

DIOGO MARILIO MARTINS

**UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES NA
REGENERAÇÃO DE LESÃO AGUDA DO VII PAR
CRANIANO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul, como parte dos
requisitos necessários para obtenção de título
de Mestre em Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva

Co-orientador: Dr. Marcos Ricardo de Oliveira Jaeger

**Porto Alegre
2009**

M386u Martins, Diogo Marilio.

Utilização de células mononucleares na regeneração de lesão aguda do VII par craniano: estudo experimental em ratos / Diogo Marilio Martins ; orient. Jefferson Braga da Silva, co-orient. Marcos Ricardo de Oliveira Jaeger. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

105 f.: gráf. il. tab.

Dissertação(Mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

1. Paralisia Facial. 2. Nervo Facial. 3. Regeneração Nervosa. 4. Células Mononucleares. 5. Epidemiologia Experimental. 6. Recuperação de Função Fisiológica. 7. Ratos Wistar. I. Silva, Jefferson Braga da. II. Jaeger, Marcos Ricardo de Oliveira. III. Título.

CDD

617.52

NLM WL 330

MESTRANDO: DIOGO MARILIO MARTINS

ENDEREÇO: Av. Ganzo, 664/201 Porto Alegre/RS

CEP: 90150-070

E-MAIL: diogommartins@tca.com.br

TELEFONE: (51) 91554069

ÓRGÃO FINANCIADOR: CAPES

CONFLITO DE INTERESSE: NENHUM

Dedico esta dissertação ao amor da minha vida, Edna, pela confiança, companheirismo e incentivo. Aos meus queridos pais, pelo exemplo de vida e caráter e a minha irmã, pela dedicação e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha noiva Edna e a minha irmã Manoela, por terem dispensado várias horas no Laboratório para a difícil e dolorosa coleta de dados.

Ao Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva, pela orientação e oportunidade.

Ao Dr. Marcos Ricardo de Oliveira Jaeger, pela co-orientação, incentivo e ordenação desta dissertação.

Ao Sr. Gilmar, do Laboratório, pela agilidade, disponibilidade e dicas durante o desenvolvimento dos procedimentos.

Aos acadêmicos de medicina, Vitor, Betina, Paula e Willian, pela ajuda nos procedimentos e coleta de dados.

Aos amigos do Instituto de Pesquisas Biomédicas, Jeremiah, Roger e Cristiano, pela ajuda na técnica de obtenção e preparação das células.

Ao Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva e ao Tiago, pela disponibilização dos equipamentos, confecção de lâminas e leitura dos resultados histológicos.

Ao Prof. Dr. Mário Wagner, pelos ensinamentos e auxílio na análise estatística.

Ao Dr. Gustavo Schaefer, pela disposição em ajudar.

Aos professores e colegas do programa de pós-graduação, pelo estímulo ao aprendizado.

Aos meus familiares, agradeço pelo apoio, incentivo e por sempre confiarem em mim.

A Capes, pelo financiamento da minha bolsa de pós-graduação.

RESUMO

Introdução: A paralisia facial periférica traz impacto significativo na vida dos pacientes. As causas traumáticas ficam atrás somente da Paralisia de Bell e têm prognóstico variável. Anastomoses término-terminais são viáveis em poucos casos. As células mononucleares têm mostrado bons resultados na regeneração de nervos periféricos, porém não existem estudos com o sétimo par craniano.

Objetivos: Estudar a recuperação funcional do nervo facial após lesão aguda com reparação imediata utilizando células mononucleares em um modelo experimental.

Material e Método: Estudo experimental, controlado, cegado e randomizado. Foram incluídos dezesseis ratos Wistar divididos em dois grupos. Foi realizada ressecção de quatro milímetros do tronco do nervo facial e, então, interposto um tubo de silicone, preenchido com células mononucleares no grupo 1 e com veículo gelificado no grupo 2. Os animais foram avaliados por teste funcional: análise do movimento das vibrissas, do fechamento da rima ocular e somatório vibrissas-olhos durante 64 dias. Também foi realizado exame macroscópico e histológico no final do estudo. A comparação dos grupos foi realizada por meio das medianas, avaliadas pelo teste *U de Mann-Whitney*. O nível de significância adotado foi 5%.

Resultados: O DELTA (valor final – valor inicial) para o somatório vibrissas-olhos foi -0,50 para o grupo 1 e -1,50 para o grupo 2, mostrando uma recuperação funcional satisfatória em ambos os grupos, com uma melhora precoce no fechamento da rima ocular no grupo das células mononucleares evidenciada pelas medianas entre a segunda e terceira semanas. A área sob a curva, que evidencia o efeito global dos tratamentos, não resultou em diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Conclusões: Os dois grupos, células mononucleares e controle, obtiveram recuperação da mímica facial no teste funcional após a lesão aguda do VII par craniano no período de 64 dias, sendo que o grupo que utilizou as células mononucleares apresentou recuperação mais precoce no critério fechamento da rima ocular.

Palavras-chave: Paralisia Facial. Nervo Facial. Regeneração Nervosa. Células Mononucleares. Epidemiologia Experimental. Recuperação de Função Fisiológica. Ratos Wistar.

ABSTRACT

Introduction: Peripheral facial paralysis has significant impact on patient's life. Only Bell's palsy is more common of the traumatic causes, whose prognosis is variable. End-to-end anastomosis is viable in very few cases. Mononuclear cells have shown good results in the peripheral nerves regeneration, although there are no studies of the seventh cranial nerve.

Objectives: To study the functional recovery of facial nerve after acute injury with immediate repair using mononuclear cells in an experimental model.

Material and Methods: Experimental, controlled, randomized and blind study. Sixteen Wistar rats were divided into two groups. It was performed a four millimeters resection of the facial nerve trunk and then interposed a silicone tube, filled with mononuclear cells in group 1 and vehicle in group 2. The animals were evaluated by functional test: observation of vibrissae movement, eye closure and vibrissae-eyes sum for 64 days. It was also performed macroscopic and histological examining at the end of the study. The groups were compared through the median, measured by the *Mann-Whitney U-test*. The significance level was 5%.

Results: The DELTA (final value - initial value) for the vibrissae-eye sum was -0.50 for group 1 and -1.50 for group 2, showing a satisfactory functional recovery in both groups. The eye closure was an early improvement in mononuclear cells group, evidenced by the median between the second and third weeks. The area under the curve, which evidences the overall effect of the treatment, did not result in any statistically significant difference between the groups.

Conclusions: The two groups, mononuclear cells and control, had recovery of facial movements in functional test after acute injury of the VII cranial nerve in the period of 64 days, and the mononuclear cells group had an early improvement in the eye closure test.

Keywords: Facial Palsy. Facial Nerve. Nerve Regeneration. Mononuclear Cells. Experimental Epidemiology. Physiologic Function Recovery. Wistar Rats.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ossos longos removidos para obtenção do conteúdo da medula-óssea	28
Figura 2	Remoção das epífises de um dos fêmures	28
Figura 3	Extração do conteúdo da medula-óssea	29
Figura 4	Fração mononuclear sobre a interface de Histopaque®	30
Figura 5	Homogeneização das células mononucleares com o veículo	31
Figura 6	Seringa de um mililitro com preparado de células mononucleares	31
Figura 7	Posição operatória – Decúbito lateral	33
Figura 8	Dissecção por planos com visualização dos ramos do nervo facial	33
Figura 9	Tronco do nervo facial com seus ramos zigomático, bucal e mandibular	34
Figura 10	Tronco do nervo facial seccionado próximo ao forâmen estilo-mastoideo	34
Figura 11	Quatro milímetros do nervo facial retraído após secção	35
Figura 12	Tubo de silicone de seis milímetros de comprimento ao lado do defeito criado pela ressecção do tronco do nervo facial	36
Figura 13	Sutura do tubo de silicone ao epineuro do coto proximal do tronco do nervo facial	36
Figura 14	Interposição do tubo de silicone com ponto proximal e distal	37
Figura 15	Preenchimento do tubo de silicone com preparado de células mononucleares	37
Figura 16	Sutura da pele com mononylon 4-0	38

Figura 17	Resultado da paralisia do nervo facial direito do rato – posicionamento posterior das vibrissas e fechamento ocular prejudicado	39
Quadro 1	Escala de pontuação para movimento das vibrissas	40
Quadro 2	Escala de pontuação para fechamento da rima ocular	40
Tabela 1	Valores das medianas por dias, DELTA e AUC dos escores de movimentação das vibrissas, fechamento da rima ocular e somatório vibrissas-olhos	44
Gráfico 1	Medianas do escore movimento das vibrissas em relação ao tempo de observação	45
Gráfico 2	Medianas do escore fechamento da rima ocular em relação ao tempo de observação	46
Gráfico 3	Medianas do escore somatório vibrissas-olhos em relação ao tempo de observação	47
Figura 18	Nervo normal coloração hematoxilina-eosina com 50 aumentos	48
Figura 19	Nervo regenerado após 64 dias, coloração hematoxilina-eosina com 100 aumentos	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AUC	Area under the curve
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMN	Células mononucleares
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
HE	Hematoxilina-eosina
HPMC	Hidroxi-propil-metil celulose
PACAP	Peptídeo de ativação de adenilato ciclase pituitários
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

	RESUMO	vi
	ABSTRACT	vii
	LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
	LISTA DE ABREVIATURAS	x
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES NEURAIS	15
2.2	RECUPERAÇÃO NEURAL	16
2.3	ANATOMIA EXTRATEMPORAL DO NERVO FACIAL DO RATO	17
2.4	MÍMICA FACIAL DO RATO	18
2.4.1	Regeneração Nervosa	19
2.4.2	Recuperação Funcional	20
2.5	CÉLULAS-TRONCO	20
2.5.1	Células-tronco da Medula Óssea	21
2.6	MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA FACIAL PERIFÉRICA	21
2.7	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVO	24
3.1	OBJETIVO GERAL	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	MATERIAL E MÉTODO	25
4.1	DELINEAMENTO	25
4.2	AMOSTRA	26
4.3	MÉTODOS	27
4.3.1	Análise Prévia	27

