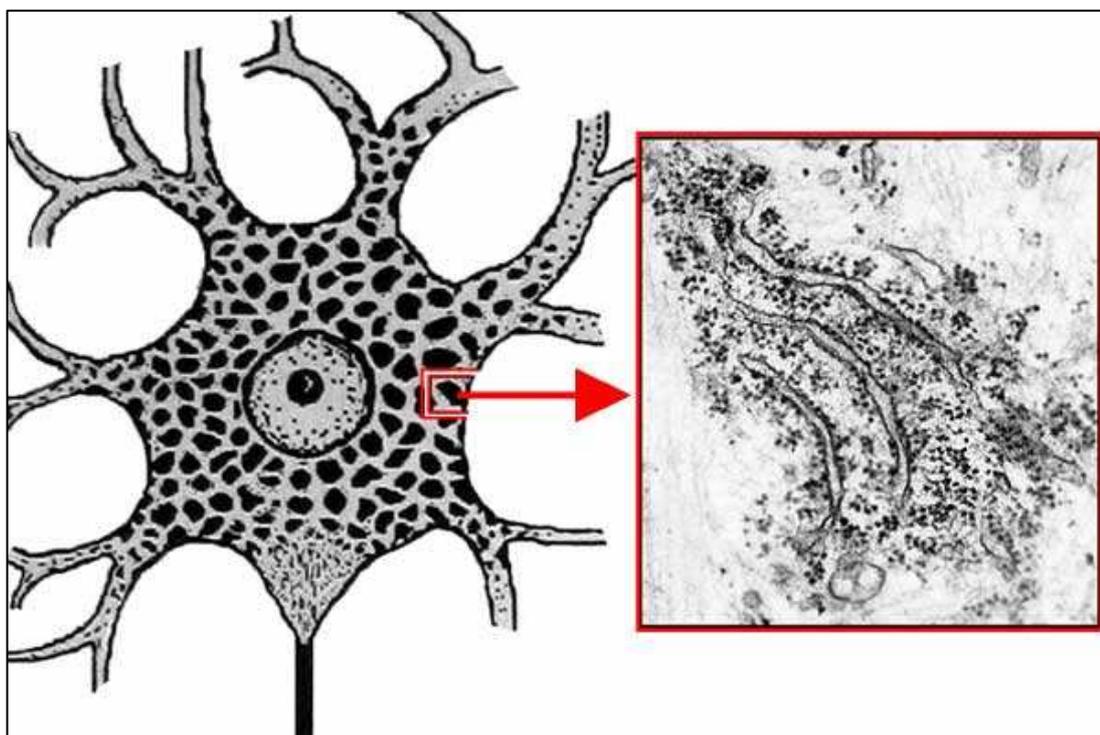


Figura 01 – Representação esquemática de corpúsculos de Nissl em neurônio. À direita: detalhe de sua ultraestrutura. Fonte: Fletcher TF. *Neurohistology atlas* [citado 18 nov 2011]. Disponível em: <http://vanat.cvm.umn.edu/neurHistAtls/pages/neuron7.html>²⁵

Conexões dos neurônios pré-ganglionares com o sistema límbico, notadamente com o hipotálamo, justificam a interdependência das emoções com o seu funcionamento, produzindo, por exemplo, sudorese palmar profusa em situação de estresse, mesmo em pessoa não portadora de hiperidrose^{23,24}.

Classicamente, divide-se o SNA em simpático e parassimpático. No primeiro, os neurônios pré-ganglionares localizam-se na coluna lateral da medula tóraco-lombar e os pós-ganglionares formam os gânglios das cadeias simpáticas pré e paravertebral, estrutura esta formada pelos diversos gânglios e seus respectivos ramos interganglionares que se estende da região cervical posterior, de cada lado, até o cóccix, onde as duas cadeias se fundem. No parassimpático, os neurônios pré-ganglionares situam-se no tronco encefálico e na medula sacral, enquanto os pós-ganglionares localizam-se próximo ou no interior da víscera efetora^{24,26}.

Funcionalmente, as fibras pós-ganglionares simpáticas caracterizam-se pela produção de noradrenalina (fibras noradrenérgicas ou, simplesmente, adrenérgicas) ao passo que as parassimpáticas produzem acetilcolina (fibras colinérgicas), produzindo efeitos antagônicos na maioria dos órgãos efetores. As fibras pré-ganglionares, por outro lado, são colinérgicas tanto no sistema nervoso simpático quanto no parassimpático (vide figura 02)^{24,26,27}.

Por sua vez, as glândulas sudoríparas são inervadas por fibras pós-ganglionares colinérgicas, apesar de fazerem parte do sistema simpático, além de não recebem inervação parassimpática; a excitação dessas fibras estimula a produção e excreção do suor. Além disso, os centros

hipotalâmicos relacionados com a sudorese são considerados, em geral, parassimpáticos^{6,24,26,27}.

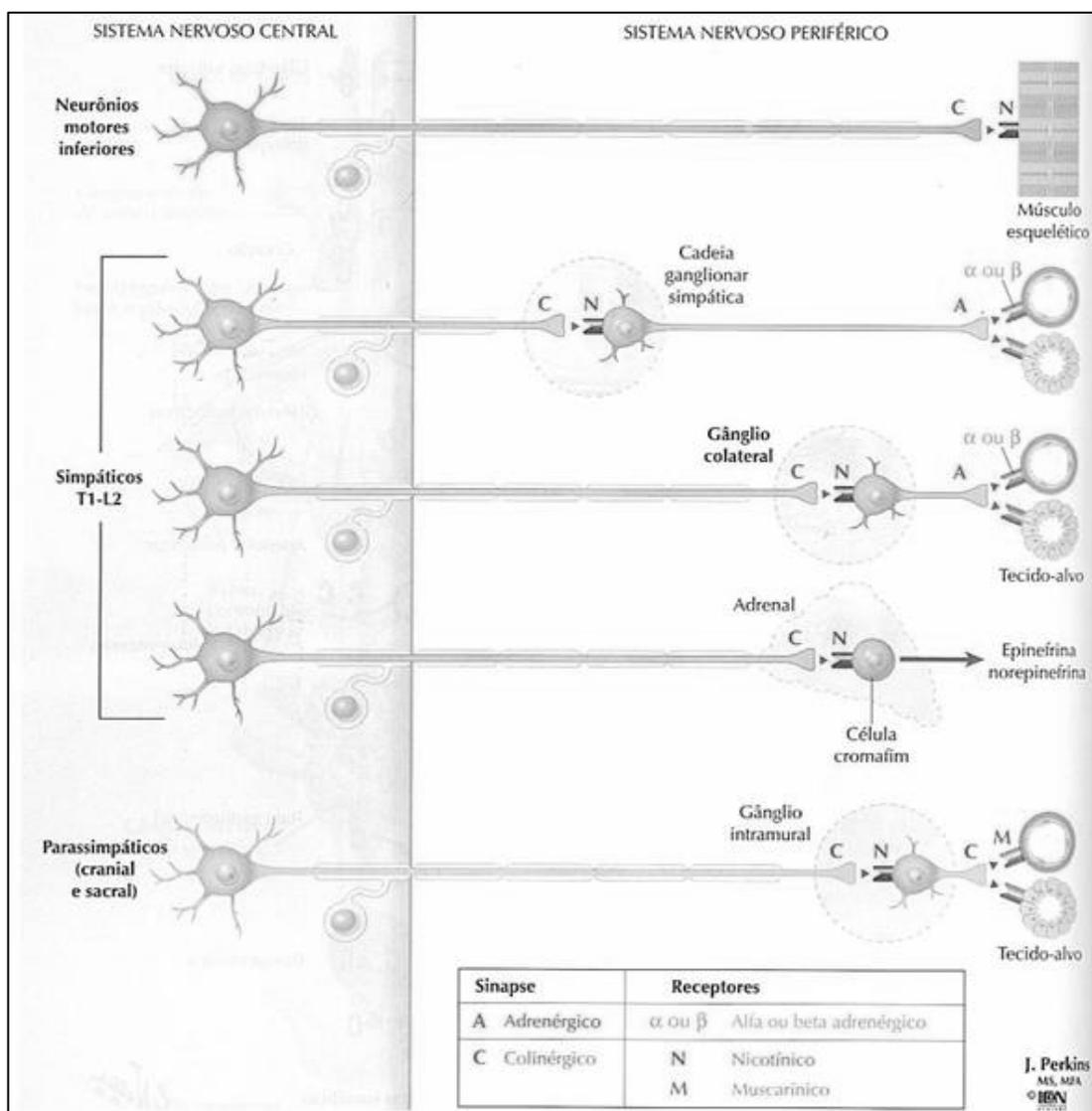


Figura 02 – Neurotransmissores das fibras pré e pós-ganglionares dos sistemas simpático e parassimpático. Adaptado de: Netter FH. *Atlas de anatomia humana*. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2000²⁸

As fibras pré-ganglionares simpáticas mielinizadas que emergem da coluna lateral da medula através da sua raiz ventral formando os ramos comunicantes brancos fazem sinapse com o neurônio pós-ganglionar, que por sua vez pode estar localizado em um gânglio paravertebral no mesmo nível vertebral da fibra, em um gânglio paravertebral localizado em níveis

acima ou abaixo do nível da fibra (formando os ramos interganglionares da cadeia simpática) ou em um gânglio pré-vertebral através dos nervos esplâncnicos. Dos gânglios, partem as fibras pós-ganglionares amielínicas que formam o ramo comunicante cinzento e dirigem-se ao órgão efector podendo se associar ou não a um nervo espinhal^{26,29}.

1.4 Receptor nicotínico neuronal da acetilcolina

A acetilcolina exerce seu papel através da ligação com receptores pós-sinápticos, desencadeando um potencial de ação que transmitirá o impulso nervoso. Estes receptores podem ser classificados como nicotínicos ou muscarínicos, de acordo com a molécula agonista utilizada para identificá-los; os receptores nicotínicos, por sua vez, subdividem-se em neuronal e muscular (encontrado nas placas motoras)²⁶. Nos gânglios simpáticos, o receptor de acetilcolina responsável pela neurotransmissão é do tipo nicotínico (nAChR) neuronal^{22,30}.