4.3.2	Obtenção e Preparo celular	27
4.3.3	Anestesia	32
4.3.4	Procedimento Operatório	32
4.3.5	Pós-operatório	38
4.3.6	Análise após o procedimento	38
4.3.7	Teste Funcional	39
4.3.8	Eutanásia	41
4.3.9	Análise Histológica	41
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4.4.1	Tamanho de Amostra	41
4.4.2	Variáveis	42
5.4.3	Análise Estatística	42
4.5	ASPECTOS BIOÉTICOS	42
5	RESULTADOS	43
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE A – Teste funcional de cada rato	58
	APÊNDICE B – Artigo Original	74
	ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	91
	ANEXO B – Critérios e normas da Revista Brasileira de Otorrinolaringologia	92

1 INTRODUÇÃO

O sétimo par craniano é um nervo misto, preponderantemente motor. É o grande responsável pela motricidade da hemiface homolateral e de alguns músculos cervicais, está envolvido na eferência do reflexo do músculo estapédio, na sensibilidade de parte da orelha externa, na capacidade gustativa, pois inerva os dois terços anteriores da língua e no controle autonômico de glândulas exócrinas, como salivares e lacrimais.¹⁻³

A Paralisia Facial Periférica é uma entidade comum nos consultórios médicos e emergências hospitalares. Devido a sua clínica evidente, os pacientes podem procurar diretamente por atendimento especializado, devendo sua etiologia ser prontamente identificada para o tratamento adequado. As manifestações clínicas mais comuns são: a alteração da simetria facial, o fechamento ocular incompleto – podendo causar úlceras de córnea ou perda da acuidade visual – e a dificuldade de mastigação. Definir o diagnóstico etiológico é de fundamental importância, tanto para o tratamento da doença como para o prognóstico.⁴⁻⁵ As seqüelas podem ser dramáticas e, muitas vezes, causar deficiências funcionais permanentes.⁶ O impacto de uma lesão do nervo facial na vida do paciente está relacionado aos prejuízos cosméticos, funcionais e psicológicos envolvidos.^{2-3,7}

O diagnóstico diferencial inclui doenças inflamatórias, como Paralisia de Bell e Herpes Zoster Ótico (Síndrome de Ramsay-Hunt), otite média crônica e aguda, neoplasias e injúrias traumáticas, como fraturas do osso temporal, traumas penetrantes e iatrogênicos.⁷ A causa mais comum é a Paralisia de Bell, correspondendo a cerca de 80% das paralisias faciais periféricas, seguida pelas causas traumáticas, dentre elas as acidentais, traumas penetrantes, agressão física, cirurgias para extirpação de tumores e lesões iatrogênicas, podendo lesar o nervo facial de diversas maneiras.⁴⁻⁵ As fraturas do osso temporal correspondem a 17% das paralisias faciais periféricas.⁷ Os traumas na região occipital ou frontal geralmente determinam fraturas transversais no rochedo do osso temporal, com acometimento do nervo facial, principalmente no segmento labiríntico, sendo que nesses casos, mais de 50% apresentam lesão nervosa de evolução desfavorável.⁴⁻⁵

Apesar das regenerações espontâneas e dos consideráveis avanços nas técnicas microcirúrgicas, a recuperação funcional do nervo facial permanece insatisfatória e a síndrome pós-paralítica ainda é inevitável em grande parte dos casos, envolvendo paresias, sincinesias e disreflexias com consideráveis seqüelas para os pacientes.⁸

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES NEURAIS

Na avaliação de pacientes afetados pela paralisia facial periférica é necessário estabelecer parâmetros para o grau de comprometimento da atividade motora. A classificação é fundamental para o tratamento e acompanhamento clínico de lesões do nervo facial, bem como para documentação científica destinada a comparar resultados funcionais e histológicos.⁹ Paralisia é definida como uma perda completa dos movimentos musculares, enquanto paresia é uma paralisia incompleta.⁷ A busca por um método internacionalmente aceitável de classificar o nível de déficit motor do nervo facial resultou em um grande número de sistemas de avaliação desenvolvidos por vários autores.^{7,10-13}

A classificação de Sunderland de 1977 é um sistema neuro-histopatológico e clínico que descreve cinco fases da lesão neural e correlaciona com a repercussão clínica. A lesão de primeiro grau (neuropraxia) refere-se a um nervo anatomicamente intacto que apresenta um bloqueio temporário na condução nervosa causada por obstrução no influxo axoplásmico: normalmente corresponde a uma lesão por compressão e anóxia. O prognóstico da neuropraxia é recuperação completa usualmente entre alguns dias e três semanas. A lesão de segundo grau (axonotmese) reflete uma interrupção na continuidade do axônio, mas a integridade neural é mantida. As lesões de terceiro, quarto e quinto graus (neurotmese), são caracterizadas pelo dano causado ao endoneuro, perineuro e epineuro (transecção total) respectivamente. Com a progressão do grau, o risco de disfunção clínica e síndrome pós-paralítica aumentam.⁷

No início da década de 80, a classificação estabelecida por House¹⁴, e modificada por House-Brackmann¹³ em 1985, tem sido amplamente utilizada, tornando-se referência na prática clínica. Esta classificação é composta por seis graus: I (normal) e II (disfunção leve) são considerados de bom prognóstico; III (moderada) e IV (moderadamente-severa) têm

prognóstico reservado; V (severa) e VI (paralisia total) correspondem a um pior prognóstico.^{7,9}

2.2 RECUPERAÇÃO NEURAL

Lesões por compressão ou esmagamento do nervo evoluem quase sempre com recuperação total do influxo nervoso; enquanto a secção do nervo, com ou sem a criação de defeito de descontinuidade, resulta em prognósticos variáveis. A natureza da lesão e o tempo de evolução da paralisia facial são fatores importantes na regeneração nervosa e recuperação funcional.¹⁵ O sucesso no tratamento da paralisia facial periférica é baseado em um bom entendimento da anatomia e fisiologia do nervo facial e suas aplicações clínicas.

O interesse pela recuperação dos nervos periféricos ocupa grande parcela dos estudos atualmente. Em 1850 descobriu-se o conjunto de fenômenos que ocorre no axônio distal a uma lesão nervosa, conhecido como degeneração walleriana.¹⁶⁻¹⁷ Posteriormente observou-se que este processo se completa em torno de 14 dias e o brotamento de fibras do coto proximal, com o início da invasão do coto distal, em torno do 10º dia.^{3,18}

As tentativas de reparação de lesões do nervo facial iniciaram no século XVII,¹⁹ mas somente em 1927 é relatado um caso de sucesso.²⁰ Há consenso de que reconstruções imediatas de lesões transfixantes do nervo facial por anastomose término-terminal produzem os resultados mais satisfatórios.²¹⁻²³ Isto é especialmente verdadeiro nas lesões de ramos distais do nervo,³ porém a anastomose término-terminal é possível em 6% das lesões transfixantes do tronco principal do nervo facial e 12% das lesões em ramos secundários.¹⁵

A abordagem tradicional para reparo das secções e defeitos do nervo facial é a sutura ou interposição de enxertos. Manejo cuidadoso, com o mínimo trauma e menor tensão possível, é fundamental para o sucesso da sutura. Sendo assim, quando isso não for possível, a interposição de um enxerto é preferível.^{6,33}

Os enxertos autólogos de nervos são usados para reparar lesões neurais com perdas de substâncias, porém o tamanho do defeito a ser corrigido é restrito.¹⁶ Em 1982, Chiu et al iniciaram estudos sobre a tubulização com veias, demonstrando que, em ratos, a luz da veia tem a capacidade de regenerar nervos periféricos.¹⁶⁻¹⁷ Desde então, vários condutores da

regeneração têm sido usados, incluindo artérias, ossos, músculo, fascia, silicone, colágeno e ácido poliglicólico.²⁵⁻³⁰

O reparo de nervos usando tubos de materiais não biológicos, como o silicone, tem sido usado para grandes defeitos que não podem ser tratados por enxerto de nervo. Todavia o comprimento de perdas de nervos que pode ser tratado por tubos sem a utilização de um fator neurotrófico também é limitado. Assim, estudos analisando o efeito de fatores de crescimento exógenos, fatores neurotróficos e proteínas de matriz extracelular, quando adicionados ao material de tubulização vêm mostrando resultados promissores;^{33,26,28-29,31} entretanto, o fator neurotrófico ideal ainda não foi descoberto.

Em modelos de regeneração do nervo ciático em ratos, defeitos de dez milímetros ou menores são geralmente considerados para tubulização com materiais não biológicos como o silicone, porém em defeitos de aproximadamente quinze milímetros existe a tendência ao uso de fatores neurotróficos, como as culturas neurais de células-tronco.¹⁶ No entanto, em relação ao nervo facial, não se encontram estudos que definam a extensão da lesão crítica e alguns autores demonstraram que este nervo não responde à reparação de modo semelhante aos nervos periféricos.³²⁻³³ Sendo assim não podemos simplesmente adotar resultados de pesquisas em nervos periféricos para lesões do VII par craniano.

Dessa forma, pela compreensão de que alguns tecidos poderiam servir de base para a diferenciação de outros tecidos, abriu-se espaço para novas abordagens terapêuticas que começam a ser testadas, relacionando o uso de células-tronco à reparação de lesões de nervos periféricos e pares cranianos, mesmo que em fase experimental.¹⁶⁻¹⁷

2.3 ANATOMIA EXTRATEMPORAL DO NERVO FACIAL DO RATO

O nervo facial emerge do tronco encefálico pelo bordo ventrolateral da medula, revelando um leve abaulamento, o gânglio geniculado, quando ele cruza a raiz do nervo trigêmio e penetra no canal do facial, dentro do qual tem um trajeto curto, emergindo pelo forâmen estilo-mastoideo. Após inicia sua ramificação extratemporal, que se divide em ramos do pescoço e ramos da glândula parótida.³⁴

Os ramos do pescoço são: o auricular posterior, que se orienta posterior e superiormente entre a orelha externa e o processo mastóideo; o digástrico sai juntamente com

o estilohioideo, abaixo do auricular posterior e inerva a porção posterior do músculo digástrico; e o estilohioideo, por sua vez, vai em direção ao músculo estilohioideo.³⁴

Os ramos da glândula parótida são divididos em temporofaciais e cervicofaciais. Os temporaofaciais: os ramos superficiais do temporal passam anteriormente ao arco zigomático para suprir a região anterior da orelha, a glândula lacrimal, o músculo frontalis e a parte superior do *orbicularis oculi*. Um ramo profundo, o zigomático menor, que no homem é uma porção do bucal, no rato origina-se do temporal, inervando os músculos do nariz, o bucinador e o *orbicularis oculi*. O ramo zigomático é pequeno e estende-se para frente e para cima para inervar a porção superior do *orbicularis oculi*. Os ramos cervicofaciais são: o bucal, que cruza o masseter e inerva os músculos superficiais da face, do nariz e lábio superior; o marginal mandibular, que se orienta para frente acompanhado pelo ducto parotídeo e inerva o lábio inferior; e o cervical vai para o platisma através da glândula parótida.³⁴

2.4 MÍMICA FACIAL NO RATO

Tendo em vista que a inervação da musculatura facial é semelhante em humanos e roedores, ratos e coelhos são freqüentemente utilizados como modelos para estudar a função do nervo facial e sua regeneração. Além disso, a musculatura ocular e das vibrissas é bastante acessível nestes animais, de forma que os movimentos faciais podem ser considerados bons marcadores do grau de lesão nervosa e da recuperação funcional do nervo facial.³⁵⁻³⁷ Existem dois estudos visando objetivar e padronizar os achados de observação dos movimentos e posição das vibrissas e fechamento da rima ocular, gerando tabelas para graduação dos resultados.³⁸⁻³⁹

Há um estudo que vai além de simples tabelas e gera um verdadeiro aparato para avaliação da mímica facial. O sistema descrito por Heaton monitora por sensores fotoelétricos, mecanismos pneumáticos e equipamento de gravação cada movimento gerado bilateralmente pelo rato, podendo assim avaliar mais precisamente e com maior reprodutibilidade de resultados a mímica facial do rato, e até identificar sincinesias.⁴⁰

2.4.1 Regeneração nervosa

Observa-se, após uma secção total do tronco do nervo facial em ratos, sobretudo após a terceira semana, o surgimento de agrupamentos de fibras mielínicas e há intensificação deste processo nas semanas seguintes, com aumento do diâmetro das fibras. Após a 3^a semana também acontece um aumento gradativo na contagem de fibras mielínicas, atingindo valor próximo ao do nervo normal na sétima semana e ultrapassando após a nona semana.^{38,41}

Vários estudos mostram que a contagem das fibras de regeneração nervosa, após cinco semanas do reparo de lesões agudas, é similar a contagem de controles normais.²² Porém, Spector et al mostrou que após cinco semanas do reparo as fibras amielínicas correspondem a aproximadamente 18% do total da população de axônios regenerados, sendo que estas fibras não contribuem significativamente para a atividade motora, de maneira que somente após a quinta semana acontecerá o aumento do volume das fibras mielínicas.³³

A somatotopia, fenômeno que organiza o processo de regeneração nervosa, sofre um processo de desregulação após o dano do nervo, o que pode gerar sincinesias.⁴² Esta desorganização na somatotopia do nervo, após secção e reparo, não mostrou ser melhorada pela aplicação de culturas de células candidatas a facilitar o alinhamento e organização das fibras regeneradas no sítio da lesão.⁴³ Um estudo com o uso de anticorpos neutralizantes de fatores de crescimento, evidenciou uma redução significativa na ramificação axonal colateral a partir do coto proximal e uma melhora importante na qualidade da reinervação.³⁶

Outro autor avaliou o efeito neurotrófico do peptídeo de ativação de adenilato ciclase pituitários (PACAP) após secção e criação de um defeito de dois milímetros no tronco do nervo facial de porcos-da-índia e concluiu que houve um aumento no número de fibras mielínicas regeneradas, facilitando a recuperação nervosa.⁴⁴

O uso da adenosina monofosfato cíclico (AMPC), em suturas de nervo facial de ratos após transecção, provocou aumento significativo na contagem de fibras mielínicas no 14^o dia após o reparo, provando aparentemente um início precoce na regeneração nervosa, acelerando o brotamento axonal a partir do coto proximal. Porém no 28^o dia ocorreu uma inversão deste achado.⁴⁵

2.4.2 Recuperação Funcional

Um estudo com ratos da espécie Wistar, realizou a secção completa do tronco do nervo facial e posterior sutura epineural provocando paralisia completa da movimentação das vibrissas e fechamento da rima ocular (grau V de Sunderland) já no primeiro dia após o procedimento em quase 100% dos ratos. Os animais recuperam paulatinamente o movimento muscular atingindo uma média de 7,5 pontos já no segundo mês de seguimento, numa escala de 0 a 10, sendo que o parâmetro fechamento ocular parece ser o sinal mais precocemente recuperado,³⁷ o que vai ao encontro de outros estudos.⁴⁶

Esta pesquisa também relata que a melhora na regeneração nervosa e na recuperação funcional é gradativa até atingir um platô entre a sétima e nona semana, momento no qual a regeneração nervosa continua melhorando, porém a recuperação clínica estabiliza, fato que, segundo os autores, pode estar relacionado aos limites da expressão facial do rato quando comparado com os humanos e também a não correspondência entre o aumento no número de fibras e a funcionalidade das mesmas,³⁸ achado ressaltado por vários autores.^{3,36}

Mesmo em estudos que mostram melhora na qualidade da reinervação com o uso de fatores neurotróficos, parece não haver diferença na recuperação funcional em relação aos animais do grupo controle.^{36,45}

2.5 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são um conjunto de células imaturas, indiferenciadas e não-especializadas que podem se regenerar e originar diferentes linhagens celulares, fazendo parte do desenvolvimento embrionário e da reparação tecidual.⁴⁷ Vários estudos têm revelado um significativo potencial clínico destas células em diversas doenças.⁴⁸

O conceito de células-tronco, com capacidade de diferenciação praticamente totipotente, surgiu nos últimos anos, a partir de trabalhos com células progenitoras embrionárias.⁴⁹⁻⁵⁰ As células-tronco embrionárias são derivadas do blastocisto, tendo

capacidade de originar centenas de linhagens celulares, porém seu uso é alvo de sérias discussões biológicas, éticas e legais, principalmente nos últimos anos.⁵¹

Posteriormente se evidenciou que o organismo adulto também possui uma reserva de células-tronco adultas (ou somáticas), que são responsáveis pelo restabelecimento tecidual durante os anos de vida e estão presentes em todos os tecidos. Estas células têm sido utilizadas há muitos anos no tratamento de doenças hematológicas, por meio do transplante de medula óssea.⁵¹⁻⁵³

2.5.1 Células-tronco da Medula Óssea

As células da medula óssea são pluripotentes e apresentam capacidade de diferenciação em uma ampla gama de células de origem mesenquimal, endodérmica e ectodérmica.⁴⁹⁻⁵⁰ Elas podem sofrer dois processos de diferenciação, dependente do meio de exposição: em células mononucleares (indiferenciadas) ou multinucleares. Dentre as mononucleares, existem as hematopoiéticas, que podem originar todas as células sanguíneas e as mesenquimais, que podem originar diversas células, como musculares, nervosas, hepatócitos, adipócitos, osteócitos.⁵⁴⁻⁵⁵

Alguns estudos em modelos experimentais sugerem que a utilização de células mononucleares (CMN) retiradas da medula óssea permite uma melhora significativa na regeneração de nervos periféricos,^{16,56-57} porém não foram encontrados estudos experimentais na literatura revisada sobre o uso de CMN de medula óssea no reparo de lesões do nervo facial.

2.6 MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA FACIAL PERIFÉRICA

Um modelo experimental para estudo da paralisia facial periférica deve produzir uma paralisia completa do tronco do nervo após sua emergência através do forâmen estilo-

mastoideo, gerando uma perda completa da movimentação da mímica facial. Ratos^{33,35-36,38-40,43,45,58-59} e coelhos^{6,27,32-34,60-61} são os animais mais comumente utilizados como modelos, porém existem estudos com gatos,⁷ hamster,^{46,62} camundongos,⁶³ porcos-da-índia⁴⁴ e porcos.⁶⁴ Lesões por esmagamento,⁴⁵ compressão e secção do nervo são utilizadas em ambos os modelos para o estudo da regeneração nervosa e recuperação funcional do sétimo par craniano, encontrando-se grande diversidade metodológica na literatura, de forma que a busca pelo melhor modelo para estudos da paralisia facial periférica continua.