O nAChR é um canal iônico transmembrana que, depois de ativado pela ligação com a acetilcolina, media a transmissão sináptica rápida nos gânglios simpáticos, formado por subunidades α e β . Em humanos, tais subunidades dividem-se em diversos subtipos, sendo reconhecidas oito subunidades α ($\alpha_2 - \alpha_7$, α_9 e α_{10}) e três β ($\beta_2 - \beta_4$) entre os receptores nicotínicos neuronais. A ligação com as moléculas agonistas é feita através de dois resíduos cisteína na extremidade das subunidades α , o que as diferencia das subunidades β ^{22,30}. Os receptores são formados por um

pentâmero de duas subunidades α e três β , em diferentes combinações; como exceção, existem receptores formados apenas por subunidades α_7 , conforme esquematizado na figura 03.

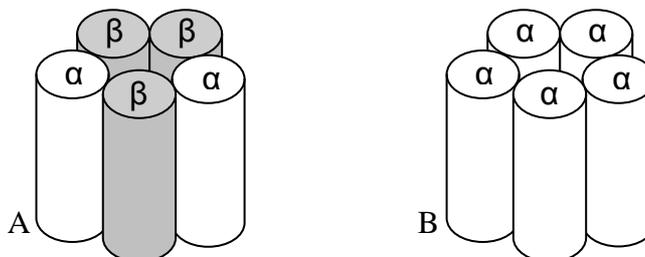


Figura 03 – Representação esquemática do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina. **A:** conformação habitual formada por 2 subunidades α e 3 subunidades β . **B:** receptor formado apenas por subunidades α

Gânglios autonômicos expressam as subunidades α_3 , α_4 , α_5 , α_7 , β_2 e β_4 , com predomínio da subunidade α_3 e as composições prevalentes são os heterômeros $\alpha_3\beta_4$ e $\alpha_3\beta_2$, além do homômero α_7 , embora sua distribuição não seja uniforme em diferentes gânglios, nem mesmo em diferentes neurônios do mesmo gânglio, e o papel funcional da maioria desses receptores ainda seja incerto^{22,30-33}. Os genes que codificam tais subunidades já foram identificados: o *locus* 15q24 é responsável pelas subunidades α_3 , α_5 e β_4 , enquanto a subunidade α_7 é codificada na localização 15q14, sendo parcialmente duplicada, o que dificulta sua análise genética²².

1.4.1 A subunidade α_3

Corresponde à subunidade predominante nos gânglios do sistema nervoso autônomo, mais frequentemente associada à subunidade β_4 , formando o receptor conhecido como “tipo ganglionar”. É a principal

subunidade responsável pela ligação das moléculas agonistas ao receptor, desencadeando a transmissão sináptica e apresenta uma proliferação importante na fase de desenvolvimento do sistema nervoso^{30-32,34,35}.

1.4.2 A subunidade α_7

Apesar de poder se associar com outras subunidades α , a principal forma de expressão desta se dá na forma de homômero, aberrante em relação aos demais receptores. Caracteriza-se por dessensibilização rápida e alta permeabilidade ao cálcio, sendo crucial nos eventos cálcio-dependentes nas células ganglionares. Localiza-se tanto na membrana pós quanto na pré-sináptica, modulando a liberação do neurotransmissor e regulando o crescimento neuronal, além de, assim como a subunidade α_3 , também apresentar aumento substancial em seu número nos gânglios simpáticos durante o desenvolvimento do sistema nervoso^{30,32,34,35}.

1.4.3 As subunidades α_4 e α_5

Apesar de desenvolver um papel crucial no SNC, a subunidade α_4 raramente é encontrada em gânglios autonômicos, com sua presença em tais estruturas sendo questionada por muito tempo. Já a subunidade α_5 desempenha um papel mais estrutural do que de ligação à acetilcolina e, em gânglios, está sempre associada à subunidade α_3 ; seu número não varia de forma significativa após o nascimento^{30,32,34}.

1.4.4 As subunidades β

Gânglios autonômicos expressam as subunidades β_2 e β_4 , sempre em associação com uma subunidade α , sobretudo α_3 ; assim como a subunidade α_5 , também não apresentam aumento significativo em seu número durante o desenvolvimento pós-natal. O bloqueio específico de uma subunidade é capaz de reduzir as correntes transmembrana até atingir um platô, mas é incapaz de aboli-las completamente, sugerindo a participação de múltiplos receptores com conformações diferentes nos gânglios autonômicos^{30,32,34}.

O tratamento dos casos moderados / severos de HP baseia-se no bloqueio clínico ou cirúrgico da estimulação simpática, seja ele local (por exemplo, utilizando-se toxina botulínica A) ou sistêmico (por exemplo, utilizando-se oxibutinina); a ressecção endoscópica de um ou mais gânglios da cadeia simpática torácica constitui-se hoje como o método mais eficiente de controle da HP palmar, axilar e crânio-facial, sobretudo para a primeira^{1,2,8,11,36,37}.

Além disso, a acetilcolina e as subunidades de seu receptor podem ser identificadas por imuno-histoquímica através de anticorpos específicos^{22,32,38}. No entanto, a intensidade da expressão dessas moléculas em gânglios simpáticos de portadores de HP é desconhecida.

OBJETIVOS

2 Objetivos

O objetivo principal deste estudo é analisar a expressão de acetilcolina e das subunidades α_3 e α_7 de seu receptor nicotínico neuronal em gânglios da cadeia simpática torácica de portadores de HP palmar e comparar estes resultados com os obtidos de não portadores.

O objetivo secundário é avaliar se existe diferença de tamanho entre esses gânglios.

3 Métodos

3.1 Desenho da pesquisa

Estudo transversal, aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração (InCor) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP – Apêndice 1). Os indivíduos elegíveis, ou seus responsáveis legais, concordaram com a participação no estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2) aprovado pela CAPPesq.

Os participantes foram divididos em 2 grupos: no grupo I, portadores de HP palmar severa (exclusivamente palmar ou em associação com outras localizações, desde que com predominância palmar) conforme constatado ao exame físico, candidatos a simpatectomia torácica; no grupo II, indivíduos sem história prévia de sudorese excessiva, doadores falecidos de órgãos e tecidos, como controles.

3.2 Ambientação da pesquisa

As ressecções dos gânglios do grupo I foram realizadas no InCor e na Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba.

As ressecções dos gânglios dos controles foram realizadas nos hospitais contidos na área de atuação da Organização de Procura de Órgãos do Hospital das Clínicas (OPO-HC) da FMUSP, com o cuidado especial de não atrasar a captação dos órgãos para transplante, interferindo o mínimo possível no processo de captação de órgãos.

A busca ativa de doadores, esclarecimento e obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido junto às famílias foi realizada pela equipe da OPO-HC, após orientação do pesquisador, de acordo com a legislação brasileira vigente.

O processamento do material, as reações histoquímicas e imunohistoquímicas, as microfotografias dos resultados e a quantificação da expressão dos anticorpos foram realizados no laboratório de Patologia da FMUSP.

3.3 Tamanho da amostra

Como não existem estudos prévios sobre os gânglios simpáticos em portadores de HP, foi realizada uma estimativa tomando por base uma medida funcional indireta (atividade simpática cutânea)¹² desses gânglios. O tamanho da amostra foi estimado assumindo um erro α de 0,05 e um erro β de 0,10 em uma comparação bi-caudal. Foi encontrado um valor de 20 indivíduos em cada grupo.

3.4 Critérios de inclusão e exclusão

Quadro 01 – Critérios de inclusão e exclusão

| | Grupo I | Grupo II |
|------------------------------|--|---|
| Critérios de inclusão | Portadores de hiperidrose com predominância palmar | Ausência de história prévia de sudorese excessiva |
| Critérios de exclusão | Portadores de qualquer doença neurológica, endocrinológica ou metabólica conhecida; Índice de Massa Corpórea > 25Kg/m ² ; Recusa na participação do estudo. | |

No grupo I, os dados foram coletados a partir de entrevista direta e exame físico; no grupo II, os dados foram colhidos de acordo com questionário respondido pela família (Anexo A).

3.5 Procedimentos cirúrgicos e analíticos

Em todos os participantes, foi realizada a abertura longitudinal da pleura parietal sobre a cadeia simpática torácica paravertebral esquerda. A cadeia simpática foi seccionada, utilizando-se tesoura endoscópica, imediatamente abaixo do 2º gânglio simpático e imediatamente acima do 4º gânglio. Em seguida, foram seccionados os ramos comunicantes do 3º gânglio, com posterior dissecação gentil do tecido conjuntivo frouxo e ressecção do referido gânglio. Todos os procedimentos foram realizados sob

anestesia geral, mantendo-se a pressão arterial média (PAM) entre 70 e 100mmHg e a temperatura ambiente próxima de 25°C.

Imediatamente após a ressecção, foram realizados:

- secção longitudinal do gânglio;
- aferição do seu maior diâmetro;
- fixação em formalina por 24 horas, com posterior parafinização;

Após a coleta de toda a casuística, foram realizados:

- avaliação imuno-histoquímica: quantificação, em lâminas silanizadas, de anticorpos primários contra acetilcolina e contra as subunidades α_3 e α_7 de seu receptor nicotínico neuronal (respectivamente: ab37010, ab55773 e ab10096. *Abcam, Inc. Cambridge, MA*);

3.6 Técnica de imuno-histoquímica

A diluição ideal dos anticorpos foi determinada através de diluições progressivas. Foi achado um valor de 1:300 para o anticorpo contra acetilcolina e de 1:100 para os anticorpos contra as subunidades α_3 e α_7 do receptor nicotínico neuronal de acetilcolina. A técnica completa está descrita em detalhes no anexo B.

3.7 Quantificação da expressão dos anticorpos

Foram realizadas 10 microfotografias representativas e não coincidentes de cada uma das lâminas em aumento de 400x, sendo que

todas as imagens foram obtidas sequencialmente, utilizando-se a mesma calibração do microscópio e a mesma intensidade de luz.

Para quantificação, foi utilizado o software Image-Pro Plus 6.0 (© *Media Cybernetics*), capaz de identificar e calcular a área de determinada cor ou grupo de cores, em μm^2 . No presente estudo, as áreas em marrom das microfotografias correspondem à positividade da presença do anticorpo em questão.

Para cada anticorpo estudado, foram criadas três “máscaras-padrão”: área total (excluídas as áreas com presença de artefatos de preparação das lâminas), área de marcação forte (correspondente às áreas com tons mais escuros de marrom) e área de marcação fraca (correspondente às áreas com tons mais claros de marrom) pelo anticorpo em questão. Em seguida, essas “máscaras” foram aplicadas às imagens obtidas das lâminas, calculada a média aritmética de cada uma das áreas para cada lâmina e consideradas para efeito de resultado a proporção de marcação forte e fraca, respectivamente, em relação à área total (Anexo C, figura 14).