A anatomia extratemporal do nervo facial de ratos está bem descrita na literatura desde 1987,⁶⁵ sendo que seu tronco é fácil e constantemente acessado por via retroauricular, não sofre influencia quanto ao peso do animal e tem extensão média de seis milímetros de comprimento.⁶⁵⁻⁶⁶

O rato da espécie Wistar é um modelo amplamente utilizado em pesquisas sobre o nervo facial.^{38-39,58-59,65,67} Já existem estudos padronizando as técnicas de secção e avaliação da mímica facial neste modelo.³⁸⁻³⁹ Além disso, o modelo é de fácil obtenção junto ao biotério de nossa Instituição, com rotinas de manipulação, anestesia e cuidados bem estabelecidos.

A secção completa com ressecção de parte do nervo trata-se de uma lesão reprodutível, gerando uma paralisia grau V na classificação de Sunderland em todos os procedimentos.^{58,66} A reparação por sutura epineural com interposição de tubo de silicone já foi descrita em estudos com nervos periféricos.¹⁶

2.7 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que a paralisia facial periférica é comumente encontrada no cotidiano do atendimento médico e as sérias seqüelas provocadas pelas injúrias ao nervo facial, faz-se necessário o estudo de recursos que facilitem a regeneração nervosa e por consequência a recuperação funcional do sétimo par craniano.

Com o advento de estudos sobre o uso de fatores neurotróficos na melhoria do reparo de lesões nervosas, como a melhora de resultados em nervos periféricos, e a inexistência de pesquisas envolvendo o uso de CMN no tratamento de transecções do nervo facial, faz-se

necessário o desenvolvimento de um modelo experimental para aplicação destas técnicas, já que estudos mostram que não podemos transpor resultados de nervos periféricos para pares cranianos.

Como existem técnicas padronizadas de avaliação comportamental da mímica facial em ratos, optamos por realizar esta pesquisa, de maneira a estudar a regeneração e recuperação funcional do nervo facial em ratos da espécie Wistar, após a criação de um defeito de 4 milímetros no tronco do nervo facial e posterior tubulização dos cotos distal e proximal, com e sem o preenchimento deste tubo com CMN retiradas da medula óssea de ratos isogênicos.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a recuperação funcional do nervo facial após lesão aguda com reparação imediata em um modelo experimental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar o uso de CMN na reparação da lesão aguda do nervo facial.

Verificar a recuperação funcional por meio da observação da movimentação e posição das vibrissas, do fechamento da rima ocular e do somatório vibrissas-olhos.

Verificar a recuperação da mímica facial ao longo de 64 dias.

4 MATERIAL E MÉTODO

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), sob registro CEP 07/04020 (Anexo A). Os protocolos experimentais utilizados seguiram as normas internacionais de experimentação em animais de laboratório e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram realizados tomando os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados e o seu sofrimento, de modo que não houve perdas durante os procedimentos e, após o término do estudo, todos os animais foram disponibilizados para outros usos no laboratório.

4.1 DELINEAMENTO

Trata-se de um estudo experimental, controlado, cegado e randomizado.

4.2 AMOSTRA

Foram utilizados 18 ratos albinos da linhagem Wistar, isogênicos, pesando entre 250 e 300 gramas. Os animais foram adquiridos no biotério do Laboratório de Microcirurgia da Faculdade de Medicina da PUCRS e foram mantidos em gaiolas individuais, em ambientes climatizados, com ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo água e comida *ad libitum*. Os animais foram manipulados em ambiente silencioso e adequado.

Dos 18 animais, dois foram sacrificados para a obtenção das CMN da medula óssea. Os demais animais foram divididos em dois grupos de comparação, contendo 8 animais cada.

Grupos de comparação

- Grupo 1 (CMN): secção do tronco do nervo facial unilateral com sua ressecção parcial, produzindo um defeito de 4 milímetros e interposição de tubo de silicone da espessura do nervo (sonda de aspiração traqueal número 4) com sutura proximal e distal e preenchimento deste tubo com preparado de CMN.
- Grupo 2 (estudo): secção do tronco do nervo facial unilateral com sua ressecção parcial, produzindo um defeito de 4 milímetros e interposição de tubo de silicone da espessura do nervo (sonda de aspiração traqueal número 4) com sutura proximal e distal e preenchimento com um veículo gelificado de hidroxil-propil-metil celulose (HPMC) a 3%;

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Análise Prévia

Os animais dos dois grupos foram submetidos à análise da mímica facial. Esta avaliação foi realizada pelo mesmo observador previamente ao procedimento para excluir alterações prévias na mímica facial que comprometam avaliação posterior.

4.3.2 Obtenção e Preparo Celular

No grupo 1, foram utilizadas CMN obtidas da medula óssea de ossos longos (fêmur, tíbia e úmero) de dois animais da mesma linhagem isogênica, que foram sacrificados para esta finalidade no início do experimento.

Após o sacrifício dos animais, foram removidos os fêmures, tíbias e úmeros (figura 1) e após remoção das epífises ósseas (figura 2), o conteúdo da medula óssea foi removido por lavagem com solução salina 0,9% (figura 3).



Figura 1 – Ossos longos removidos para obtenção do conteúdo da medula-óssea

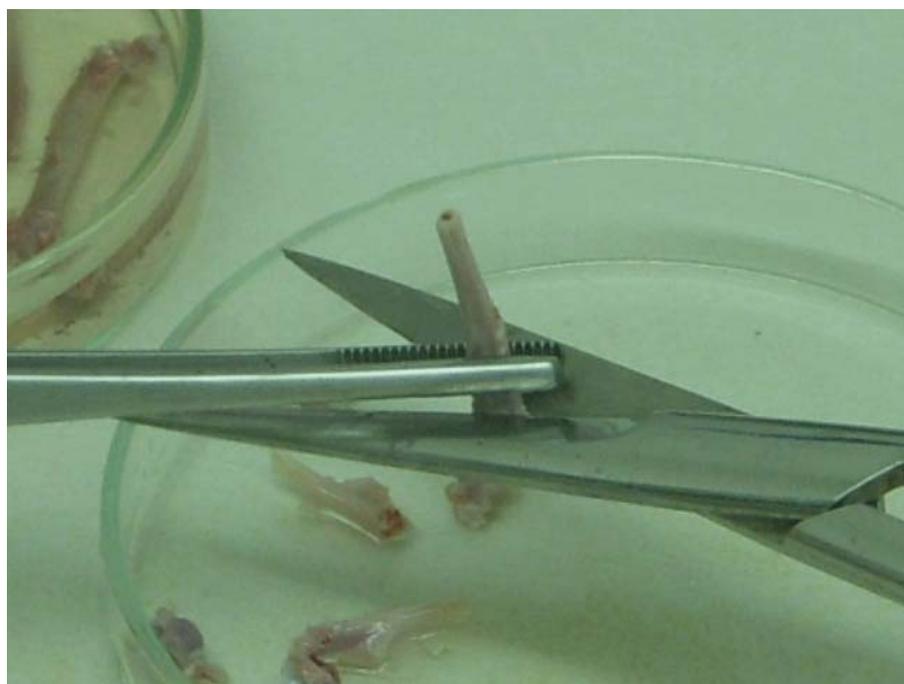


Figura 2 – Remoção das epífises de um dos fêmures

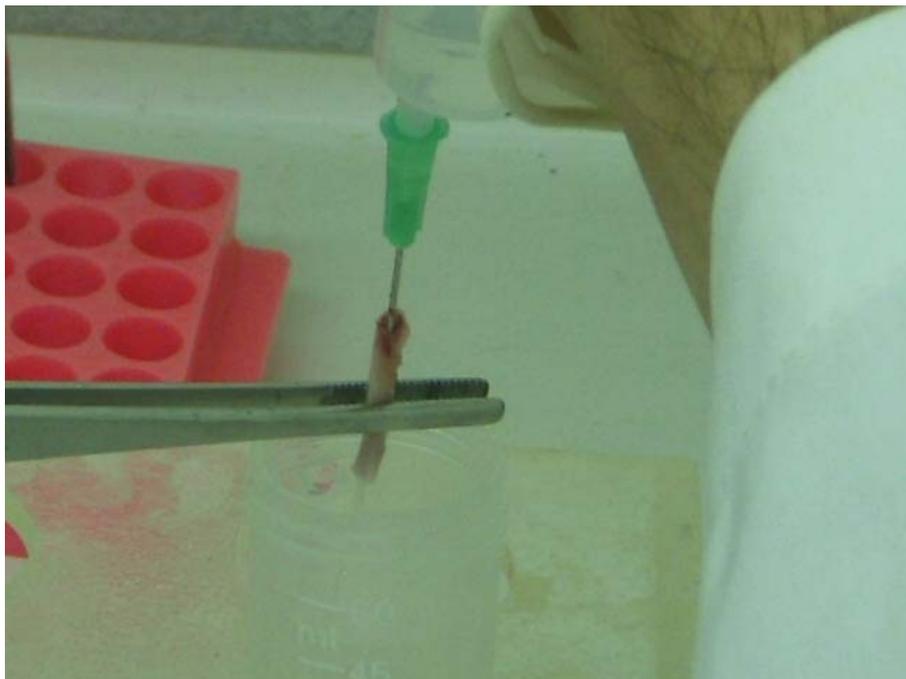


Figura 3 – Extração do conteúdo da medula-óssea

Para a separação das células-tronco, as células obtidas da medula óssea foram diluídas em meio RPMI 1640 (1:1) (Gibco®, EUA). Esta suspensão foi fracionada em um gradiente de densidade gerado por centrifugação sobre Histopaque® na densidade de 1,077g/L (Sigma-Aldrich®, EUA) a 400g durante 30 minutos a 25°C. A fração mononuclear situada sobre a interface com o Histopaque® (figura 4) foi coletada e lavada duas vezes com solução salina 0,9% estéril. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com Trypan Blue Stain 0,4% (Gibco, EUA).