As áreas com artefatos de preparação das lâminas foram excluídas da análise, conforme exemplificado no anexo D, figura 15.

3.7.1 Cegamento:

Para cada uma das lâminas estudadas, foi atribuído um número aleatório. No momento da quantificação, o pesquisador não teve acesso à informação de qual grupo pertencia cada lâmina analisada.

Os dados foram anotados de acordo com o quadro a seguir:

Quadro 02 – Fichas de dados dos participantes

| GRUPO I | GRUPO II |
|--|--|
| Nome (iniciais): Idade (anos completos): Sexo: ()M ()F Data da ressecção: | Nome (iniciais): Idade (anos completos): Sexo: ()M ()F Data da ressecção: |
| Diâmetro: Atividade de acetilcolinesterase: Expressão forte de acetilcolina: Expressão fraca de acetilcolina: Expressão forte da subunidade α_3 : Expressão fraca da subunidade α_3 : Expressão forte da subunidade α_7 : Expressão fraca da subunidade α_7 : | Diâmetro: Atividade de acetilcolinesterase: Expressão forte de acetilcolina: Expressão fraca de acetilcolina: Expressão forte da subunidade α_3 : Expressão fraca da subunidade α_3 : Expressão forte da subunidade α_7 : Expressão fraca da subunidade α_7 : |

3.8 Análise estatística

O pressuposto da distribuição normal das variáveis quantitativas foi avaliado pelo teste de Shapiro-Wilk, com achado de distribuição assimétrica para as variáveis: idade, diâmetro e expressão forte dos anticorpos contra acetilcolina e contra as subunidades α_3 e α_7 do receptor de acetilcolina; distribuição gaussiana foi encontrada nas variáveis: expressão fraca dos anticorpos contra acetilcolina e contra as subunidades α_3 e α_7 do receptor de acetilcolina.

3.8.1 Análise estatística descritiva:

A análise descritiva da variável qualitativa nominal estudada (sexo) foi realizada e apresentada como proporção. As variáveis quantitativas foram expressas através das medianas e intervalos interquartis (IQ_{25-75%}).

3.8.2 Análise estatística inferencial:

Foram utilizados: o teste de Mann-Whitney para análise das variáveis quantitativas e o teste exato de Fisher para a variável qualitativa.

Assumiu-se um nível de significância α de 0,05 com intervalo de confiança de 95% em uma distribuição bicaudal.

Utilizou-se o *software* SPSS 13.0 para *Windows* (© IBM) na análise estatística.

RESULTADOS

4 Resultados

Foram incluídos 47 indivíduos entre dezembro de 2008 e março de 2010, sendo 20 no grupo I (portadores de hiperidrose) e 27 no grupo II (controle); na figura 04, observa-se o diagrama de fluxo dos participantes:

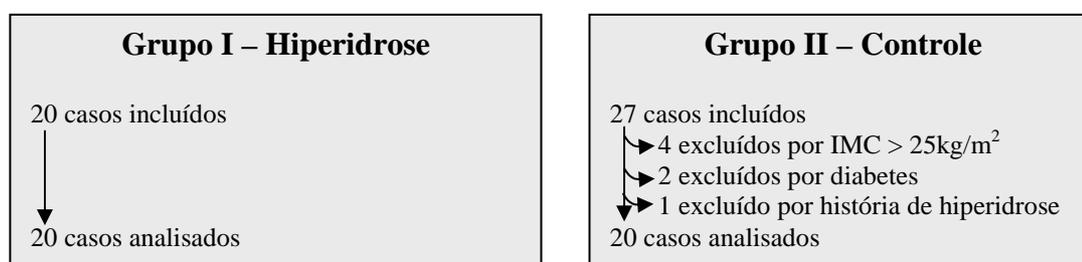


Figura 04 – Diagrama de fluxo dos participantes

No grupo controle, foram excluídos 4 doadores por $IMC > 25\text{kg/m}^2$, dois devido a antecedente de diabetes e um por história prévia de hiperidrose. Vinte casos elegíveis foram analisados em cada grupo.

Os dados demográficos estão sintetizados na Tabela 01.

Tabela 01 – Dados demográficos

| GRUPOS | Hiperidrose | Controle | <i>p</i> |
|--------------------------------|-----------------|-------------------|----------|
| Idade | 26 (24 – 30,25) | 46,5 (28,25 – 53) | 0,006 |
| Proporção de homens / mulheres | 3 / 17 | 9 / 11 | 0,034 |

NOTA: Idade apresentada em mediana e intervalo interquartil (IQ_{25-75%})

A mediana da idade foi de 26 anos (IQ_{25-75%}: 24 – 30,25 anos) para o grupo I – Hiperidrose e de 46,5 anos (IQ_{25-75%}: 28,25 – 53 anos) para o grupo II – Controle ($p = 0,006$). Quanto ao gênero, 12 indivíduos eram do sexo

masculino e 28 do sexo feminino; no grupo I – Hiperidrose, a distribuição foi de 3 homens e 17 mulheres e no grupo II – Controle, foi de 9 homens e 11 mulheres ($p = 0,034$).

Não houve complicações cirúrgicas nos sujeitos da pesquisa, assim como não aconteceu atraso significativo na captação dos demais órgãos no caso dos controles. Da mesma forma, não houve perda de dados.

A maioria dos participantes do grupo I – Hiperidrose referia outros sítios de hiperidrose além da palmar, conforme explicitado na tabela 02, sendo que apenas um (5%) apresentava hiperidrose palmar isolada.

Tabela 02 – Distribuição dos sítios de hiperidrose

| SÍTIO | n (%) |
|---------|----------|
| Palmar | 20 (100) |
| Plantar | 15 (75) |
| Axilar | 10 (50) |

Por outro lado, todos referiram a hiperidrose palmar como a mais intensa e com maior impacto negativo às suas atividades diárias.

A expressão do anticorpo contra a subunidade α_3 do receptor da acetilcolina foi semelhante nos dois grupos, conforme figura 05.

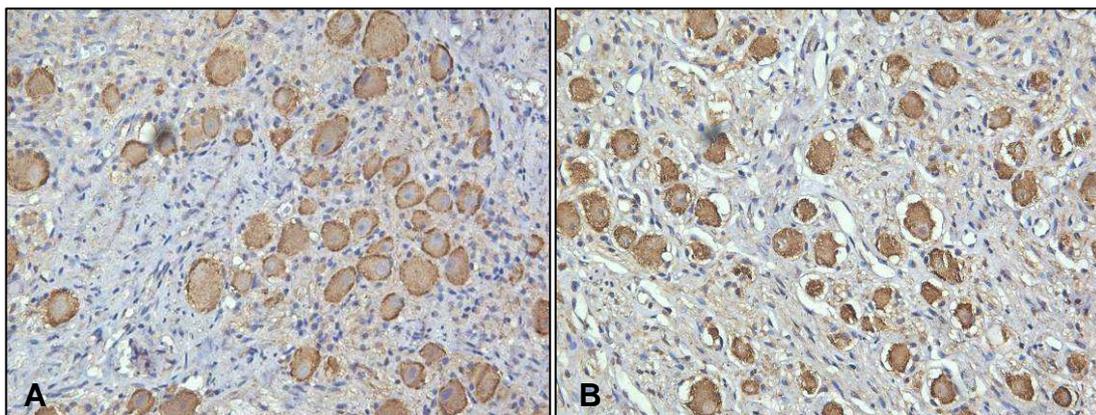


Figura 05 – Expressão do anticorpo contra a subunidade α_3 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático (em marrom). **A:** hiperidrose. **B:** controle

Houve marcação forte pelo anticorpo contra a subunidade α_3 do receptor de acetilcolina em 5,91% (IQ_{25-75%}: 3,29 – 9,14%) da área estudada no grupo I – Hiperidrose e em 6,55% (IQ_{25-75%}: 2,77 – 7,55%) no grupo II – Controle ($p = 0,779$), conforme ilustrado na figura 06.

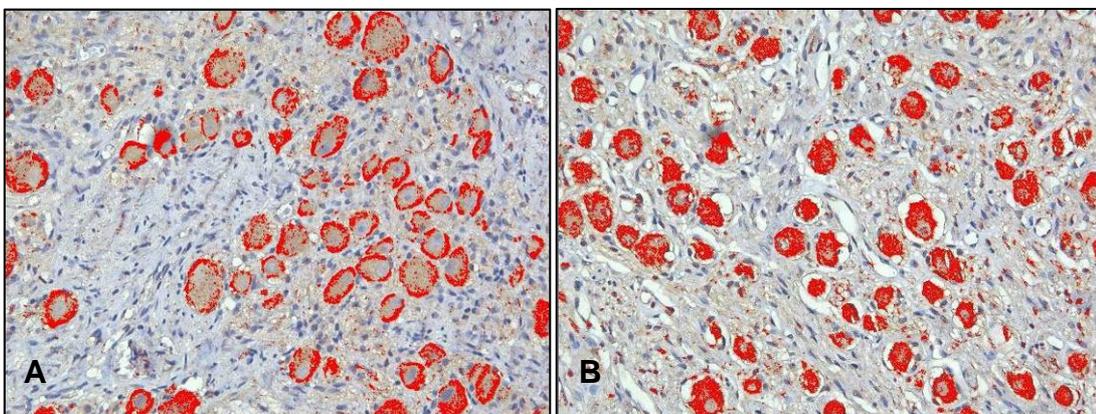
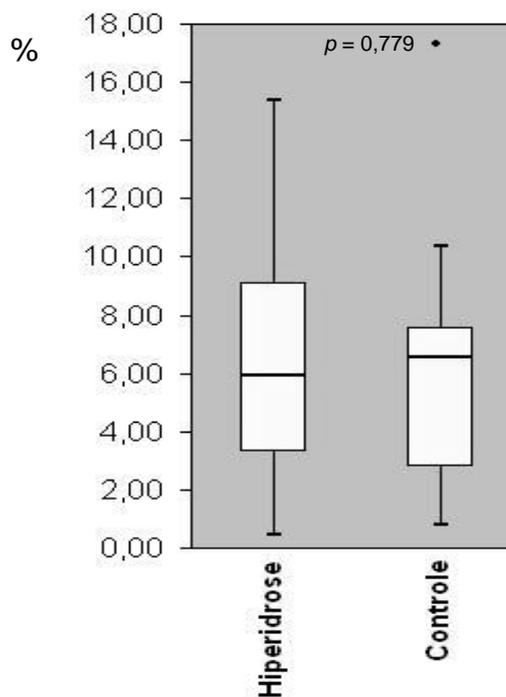


Figura 06 – Área de expressão forte do anticorpo contra a subunidade α_3 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático (em vermelho). **A:** hiperidrose. **B:** controle

O gráfico 01 ilustra a semelhança dessa distribuição entre os grupos.

Gráfico 01 – Quantificação da área de expressão forte do anticorpo contra a subunidade α_3 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático, por grupo



A área com marcação fraca deste anticorpo correspondeu a 7,23% (IQ_{25-75%}: 4,98 – 9,50%) da área total estudada no grupo Hiperidrose e a 6,47% (IQ_{25-75%}: 3,65 – 7,52%) no grupo Controle ($p = 0,314$), vide figura 07 e gráfico 02.

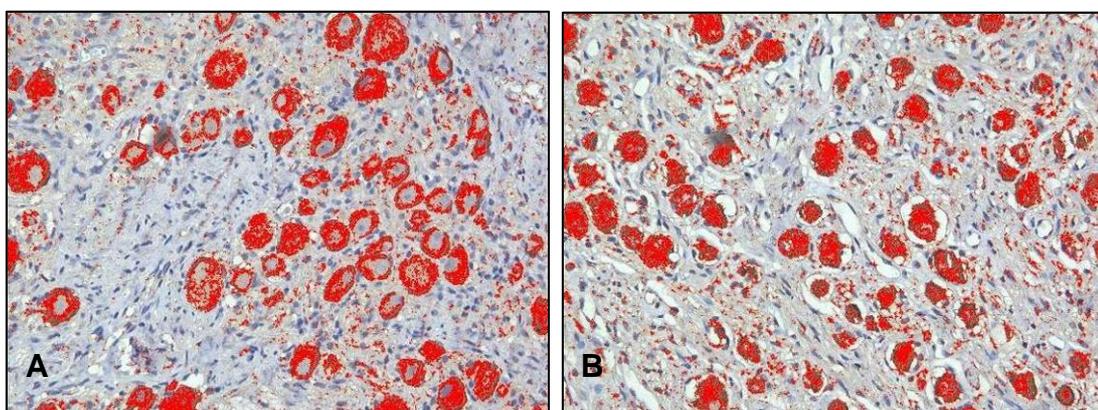
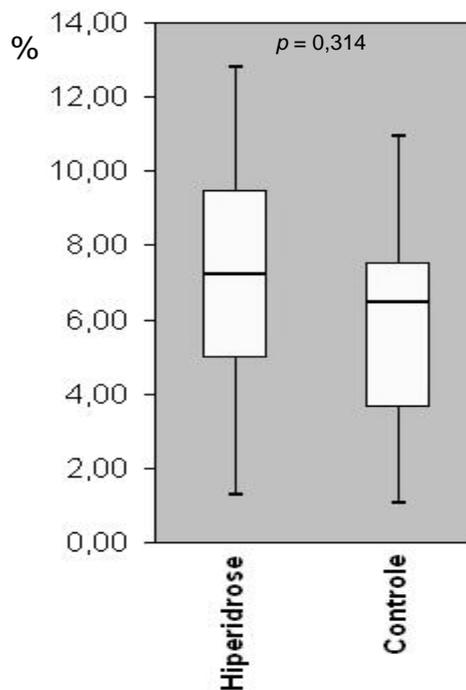


Figura 07 – Área de expressão fraca do anticorpo contra a subunidade α_3 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático (em vermelho). **A:** hiperidrose. **B:** controle

Gráfico 02 – Quantificação da área de expressão fraca do anticorpo contra a subunidade α_3 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático, por grupo



Os gânglios simpáticos dos portadores de hiperidrose primária expressaram o anticorpo contra a subunidade α_7 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina de forma mais intensa, como pode-se observar na figura 08.

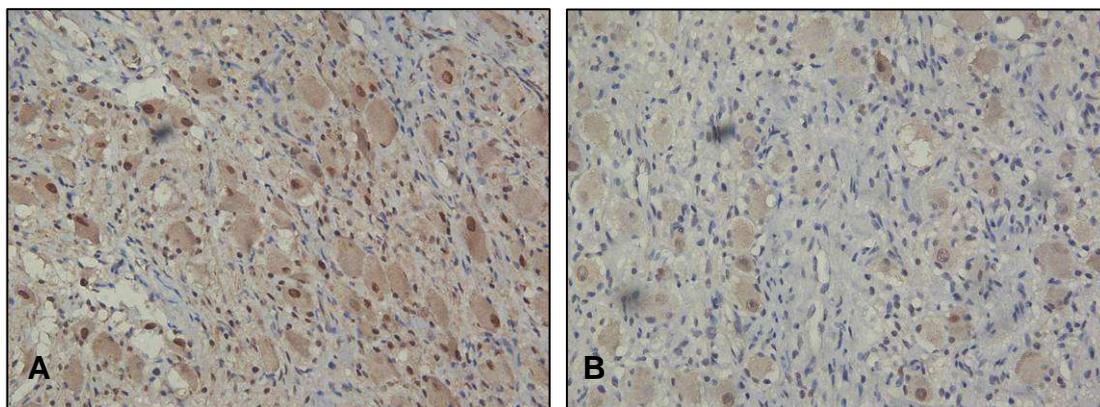


Figura 08 – Expressão do anticorpo contra a subunidade α_7 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático (em marrom). **A**: hiperidrose. **B**: controle.

Após a quantificação, observou-se expressão forte do anticorpo contra a subunidade α_7 em 4,85% (IQ_{25-75%}: 4,01 – 6,09%) da área total analisada nos portadores de HP e em 2,34% (IQ_{25-75%}: 1,96 – 2,77%) nos controles ($p < 0,001$), conforme ilustrado na figura 09 e gráfico 03.

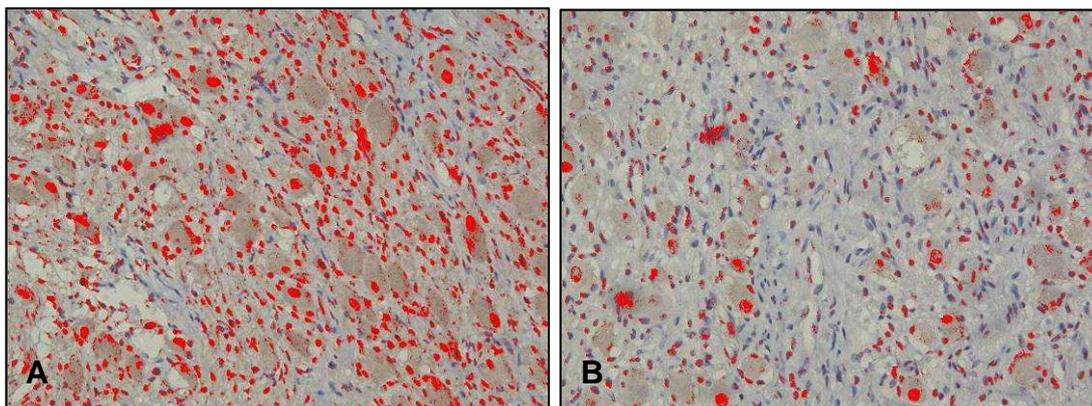
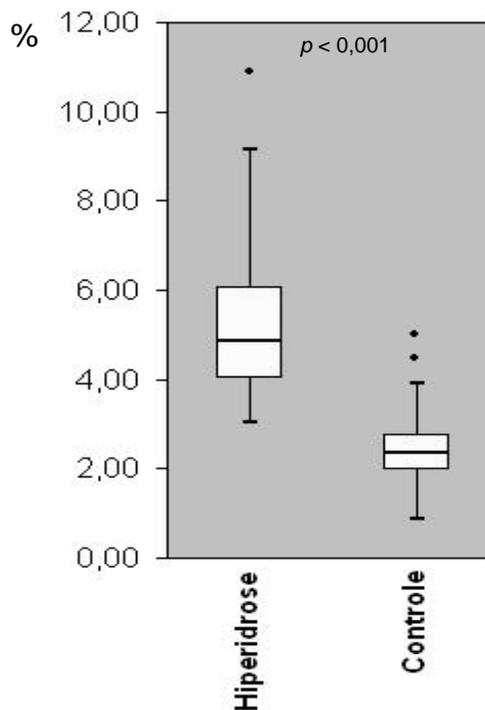


Figura 09 – Área de expressão forte do anticorpo contra a subunidade α_7 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático (em vermelho). **A:** hiperidrose. **B:** controle

Gráfico 03 – Quantificação da área de expressão forte do anticorpo contra a subunidade α_7 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático, por grupo



Expressão fraca por este anticorpo foi observada em 11,48% da área total (IQ_{25-75%}: 8,97 – 15,87%) nos portadores de HP contra 4,59% (IQ_{25-75%}: 2,74 – 6,19%) nos controles ($p < 0,001$), conforme figura 10 e gráfico 04.