Figura 4 – Fração mononuclear sobre a interface de Histopaque®

Após verificada viabilidade de 99,9%, as células foram adicionadas ao meio gelificado de HPMC 3% numa concentração de 1×10^6 células por 50 micro litros (figura 5) e colocado numa seringa de 1 mililitro, preenchendo 300 micro litros (figura 6) para aplicação posterior.



Figura 5 – Homogeneização das células mononucleares com o veículo



Figura 6 – Seringa de um mililitro com preparado de células mononucleares

4.3.3 Anestesia

Os animais foram submetidos à anestesia geral, após período de 8 horas de jejum prévio, com clorpromazina (0,2ml/kg) e quetamina 10% (0,8ml/kg) intraperitoneal e mantidos sob ventilação espontânea.

4.3.4 Procedimento Operatório

Foi realizada tricotomia da região retroauricular no lado a ser operado. Então os animais foram posicionados em decúbito lateral (Figura 7) e infiltrou-se lidocaína 2% com vasoconstritor, dando-se início ao procedimento cirúrgico. O procedimento foi realizado por um único cirurgião, com a utilização de Microscópio Óptico DF Vasconcelos com lente de 200 milímetros e aumento de 6 a 16 vezes. Os procedimentos foram documentados por fotografia com câmera digital Nikon Coolpix S51.

Realizou-se uma incisão retroauricular com extensão anterior (cerca de cinco centímetros) e dissecação por planos – pele, tecido celular subcutâneo e platisma. O músculo platisma foi identificado e seccionado, expondo a glândula parótida, o ramo zigomático, o ramo bucal e o ramo mandibular do nervo facial (Figura 8), que foram seguidos no sentido proximal até a identificação da veia jugular externa, a qual foi ligada, permitindo a visualização completa do tronco do nervo facial e seu limite proximal no forâmen estilo-mastoideo (Figura 9). O tronco do nervo facial foi seccionado com micro-tesoura próximo ao forâmen estilo-mastoideo (Figura 10).



Figura 7 – Posição operatória – Decúbito lateral



Figura 8 – Dissecção por planos com visualização dos ramos do nervo facial



Figura 9 – Tronco do nervo facial com seus ramos zigomático, bucal e mandibular

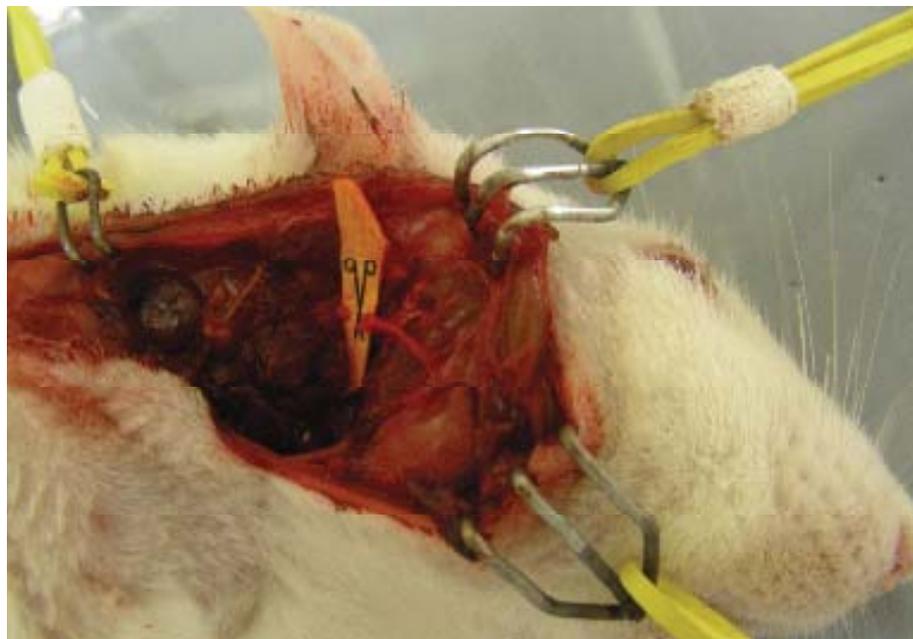


Figura 10 – Tronco do nervo facial seccionado próximo ao forâmen estilo-mastoideo

Após foi realizado os procedimentos de acordo com os dois grupos: Grupo 1 (CMN) – ressecção parcial do tronco, gerando um defeito de quatro milímetros de nervo distal a secção (Figura 11), e interposição de tubo de silicone de seis milímetros de comprimento (com espessura compatível com a espessura do nervo – sonda de aspiração traqueal número 4) (Figura 12) suturado nos cotos proximal e distal com mononylon 8-0, um ponto em cada extremidade, entrando de fora para dentro do tubo passando pelo epineuro e voltando no tubo de dentro para fora (Figura 13 e Figura 14), antes da sutura distal o tubo foi preenchido com 50 micro litros de preparado de CMN, com concentração de 1×10^6 células por 50 micro litros (Figura 15).; Grupo 2 (controle) – antes da sutura distal do nervo, o tubo de silicone foi preenchido com 50 micro litros do gel HPMC 3% A pele foi suturada com mononylon 4-0 (Figura 16).

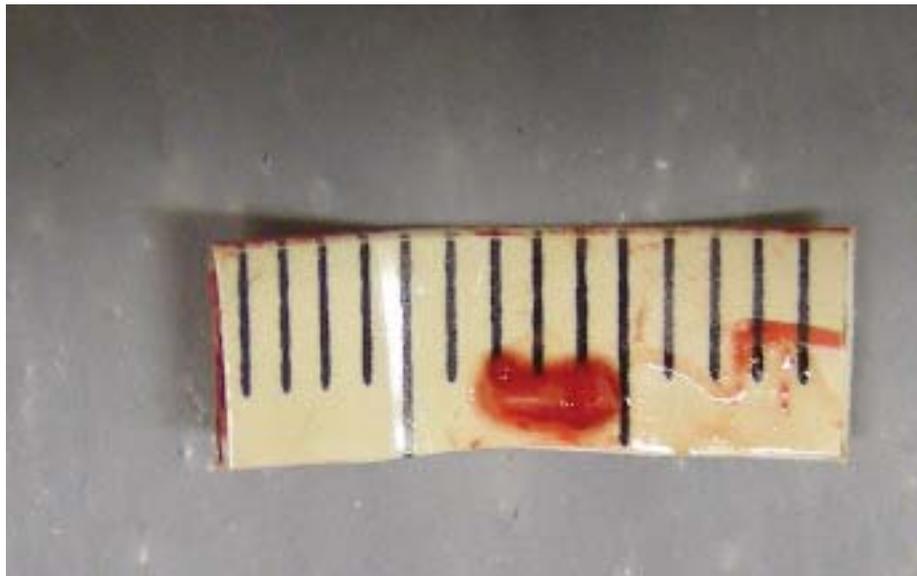


Figura 11 – Quatro milímetros do nervo facial retraído após secção

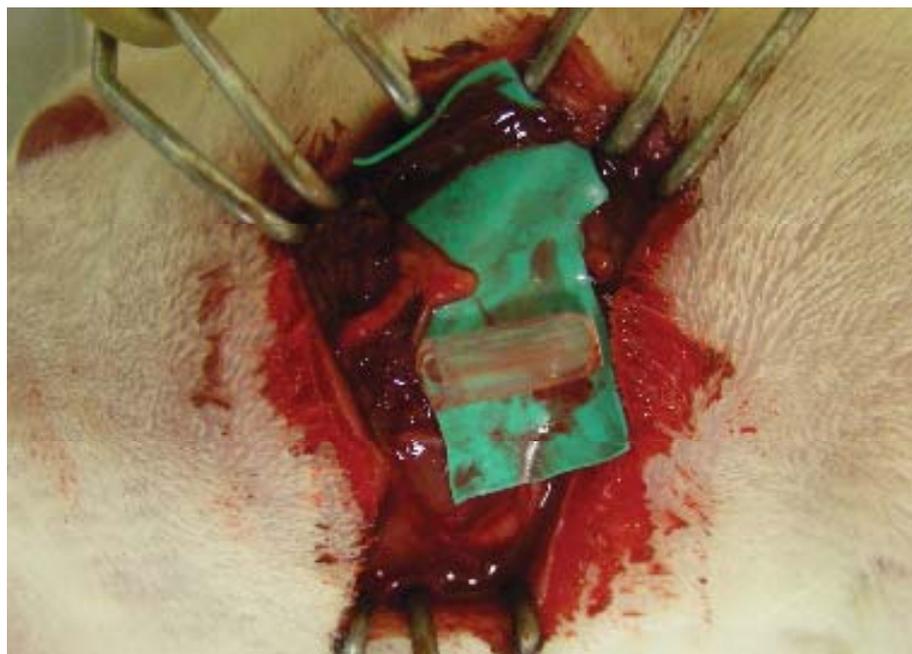


Figura 12 – Tubo de silicone de seis milímetros de comprimento ao lado do defeito criado pela ressecção do tronco do nervo facial