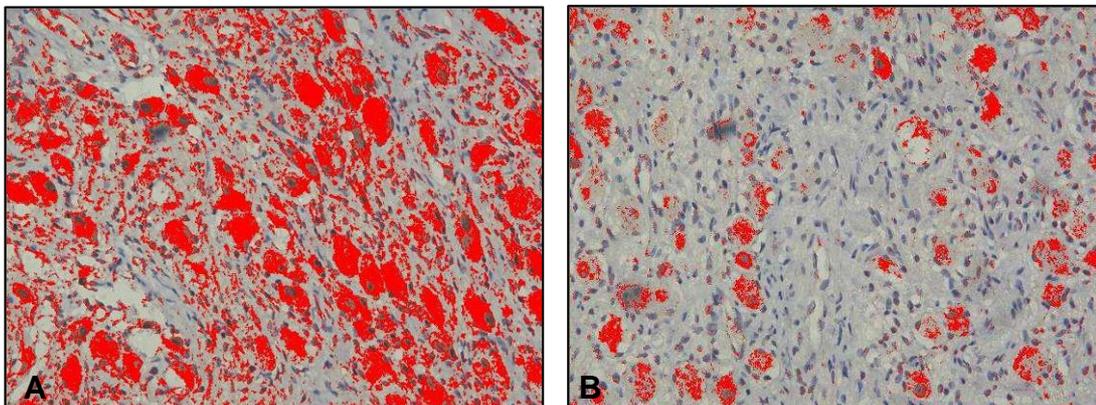
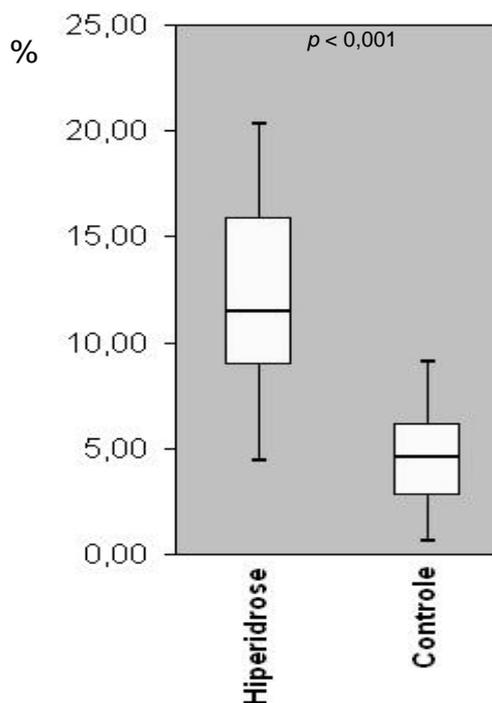


Figura 10 – Área de expressão fraca do anticorpo contra a subunidade α_7 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático (em vermelho). **A**: hiperidrose. **B**: controle

Gráfico 04 – Quantificação da área de expressão fraca do anticorpo contra a subunidade α_7 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina no gânglio simpático, por grupo



Também foi observada expressão intensa do anticorpo contra acetilcolina nos gânglios simpáticos do grupo I – Hiperidrose, em relação aos controles, como pode-se notar na figura 11.

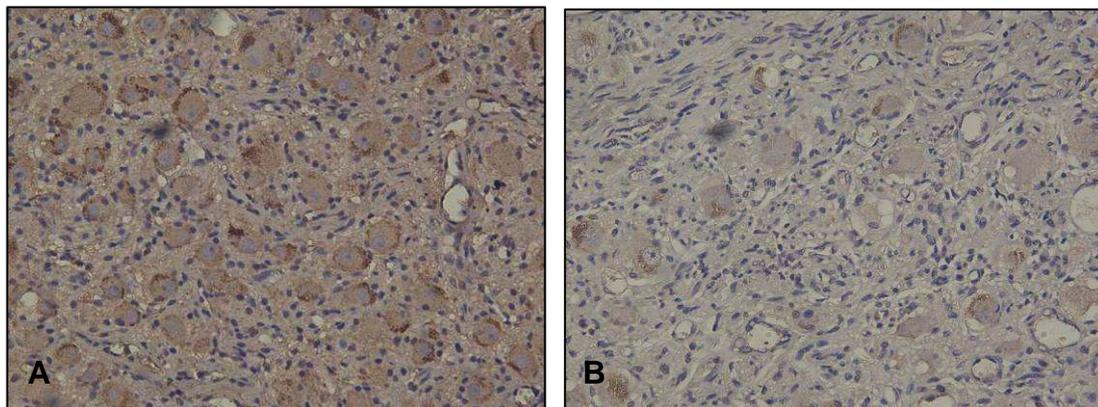


Figura 11 – Expressão do anticorpo contra acetilcolina no gânglio simpático (em marrom). **A:** hiperidrose. **B:** controle

Após a análise das imagens e quantificação da expressão do anticorpo contra acetilcolina, foi encontrada área de expressão forte maior nos gânglios de portadores de hiperidrose primária em relação aos controles, conforme ilustrado na figura 12:

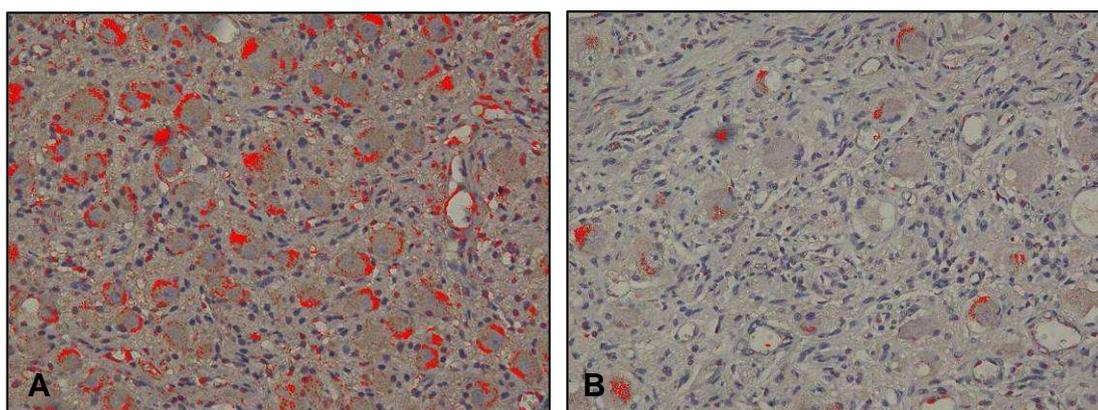
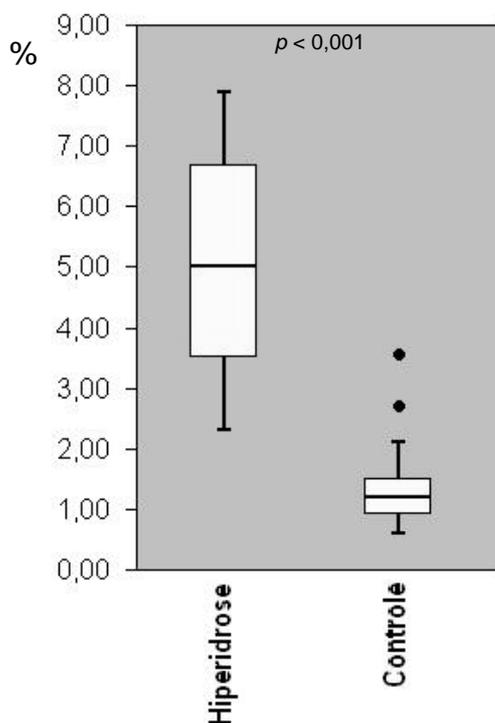


Figura 12 – Área de expressão forte do anticorpo contra acetilcolina no gânglio simpático (em vermelho). **A:** hiperidrose. **B:** controle

A mediana da área de expressão forte pelo anticorpo contra acetilcolina foi de 4,95% (IQ_{25-75%}: 3,5 – 6,67%) no grupo I – Hiperidrose e de 1,19%

(IQ_{25-75%}: 0,86 – 1,51%) no grupo II – Controle ($p < 0,001$). A distribuição entre os grupos encontra-se ilustrada no gráfico 05.

Gráfico 05 – Quantificação da área de expressão forte do anticorpo contra acetilcolina no gânglio simpático, por grupo



Expressão fraca pelo anticorpo contra acetilcolina também foi mais prevalente em gânglios de portadores de HP, conforme figura 13.

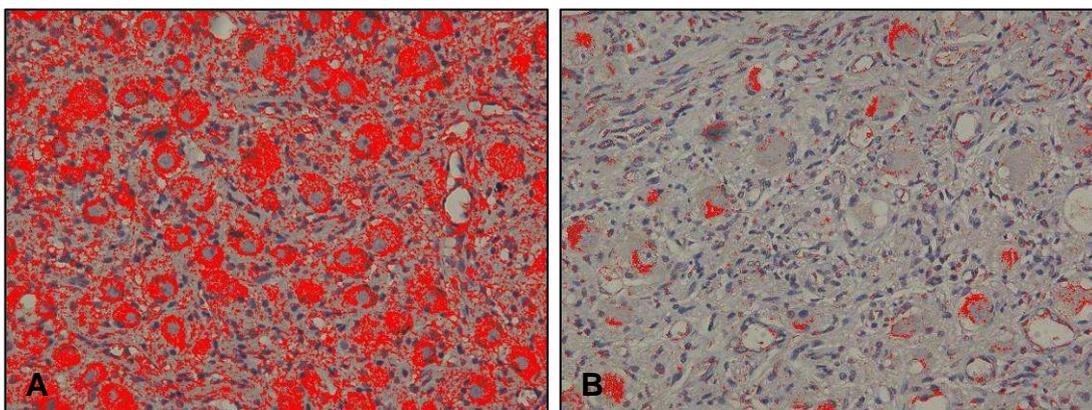
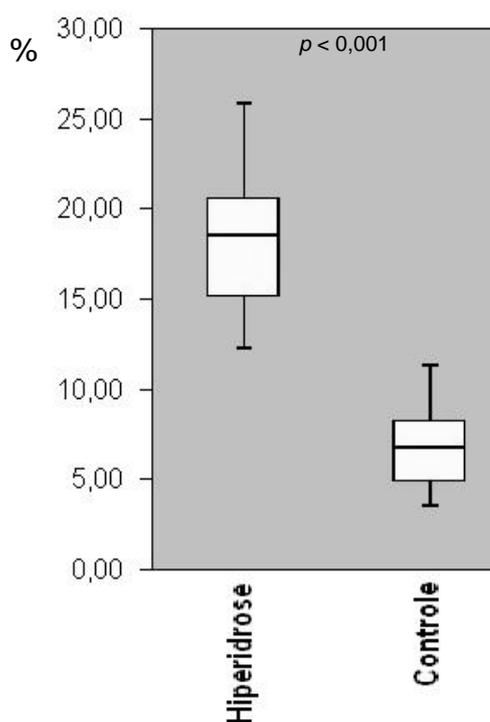


Figura 13 – Área de expressão fraca do anticorpo contra acetilcolina no gânglio simpático (em vermelho). **A:** hiperidrose. **B:** controle

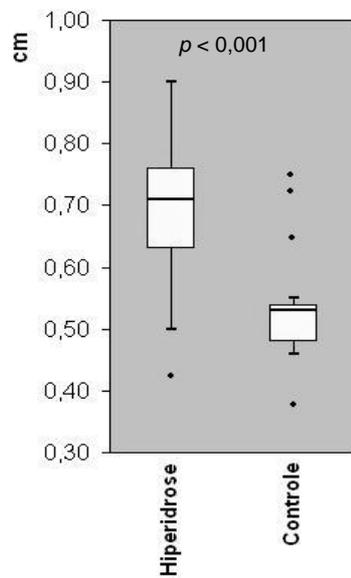
Expressão fraca foi encontrada em 18,55% (IQ_{25-75%}: 15,12 – 20,64%) da área total analisada dos gânglios de portadores de HP em comparação com 6,77% (IQ_{25-75%}: 4,84 – 8,25%) dos gânglios de controles ($p < 0,001$), conforme gráfico 06.