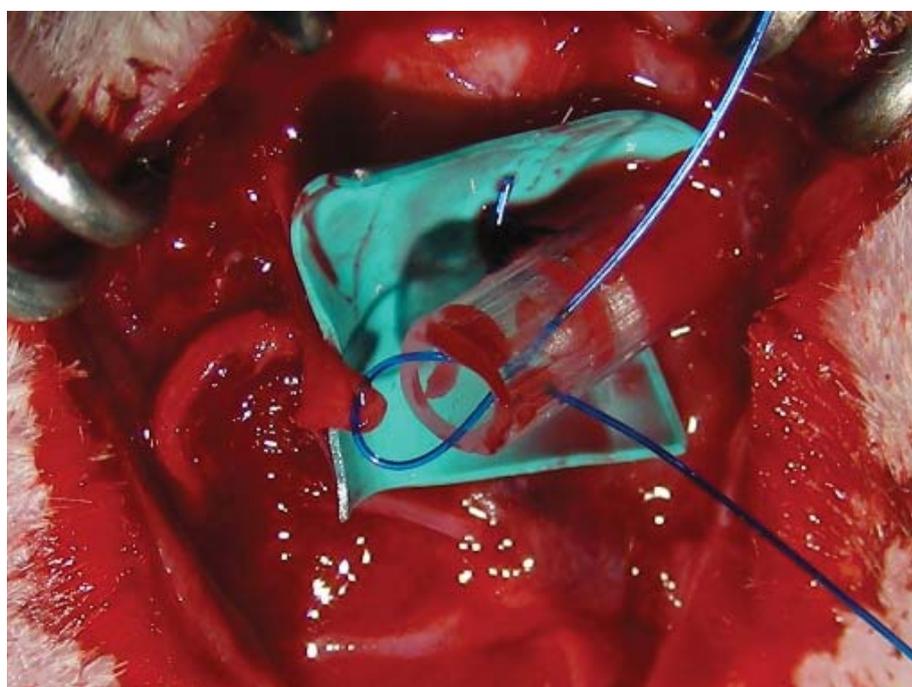


Figura 13 – Sutura do tubo de silicone ao epineuro do coto proximal do tronco do nervo facial

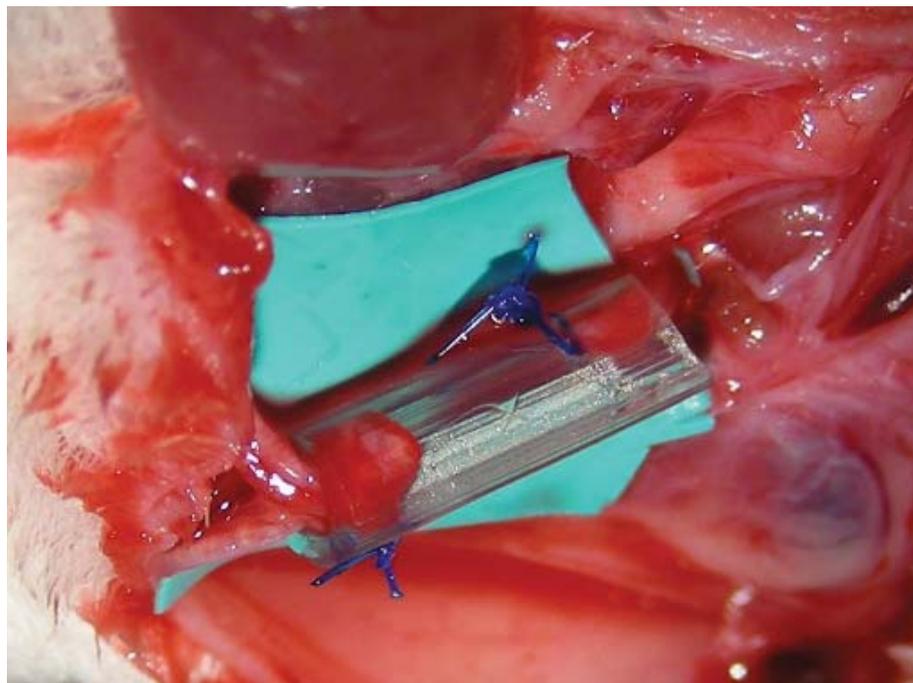


Figura 14 – Interposição do tubo de silicone com ponto proximal e distal

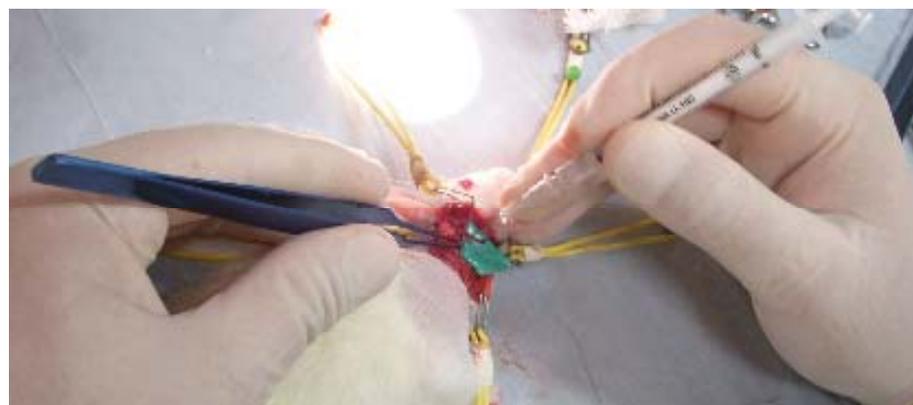


Figura 15 – Preenchimento do tubo de silicone com preparado de células mononucleares



Figura 16 – Sutura da pele com mononylon 4-0

4.3.5 Pós-operatório

Após o procedimento, os animais ficaram em observação por uma hora. Foram devolvidos para suas gaiolas individuais quando bem acordados e com débito urinário presente. Foi realizada analgesia pós-operatória com paracetamol gotas (uma gota por quilograma de peso) diluído em água.

4.3.6 Análise após o procedimento

Os animais foram submetidos à observação da mímica facial (Figura 17) em dias alternados durante trinta dias e após semanalmente por mais trinta dias, totalizando 64 dias de seguimento. Esta observação foi feita por gravação em câmera digital Nikon Coolpix S51. As

gravações foram avaliadas por examinador cego quanto ao grupo do animal e anotadas em folha específica para cada rato (Apêndice A). Sessenta e quatro dias após os procedimentos, os ratos foram anestesiados novamente para remoção do nervo facial, o qual foi levado para estudo macroscópico e histopatológico, e os ratos foram disponibilizados para outros procedimentos no Laboratório.

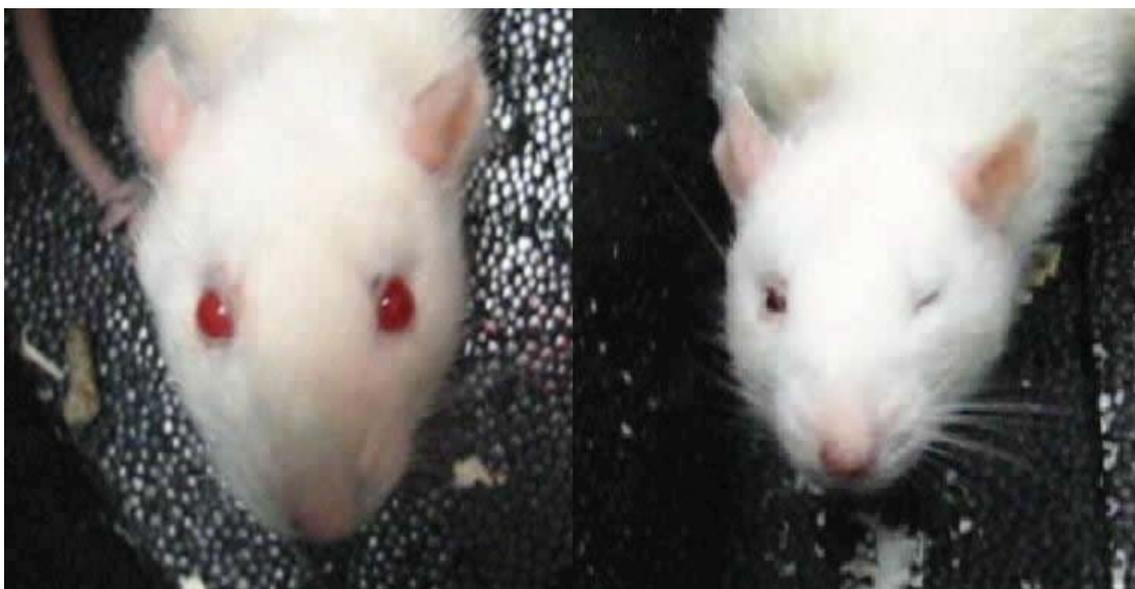


Figura 17 – Resultado da paralisia do nervo facial direito do rato – posicionamento posterior das vibrissas e fechamento ocular prejudicado

4.3.7 Teste Funcional

Nos dias destinados ao teste funcional, os animais foram observados quanto à mímica facial espontânea durante o movimento típico do rato ao explorar o ambiente e sob estímulo de insuflação de ar na face do animal para desencadear o reflexo do piscamento e o bater de palmas para gerar maior movimentação das vibrissas. Os parâmetros observados foram: a movimentação e a posição das vibrissas, o fechamento da rima ocular e o reflexo de piscamento, conforme estabelecido nos quadro 1 e 2.³⁸⁻³⁹ Para tanto, cada rato foi avaliado

individualmente em uma caixa de isopor (60x36x30cm) com a face interna pintada na cor preta. O lado não operado serviu como controle (reflexo de piscamento presente com fechamento ocular completo; movimentação das vibrissas presente e posicionamento anterior das mesmas).

Escore	Movimento e Posição
1	Sem movimento
2	Tremor leve com posicionamento posteriorizado e amplitude e frequência inferior ao lado contralateral.
3	Tremor maior com posicionamento posteriorizado e amplitude e frequência inferior ao lado contralateral.
4	Movimentação efetiva com posicionamento posteriorizado e amplitude e frequência inferior ao lado contralateral.
5	Movimentação efetiva, com posicionamento, amplitude e frequência semelhantes ao contralateral.