Gráfico 06 – Quantificação da área de expressão fraca do anticorpo contra acetilcolina no gânglio simpático, por grupo



O diâmetro dos gânglios simpáticos ressecados apresentou mediana de 0,71cm (IQ_{25-75%}: 0,63 – 0,76cm) no grupo I – Hiperidrose, em comparação ao grupo II – Controle, com mediana de 0,53cm de diâmetro (IQ_{25-75%}: 0,48 – 0,54cm), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), conforme gráfico 07.

Gráfico 07 – Distribuição dos diâmetros dos gânglios ressecados, por grupo



DISCUSSÃO

5 Discussão

O tratamento cirúrgico da hiperidrose primária através da simpatectomia torácica videotoracoscópica têm sido responsável por melhoria importante da qualidade de vida de um número crescente de pessoas em todo o mundo, a cada ano. Este procedimento já responde por parcela significativa da atividade de grande parte dos serviços de Cirurgia Torácica; no entanto, pouco se sabe sobre o órgão alvo desta operação: o gânglio simpático, sobretudo entre os portadores de hiperidrose primária, o subgrupo de indivíduos que será operado^{1,3,4,21,36,37,39,40}. O presente estudo é o primeiro a demonstrar expressão elevada de acetilcolina e da subunidade α_7 do seu receptor em gânglios simpáticos de portadores de HP, além do diâmetro aumentado destes gânglios, em relação a não portadores.

Uma dificuldade que se impõe a estudos que tenham como objetivo a análise de possíveis alterações ganglionares nesses indivíduos é a escolha de um grupo controle adequado, em um modelo de pesquisa exequível do ponto de vista ético. Nesse ínterim, fica impossibilitada a ressecção de um órgão normal (no caso, o gânglio simpático) de um indivíduo saudável. A alternativa natural seria a utilização de órgãos ressecados de cadáveres; no entanto, a degeneração celular e humoral iniciada a partir do momento do óbito tornaria impossível uma avaliação confiável, ainda mais se levarmos em consideração o difícil controle do tempo transcorrido entre o óbito e a

ressecção do gânglio para análise. Dentro desse contexto, os doadores de órgãos para transplante revelam-se como os melhores controles possíveis, desde que haja o devido consentimento da família para tal, uma vez que a perfusão tecidual é mantida até instantes antes da ressecção do órgão.

Apesar de não haver consenso na literatura, a maioria dos trabalhos de melhor padrão metodológico mostra que a ressecção do terceiro gânglio da cadeia simpática torácica é a que traz maior eficácia na resolução da hiperidrose primária palmar^{13,37,39-42}.

Além disso, a relação entre a cadeia simpática paravertebral e a terceira veia intercostal posterior, próximo à sua desembocadura na veia intercostal superior, é mais favorável à esquerda, uma vez que há divisão do território de drenagem venosa (terceira veia intercostal posterior esquerda drenando para veia intercostal superior esquerda com trajeto ascendente e quarta veia intercostal posterior esquerda drenando para veia hemιάzigos acessória, com trajeto descendente), enquanto à direita há confluência venosa (terceira veia intercostal posterior direita drenando para veia intercostal superior direita próximo à sua desembocadura na veia ázigos e quarta veia intercostal posterior direita drenando diretamente para veia ázigos, próximo ao seu arco para finalmente desembocar na veia cava superior), o que torna a ressecção do terceiro gânglio à esquerda tecnicamente mais fácil e com menor risco de complicação relacionada a sangramento ao participante do estudo. Isto posto, aliado ao fato de a hiperidrose primária apresentar-se de forma bilateral e simétrica, motivou a escolha do referido gânglio para fins de estudo^{43,44}.

A distribuição dos sítios de hiperidrose referidos pelos participantes do presente estudo foi semelhante ao descrito na literatura, mostrando associação da hiperidrose palmar com outros sítios, sobretudo plantar, na maioria dos portadores, sendo rara a hiperidrose palmar isolada^{1,21,40,45}.

Nossos resultados demonstraram a viabilidade da utilização de anticorpos primários contra epítomos específicos presentes nos gânglios da cadeia simpática torácica através de imuno-histoquímica, além da viabilidade da utilização de órgãos de doadores como controles em estudos deste tipo. O simples fato de ter havido coloração adequada das lâminas com a técnica empregada e a padronização da diluição dos anticorpos (utilizados com esta finalidade pela primeira vez), *per se*, já correspondem a um avanço significativo, uma vez que abre um leque muito grande de possibilidades de estudos futuros, tanto do sistema simpático propriamente dito, quanto de outras partes do sistema nervoso.

Uma preocupação foi a possibilidade de interferência do processo de morte encefálica na ultra-estrutura anatômica analisada. No presente estudo, a expressão da subunidade α_3 do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina, a subunidade predominante nos gânglios simpáticos de humanos, foi semelhante em ambos os grupos estudados, mostrando que a escolha dos controles e a técnica empregada na captação dos órgãos para estudo foi adequada e não interferiu de forma significativa com os resultados, garantindo a comparabilidade entre os grupos^{30-32,34,35}.

Outro possível viés seria uma potencial variabilidade excessiva da amostra do grupo controle, dada a heterogeneidade dos seus participantes,

que, mais uma vez, não foi observada; as medidas de dispersão da amostra mostraram-se inclusive menores no grupo controle, para todas as variáveis estudadas. Tal achado é corroborado com a experiência clínica, que mostra uma variação razoável da intensidade dos sintomas nos portadores de hiperidrose primária^{2,3,8-11}.

Apesar de não ser facilmente perceptível na prática operatória diária, foi encontrado diâmetro ganglionar significativamente maior em portadores de hiperidrose. Esta divergência justifica-se pelo tamanho reduzido do gânglio simpático, em que pequenas variações (menos de dois milímetros de diferença de mediana entre os grupos, em nosso estudo) são significativas em relação ao diâmetro do grupo controle, mas difíceis de serem percebidas a olho nu.

A expressão aumentada de acetilcolina nos gânglios de portadores de HP, encontrada na presente pesquisa, pode estar relacionada à presença de hiperativação da porção central do sistema nervoso simpático (neurônios pré-ganglionares localizados na coluna lateral da medula espinhal), liberando uma quantidade elevada do neurotransmissor nas fendas sinápticas existentes no gânglio, ou pode estar relacionada a uma maior produção de acetilcolina pelos corpos celulares dos neurônios pós-ganglionares (corpúsculos de Nissl) que, por fluxo anterógrado do pericário ao axônio, chegam às glândulas sudoríparas. No entanto, o fato de havermos encontrado aumento tanto da área de expressão forte (marcando, sobretudo, os corpúsculos de Nissl) quanto da área de expressão fraca

(marcação difusa, análoga à distribuição das fendas sinápticas) parece demonstrar uma combinação de ambos os eventos (vide Figura 10)²³.

Indivíduos portadores de HP apresentam hiperatividade do sistema simpático, demonstrada através da atividade simpática cutânea, ao mesmo tempo em que a variação do fluxo sanguíneo cutâneo subsequente à variação de temperatura ambiente mostrou-se semelhante à de indivíduos normais (com redução após simpatectomia) sugerindo que, apesar de fazerem parte do sistema termorregulador, recebem inervação de grupos distintos de fibras simpáticas^{5,12,14,33,46,47}.

As glândulas sudoríparas são inervadas de modo bastante *sui generis*: por fibras colinérgicas do sistema nervoso simpático, além de não possuírem inervação parassimpática, apesar de estarem relacionadas com núcleos hipotalâmicos considerados parassimpáticos^{6,7,23,24,26,27}; nossos resultados mostraram que o receptor de acetilcolina envolvido na transmissão sináptica ao nível ganglionar também não obedece à regra. A conformação habitual do receptor nicotínico neuronal da acetilcolina é formada por duas subunidades α e três β . A exceção: um receptor formado apenas por subunidades α_7 , sem nenhuma subunidade β em sua composição, exatamente a subunidade cuja expressão encontrou-se aumentada nos portadores de HP^{22,30}.

Desde a caracterização anatômica do sistema nervoso autônomo por Langley, acreditava-se que o gânglio simpático funcionava apenas como relé de um impulso gerado no sistema nervoso central, no seu trajeto até o órgão efetor; no entanto, a partir dos trabalhos de Eccles, percebeu-se que o

gânglio autonômico possui papel ativo na modulação e distribuição deste impulso, seja através da sinapse propriamente dita ou por potenciais excitatórios ou inibitórios pós-sinapse¹⁸⁻²⁰. Nossos resultados ratificaram a hipótese atualmente aceita, de que os gânglios simpáticos modulam os estímulos nervosos provenientes do SNC, apresentando concentrações elevadas tanto de acetilcolina quanto de uma linhagem específica de seus receptores, desempenhando função importante na fisiopatologia da HP. Ao mesmo tempo, reafirmam-se as teorias dos “pequenos cérebros” de Winslow e da “vida orgânica” de Bichat, ao passo em que foi demonstrada alteração anátomo-funcional ganglionar produzindo patologia autonômica localizada^{13,17,33}.

Como limitação do presente estudo, pode-se citar a idade mais elevada entre os controles em relação aos pacientes submetidos à simpatectomia torácica e uma maior predominância do sexo feminino neste grupo em relação ao primeiro. Isto pode ser explicado pelo fato de, apesar da hiperidrose primária acometer igualmente ambos os sexos em todas as idades, há uma procura maior pelo tratamento cirúrgico por mulheres jovens, justamente o grupo de pessoas cujo impacto negativo da hiperidrose é mais acentuado^{1,9,10,21,39,40}.

Já o perfil dos doadores de órgãos, utilizados como controles neste estudo, mostra igualdade na distribuição entre os sexos e maioria dos indivíduos na faixa dos 41 aos 60 anos de idade, dados estes corroborados na presente amostra⁴⁸. Contudo, devido à escassez de doadores de órgãos, aliada ao fato de não ser esperada variação da hiperidrose devido à idade e

ao gênero, considerou-se como o melhor grupo controle disponível^{9,10}; adicionalmente, em nossa amostra, não houve correlação entre idade, sexo e as variáveis estudadas, o que corrobora este fato.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

A partir dos resultados obtidos com o presente estudo, foi possível concluir que:

- Existe um aumento da expressão de acetilcolina e da subunidade α_7 do seu receptor nos gânglios simpáticos de portadores de HP.
- A subunidade α_3 do receptor nicotínico de acetilcolina tem expressão semelhante em portadores de HP e em não portadores.
- Gânglios da cadeia simpática torácica são maiores em portadores de hiperidrose primária.

Anexo A

QUESTIONÁRIO PARA O ESTUDO ANATOMO-FUNCIONAL DE GÂNGLIOS DA CADEIA SIMPÁTICA TORÁCICA NA HIPERIDROSE PRIMÁRIA

1. Seu familiar suava excessivamente (mesmo sem estar em locais quentes) principalmente nas mãos, pés, axilas e face?
 Sim Não
2. Seu familiar tinha alguma doença neurológica conhecida (paralisia cerebral, convulsões, mal de Parkinson, doença de Alzheimer, por exemplo)?
 Sim Não
3. Seu familiar tinha alguma doença endocrinológica ou metabólica conhecida (diabetes, hipotireoidismo, hipertireodismo, fibrose cística por exemplo)?
 Sim Não

Anexo B

Técnica de imuno-histoquímica

- Desparafinização:

- Foram montados conjuntos de lâminas silanizadas contendo os cortes de tecido em suporte adequado;
- Os conjuntos foram colocadas em xilol à quente, em estufa à 60 – 65°C, durante 10 minutos;
- Passados rapidamente em 3 banhos de xilol frio.

- Hidratação:

- As lâminas foram colocadas, sequencialmente, em 2 banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°;
- Lavadas sucessivamente em água corrente e com água deionizada.

- Digestão ou recuperação antigênica:

- A digestão ou recuperação dos antígenos foi feita por alta temperatura, colocando-se as lâminas em solução de citrato 10mM, pH 6,0 na panela de pressão (Pascal) por um minuto a 125°C .

- Bloqueio da peroxidase endógena:

- As lâminas foram colocadas em água oxigenada de 10 volumes (3%) e metanol volume a volume, durante 10 minutos; após, foram lavadas em água corrente e feito um banho em água destilada;

- Colocadas em água oxigenada de 10 volumes (3%) com azida sódica a 1%, durante 10 minutos, lavadas em água corrente e feito um banho em água destilada;

- Lavadas três vezes com solução tampão fosfato-salino (PBS), por 3min.

- Bloqueio de IGg inespecíficas:

- Em seguida, as lâminas foram colocadas em banho de caseína 2,5% por 5min, para bloqueio de reações inespecíficas.

- Incubação com os anticorpos:

- Os anticorpos primários, previamente titulados, foram diluídos em BSA (albumina sérica bovina):

- Acetilcolina: diluição 1:300

- Subunidade α_3 do receptor de acetilcolina: diluição 1:100

- Subunidade α_7 do receptor de acetilcolina: diluição 1:100

- As lâminas foram secas ao redor dos cortes e colocadas em câmara úmida;

- O anticorpo diluído foi pipetado sobre os cortes, utilizando-se uma micropipeta;

- As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* (18 horas), em geladeira;

- Lavadas três vezes com PBS, por 3 minutos.

- Incubadas em câmara úmida com polímero Novolink Max Polymer, (RE7280-K, *Novocastra Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle, UK*), deixadas 30min a 37°C cada etapa (pós-primário e polímero) e novamente lavadas três vezes com PBS, por 3 minutos;

- Foram colocadas em solução de cromógeno (70mg de DAB p/ 100mL de tris-HCl c/ 30µL de água oxigenada de 30 volumes);

- Após a revelação (5min), foram lavadas em água corrente por 10 minutos;

- Contra-coradas em hematoxilina de Harris, por um minuto e novamente lavadas em água corrente por 5 minutos.

- Montagem:

- As lâminas foram colocadas em suporte;

- Desidratadas em banho de álcool 70° por um minuto;

- Colocadas em banho de álcool 95° por um minuto;

- Colocadas em três banhos de álcool absoluto, sendo um minuto cada banho;

- Diafanizadas em três banhos de xilol por um minuto cada banho;

- Montadas com lamínula e resina sintética.

Anexo C

Quantificação da expressão dos anticorpos

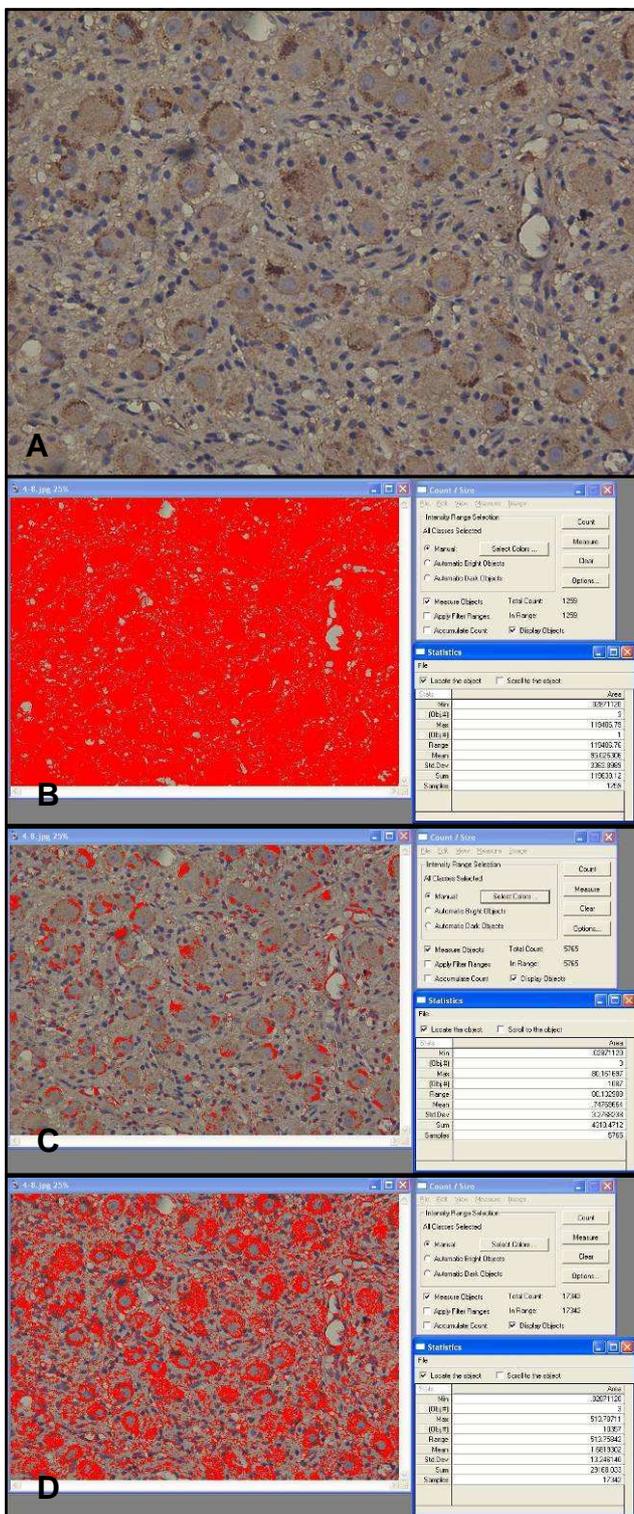


Figura 14 – Método de quantificação da expressão do anticorpo contra acetilcolina. **A:** microfotografia de um campo de grande aumento (400x) de gânglio simpático. **B:** aplicação da máscara de área total (em vermelho). **C:** aplicação da máscara de área de marcação forte (em vermelho). **D:** aplicação da máscara de área de marcação fraca (em vermelho).

Anexo D

Controle de artefatos

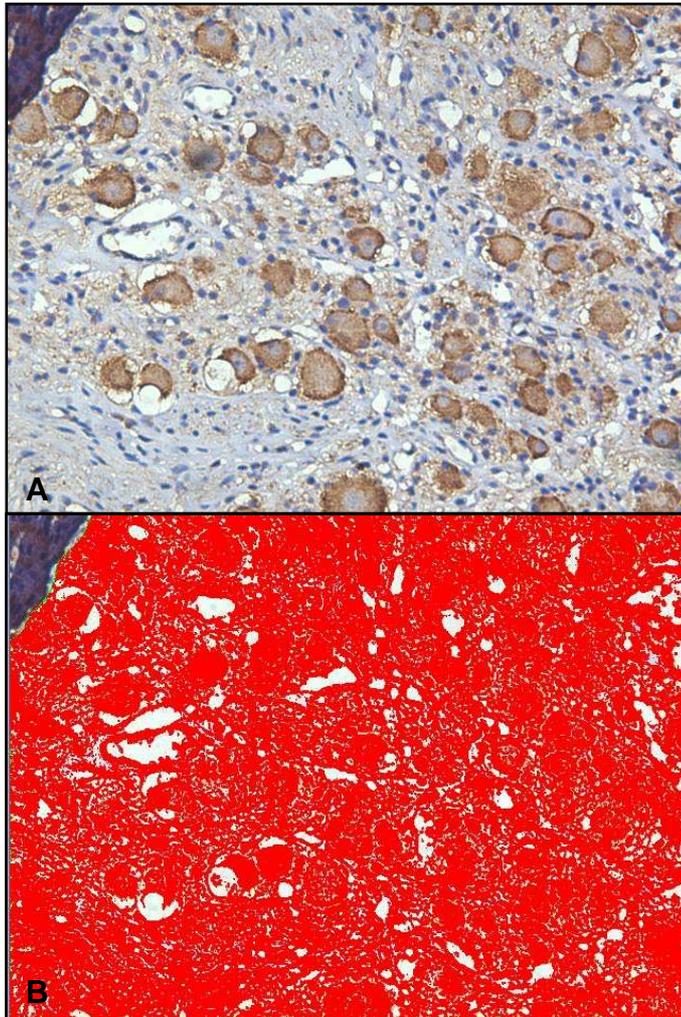


Figura 15 – Controle de artefatos na quantificação da expressão dos anticorpos. **A:** microfotografia de um campo de grande aumento (400x) de gânglio simpático apresentando artefato de preparação da lâmina no canto superior esquerdo. **B:** aplicação da máscara de área total (em vermelho), excluindo as áreas de artefato.