Quadro 1 - Escala de pontuação para movimento das vibrissas

Fonte: Adaptado de Borin A et al.³⁸ e de Faria SD et al.³⁹

Escore	Movimento
1	Sem movimento perceptível
2	Contração, mas sem fechamento perceptível (até 25%)
3	Fechamento de 25% até 50%
4	Fechamento de 50% até 75%
5	Fechamento de 75% até 100%

Quadro 2 - Escala de pontuação para fechamento da rima ocular

Fonte: Adaptado de Borin A et al.³⁸ e de Faria SD et al.³⁹

4.3.8 Eutanásia

Foi realizada nos dois animais utilizados para obtenção das CMN, com injeção intravascular da mesma solução utilizada para anestesia geral. Após a morte e remoção dos fêmures, úmeros e tíbias dos ratos, os mesmos foram desprezados em lixo hospitalar.

4.3.9 Análise Histológica

O crescimento axonal foi avaliado com a fixação do segmento neural em paraformaldeído e criopreservação. Foram confeccionados cortes semifinos de 10 micrômetros e coloração com *hematoxilina-eosina (HE)* para verificação de aspectos histológicos gerais.

As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico com os filtros apropriados.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.4.1 Tamanho de Amostra

Esperando-se uma diferença nas variáveis de desfecho de magnitude grande, ou seja, maior ou igual a dois desvios-padrão, mantendo-se poder estatístico de 90% e nível de significância de 5%, foi calculado um tamanho de amostra de sete ratos por grupo.

4.4.2 Variáveis

- Preditora: uso de CMN.
- Desfecho: Movimento das vibrissas, fechamento da rima ocular e somatório de vibrissas-olho.

4.4.3 Análise Estatística

Todos os escores foram descritos por mediana e a comparação dos grupos ponto a ponto avaliada pelo teste *U de Mann-Whitney*. Para consideração do efeito global ao longo do período usamos a abordagem da área sob a curva (AUC: area under the curve). Adicionalmente, para avaliar o processo de recuperação funcional, utilizamos a abordagem do DELTA (valor final – valor inicial). O nível de significância adotado foi de $\alpha=0,05$ e a análise dos dados foi realizada por meio do programa SPSS versão 11.5.

4.5 ASPECTOS BIOÉTICOS

Este estudo está baseado nas normas de experimentação animal do COBEA,⁶⁹ considerando o Decreto de Lei número 24.645, de 10 de julho de 1934, que estabelece medidas de proteção animal. Também seguiu a lei número 11.794 de 8 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.⁷⁰ Os pesquisadores estão cientes das sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas aos animais utilizados no presente estudo,⁷¹ respeitando a lei 9.605, de 13 de fevereiro de 1998.

5 RESULTADOS

Todos os ratos dos dois grupos apresentavam os movimentos das vibrissas e fechamento ocular sem alterações antes dos procedimentos, ou seja, somatório vibrissas-olhos igual a 10. Nenhum rato que entrou no estudo foi perdido, de maneira que todos chegaram vivos ao último dia do estudo (D64). Todos os ratos foram avaliados no dia inicial (D00), D01, D03, D05, D07, D10, D12, D14, D17, D19, D21, D24, D26, D28, D35, D42, D49, D56 e D64.

Foi realizada a mediana do escore obtido por cada rato para movimento das vibrissas, fechamento da rima ocular e somatório vibrissas-olhos. Ao final do estudo, no sexagésimo quarto dia, no critério vibrissas, a mediana dos escores do grupo 1 foi 5,00 contra 4,50 do grupo 2 ($p=0,544$); no parâmetro fechamento ocular, a mediana dos escores do grupo 1 foi 4,50 contra 4,50 do grupo 2 ($p=0,814$); e no somatório vibrissas-olhos o escore foi 9,50 para grupo 1 e 8,50 pontos para grupo 2 ($p=0,581$).

A tabela 1 mostra a mediana obtida por cada grupo nos critérios movimentação de vibrissas, no qual não se evidencia diferença estatisticamente significativa entre os grupos; fechamento ocular, de forma que houve diferença dos dias 14 a 21 em favor do grupo 1 (CMN), com medianas dos escores de 3,50 para o grupo 1 e 3,00 para o grupo 2 com $p=0,04$ no décimo quarto dia e medianas dos escores de 3,50 para o grupo 1 e 3,00 para o grupo 2 com $p=0,01$ no vigésimo primeiro dia.

Tabela 1 – Valores das medianas por dias, DELTA^a e AUC^b dos escores de movimentação das vibrissas, fechamento da rima ocular e somatório vibrissas-olhos

	Vibrissas			Olhos			Somatório		
	Grupo1	Grupo2	p ^c	Grupo1	Grupo2	p ^c	Grupo1	Grupo2	p ^c
D00	5,00	5,00	1,00	5,00	5,00	1,00	10,00	10,00	1,00
D01	1,00	1,00	0,32	1,00	2,00	0,58	3,00	3,00	0,58
D03	1,00	1,00	0,14	1,50	2,00	0,83	3,25	3,00	0,91
D05	1,00	1,00	0,14	2,50	2,00	0,26	3,75	3,00	0,22
D07	1,00	1,00	0,14	3,00	2,00	0,15	4,00	3,00	0,12
D10	1,00	1,00	0,64	3,00	2,00	0,09	4,00	3,00	0,18
D12	1,00	1,00	0,52	3,00	2,00	0,05	4,50	3,50	0,06
D14	1,00	1,00	1,00	3,50	3,00	0,04	5,00	4,00	0,19
D17	1,50	2,00	0,53	3,50	3,00	0,04	5,00	4,50	0,41
D19	2,00	2,00	0,27	3,50	3,00	0,01	5,00	5,00	0,40
D21	2,00	2,50	0,31	3,50	3,00	0,01	5,00	5,00	0,56
D24	2,00	2,50	0,42	4,00	3,00	0,08	5,50	5,50	0,51
D26	2,00	2,50	0,48	4,00	3,00	0,08	6,00	5,50	0,44
D28	2,00	3,00	0,49	4,00	3,00	0,26	6,00	6,00	0,66
D35	3,00	3,00	0,91	4,00	4,00	0,52	6,50	6,50	0,59
D42	3,50	3,00	0,55	4,00	4,00	0,96	7,50	7,50	0,52
D49	4,00	3,00	1,00	4,00	4,50	0,91	8,00	7,50	0,79
D56	5,00	4,00	0,78	4,50	4,50	0,81	9,00	8,00	0,78
D64	5,00	4,50	0,54	4,50	4,50	0,81	9,50	8,50	0,58
DELTA^a	0,00	-0,50	0,54	-0,50	-0,50	0,81	-0,50	-1,50	0,58
AUC^b	176,50	164,75	0,75	229,25	221,75	0,29	382,25	396,25	0,43

a – DELTA: diferença entre valor final menos valor inicial

b – AUC: área sob a curva

c – p: significância estatística (Teste *U de Mann-Whitney*)

Na tabela 1, também se evidencia as medianas de cada grupo para o somatório vibrissas-olhos, na qual a diferença apresentada no quesito fechamento da rima ocular não se repete.

A diferença entre os valores finais menos os valores iniciais é observado no parâmetro DELTA, também explícito na tabela 1, mostrando que ambos os grupos, estudo e controle, obtiveram uma recuperação funcional satisfatória, praticamente retornando as medianas dos valores iniciais, de forma que o DELTA para somatório vibrissas-olhos foi de -0,50 para o grupo 1 e -1,50 para o grupo 2, não mostrando diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,58$). A área sob a curva (AUC), observada na tabela 1, evidencia o efeito global dos tratamentos. Este critério também não foi estatisticamente significativo.

Para melhor visualização da característica da recuperação funcional de cada grupo foram criados os gráficos 1, 2 e 3 que correspondem ao movimento das vibrissas, fechamento da rima ocular e somatório vibrissas-olhos, respectivamente. Os gráficos mostram uma melhora em todos os critérios no decorrer dos 64 dias de estudo, mostrando uma superioridade do grupo que utilizou as CMN em praticamente todos os dias em que foi realizado o teste funcional, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa.

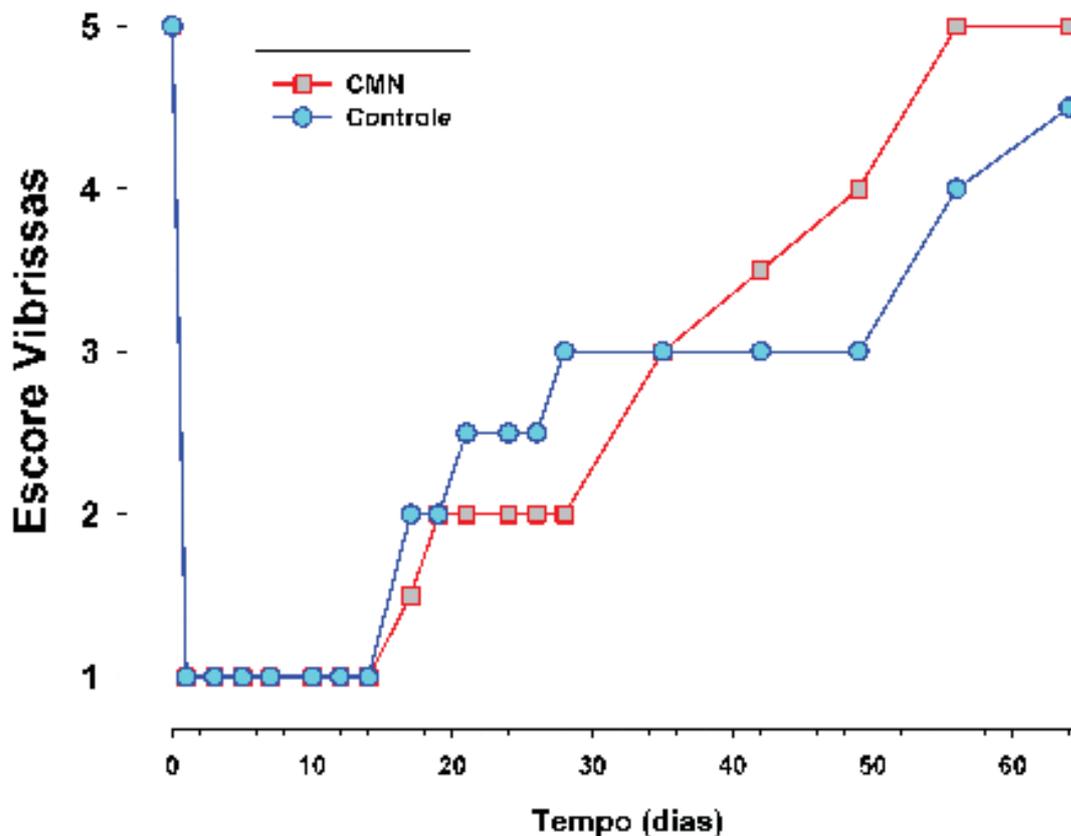


Gráfico 1 – Mediana do escore movimento das vibrissas em relação ao tempo de observação