REFERÊNCIAS

8 Referências

1. De Campos JRM, Kauffman P, Werebe EC, Andrade Filho LO, Kusniek S, Wolosker N, Jatene FB. Quality of life, before and after thoracic sympathectomy – report on 378 operated patients. *Ann Thorac Surg.* 2003; 76:886 –91.
2. Hornberger J, Grimes K, Naumann M, Glaser DA, Lowe NJ, Naver H, Ahn S, Stolman LP, Multi-Specialty Working Group on the Recognition, Diagnosis, and Treatment of Primary Focal Hyperhidrosis. Recognition, diagnosis and treatment of primary focal hyperhidrosis. *J Am Acad Dermatol.* 2004; 51:274-86.
3. Eisenhach JH, Atkinson JLD, Fealey RD. Hyperhidrosis: evolving therapies for a well-established phenomenon. *Mayo Clin Proc.* 2005; 80(5):657-66.
4. Wörle B, Rapprich S, Heckmann M. Definition and treatment of primary hyperhidrosis. *JDDG.* 2007; 7:325-8.
5. Vetrugno R, Liguori R, Cortelli P, Montagna P. Sympathetic skin response: basical mechanisms and clinical applications. *Clin Auton Res.* 2003; 13:256-70.

6. Sato K, Kang WH, Saga K, Sato KT. Biology of sweat glands and their disorders I: normal sweat gland function. *J Am Acad Dermatol.* 1989; 20: 537-63.
7. Sato K, Kang WH, Saga K, Sato KT. Biology of sweat glands and their disorders II: disorders of sweat gland function. *J Am Acad Dermatol.* 1989; 20: 713-26.
8. Leung AKC, Chan PYH, Choi MCK. Hyperhidrosis. *Int J Dermatol.* 1999; 38:561-7.
9. Strutton DR, Kowalski JW, Glaser DA, Stang PE. US prevalence of hyperhidrosis and impact on individuals with axillary hyperhidrosis: results from a national survey. *J Am Acad Dermatol.* 2004; 51:241-8.
10. Lear W, Kessler E, Solish N, Glaser DA. An epidemiological study of hyperhidrosis. *Dermatol Surg.* 2007; 33:S69-75.
11. Wenzel FG, Horn TD. Nonneoplastic disorders of the eccrine glands. *J Am Acad Dermatol.* 1998; 38:1-17.

12. Manca D, Valls-Solé J, Callejas MA. Excitability recovery curve of the sympathetic skin response in healthy volunteers and patients with palmar hyperhidrosis. *Clin Neurophysiol.* 2000; 111: 1767-70.
13. Shih CJ, Wu JJ, Lin MT. Autonomic dysfunction in palmar hyperhidrosis. *J Auton Nerv Syst.* 1983; 8: 33-43.
14. Kazemi B, Yahyayi L, Salmanpour R, Hadianfard MJ, Shirzi ZR. Comparison of sympathetic skin response between palmar hyperhidrotic and normal subjects. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 2004; 44: 51-5.
15. Chen HJ, Cheng MH, Lin TK, Chee EC. Recordings of pre- and postoperative sympathetic skin response in patients with palmar hyperhidrosis. *Stereotatic Funct Neurosurg.* 1995; 64: 214-20.
16. Lefaucheur JP, Fitoussi M, Becquemin JP. Abolition of sympathetic skin responses following endoscopic thoracic sympathectomy. *Muscle Nerve.* 1996; 19: 581-6.
17. Ackerknecht EH. The history of the discovery of the vegetative (autonomic) nervous system. *Med Hist.* 1974; 18: 1-8.

18. Langley JN. On axon-reflexes in the pre-ganglionic fibres of the sympathetic system. *J Physiol.* 1900; 25: 364-98.
19. Eccles JC. The action potential of the superior cervical ganglion. *J Physiol.* 1935; 85: 179-206.
20. Eccles JC. Facilitation and inhibition in the superior cervical ganglion. *J Physiol.* 1935; 85: 207-38.
21. De Campos JRM, Kaufmann P. Simpatectomia torácica: indicações e cuidados. In: Sociedade Brasileira de Cirurgia Torácica. *Tópicos de atualização em cirurgia torácica* [citado 10 set 2011]. Disponível em http://www.sbct.org.br/pdf/livro_virtual/simpatectomia_toracica.pdf.
22. Kirstein SL, Insel PA. Autonomic nervous system pharmacogenomics: a progress report. *Pharmacol Rev.* 2004; 56: 31-52.
23. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido nervoso. In: *Histologia básica.* 9ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. 129-58.
24. Machado ABM. Sistema nervoso autônomo: aspectos gerais. In: *Neuroanatomia funcional.* 2ª Ed. São Paulo: Atheneu; 1998. 129-38.

25. Fletcher TF. *Neurohistology atlas* [citado 18 nov 2011]. Disponível em: <http://vanat.cvm.umn.edu/neurHistAtls/pages/neuron7.html>.
26. Katzung BG. Introdução à farmacologia autonômica. In: *Farmacologia básica e clínica*. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. 57-70.
27. Guyton AC, Hall JE. O sistema nervoso autonômico; a medula supra-renal. In: *Tratado de fisiologia médica*. 9ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. 693-703.
28. Netter FH. *Atlas de anatomia humana*. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
29. Machado ABM. Sistema nervoso autônomo: anatomia do simpático, parassimpático e dos plexos viscerais. In: *Neuroanatomia funcional*. 2ª Ed. São Paulo: Atheneu; 1998. 139-50.
30. Sargent PB. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci*. 1993; 16: 403-43.
31. Xu W, Gelber S, Orr-Urtreger A, Armstrong D, Lewis RA, Ou CN, Patrick J, Role L, De Biasi M, Beaudet AL. Megacystis, mydriasis,

- and ion channel defect in mice lacking the $\alpha 3$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Neurobiology*. 1999; 96:5746-51.
32. Skok VI. Nicotinic acetylcholine receptors in autonomic ganglia. *Auton Neurosci*. 2002; 97:1-11.
33. De Biasi M. Nicotinic mechanisms in the autonomic control of organ systems. *J Neurobiol*. 2002; 53:568-79.
34. Mandelzys A, Pié B, Deneris ES, Cooper E. The developmental increase in ACh current densities on rat sympathetic neurons correlates with changes in nicotinic ACh receptor α -subunit gene expression and occurs independent of innervation. *J Neurosci*. 1994; 14: 2357-64.
35. Srivatsan M, Treece J, Shotts EE. Nicotine alters nicotinic receptor subunit levels differently in developing mammalian sympathetic neurons. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1074: 505-13.
36. De Campos JRM, Kauffman P. Video-assisted thoracic sympathectomy in the treatment of primary hyperhidrosis. *J Bras Pneumol* 2007; 33: xv-xvii.

37. Krasna MJ. Thoracoscopic sympathectomy: a standardized approach to therapy for hyperhidrosis. *Ann Thorac Surg* 2008; 85: S764-7.
38. Yeh JJ, Ferreira M, Ebert S, Yasuda RP, Kellar KJ, Wolfe BB. Axotomy and nerve growth factor regulate levels of neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$ subunit protein in the rat superior cervical ganglion. *J Neurochem*. 2001; 79:258-65.
39. Ishy A. *Tratamento da hiperidrose palmo-plantar pela simpatectomia videotoracoscópica: terceiro versus quarto gânglio torácico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.
40. Yazbek G, Wolosker N, de Campos JRM, Kaufmann P, Ishy A, Puech-Leão P. Palmar hyperhidrosis – which is the best level of denervation using video-assisted thoracoscopic sympathectomy: T2 or T3 ganglion? *J Vasc Surg*. 2005; 42: 281-5.
41. Reisfeld R. Sympathectomy for hyperhidrosis: should we place the clamps at T2-T3 or T3-T4? *Clin Auton Res*. 2006; 16: 384-9.
42. Wolosker N, Yazbek G, Ishy A, de Campos JRM, Kauffman P, Puech-Leão P. Is sympathectomy at T4 level better than at T3 level

- for treating palmar hyperhidrosis? *J Laparoendosc Adv Surg Tech.* 2008; 18: 102-6.
43. Arnold WS, Daniel TM. Thoracoscopic sympathectomy. In: Shields TW, LoCicero J, Ponn RB, Rusch VW. *General Thoracic Surgery.* 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. 698-702.
44. Dângelo JG, Fattini CA. Tórax. In: *Anatomia humana sistêmica e segmentar.* 2^a Ed. Belo Horizonte: Atheneu; 1997.493-543.
45. Gee S, Yanauchi PS. Nonsurgical management of hyperhidrosis. *Thorac Surg Clin.* 2008; 18: 141-55;
46. Bornmyr S, Svensson H, Söderström T, Sundkvist G, Wollmer P. Finger skin blood flow in response to indirect cooling in normal subjects and in patients before and after sympathectomy. *Clin Physiol.* 1998; 18: 103-7.
47. Bini G, Hagbarth KE, Hynninen P, Wallin BG. Regional similarities and differences in thermoregulatory vaso- and sudomotor tone. *J Physiol.* 1980; 306: 553-65.

48. Moraes EL, Silva LBB, Moraes TC, Paixão NCS, Izumi NMS, Guarino AJ. O perfil de potenciais doadores de órgãos e tecidos. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2009; 17: 716-20.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Ofício de aprovação do projeto pela CAPPesq

cc. JDC 3141/08/057



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19/11/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0585/08**, intitulado: "**ESTUDO ANATOMO-FUNCIONAL DE GÂNGLIOS DA CADEIA SIMPÁTICA TORÁCICA NA HIPERIDROSE PRIMÁRIA** " apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **José Ribas Milanez de Campos**

Pesquisador (a) Executante: **Nabor Bezerra de Moura Júnior**

CAPPesq, 19 de Novembro de 2008

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

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO

24/11/08

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Apêndice 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

ESTUDO ANATOMO-FUNCIONAL DE GÂNGLIOS DA CADEIA SIMPÁTICA TORÁCICA NA HIPERIDROSE PRIMÁRIA

2. PESQUISADOR :

NABOR BEZERRA DE MOURA JÚNIOR

CARGO/FUNÇÃO: PÓS-GRADUANDO INSCRIÇÃO CRM-SP Nº 114903

UNIDADE DO HCFMUSP: DISCIPLINA DE CIRURGIA TORÁCICA

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