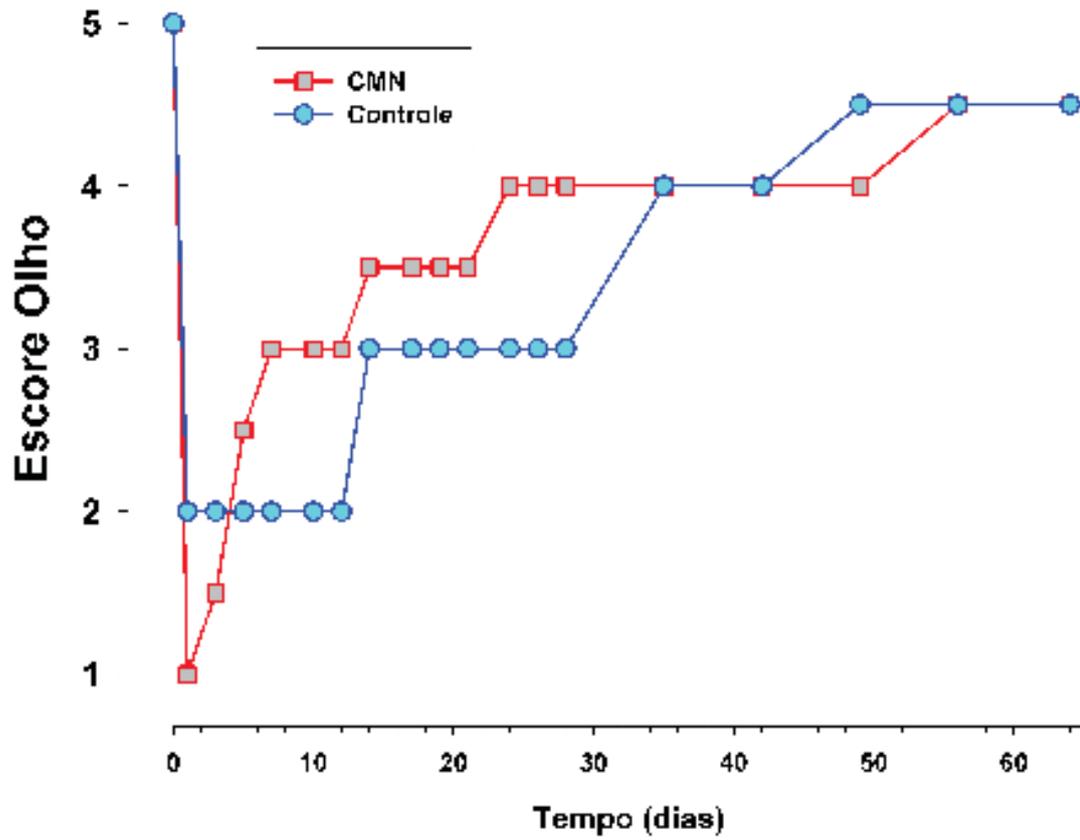


Gráfico 2 – Mediana do escore fechamento da rima ocular em relação ao tempo de observação

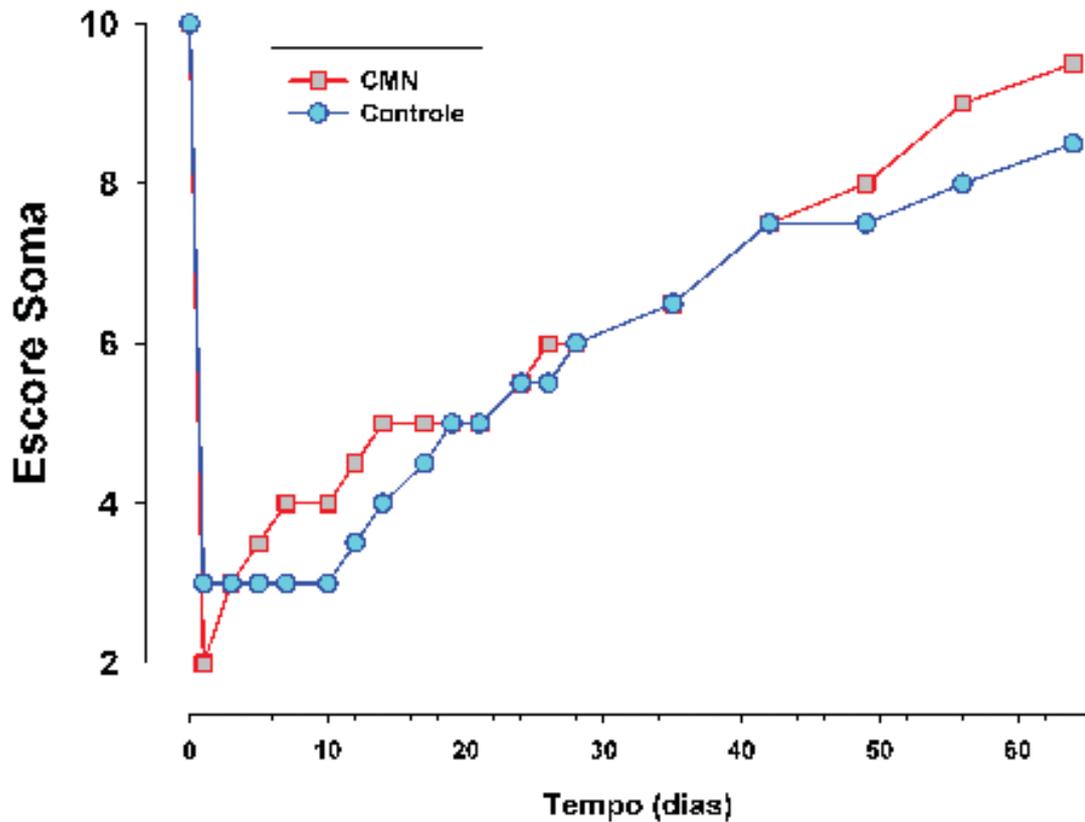


Gráfico 3 – Medianas do escore somatório vibrissas-olhos em relação ao tempo de observação

A figura 18 mostra a estrutura histológica de um nervo normal do lado contralateral à lesão do facial do rato 2 do grupo controle, na qual se evidencia arquitetura normal das fibras nervosas, enquanto o crescimento de novas fibras nervosas em meio a tecido intersticial e neovascularização intensa é evidenciado na figura 19 que corresponde a um nervo regenerado após 64 dias de procedimento realizado no rato 3 do grupo controle.

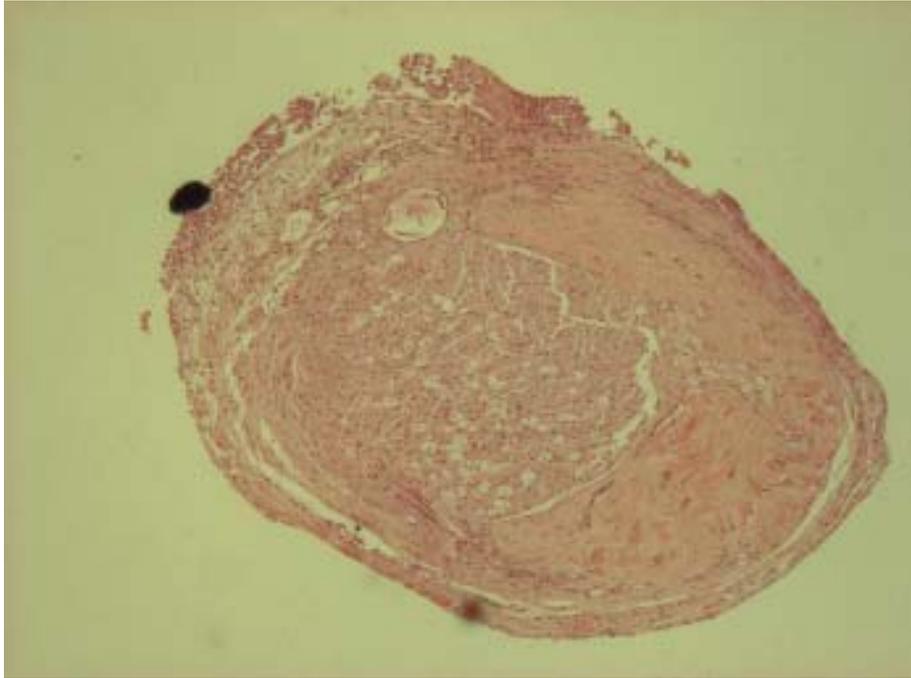


Figura 18 – Nervo normal coloração hematoxilina-eosina com 50 aumentos

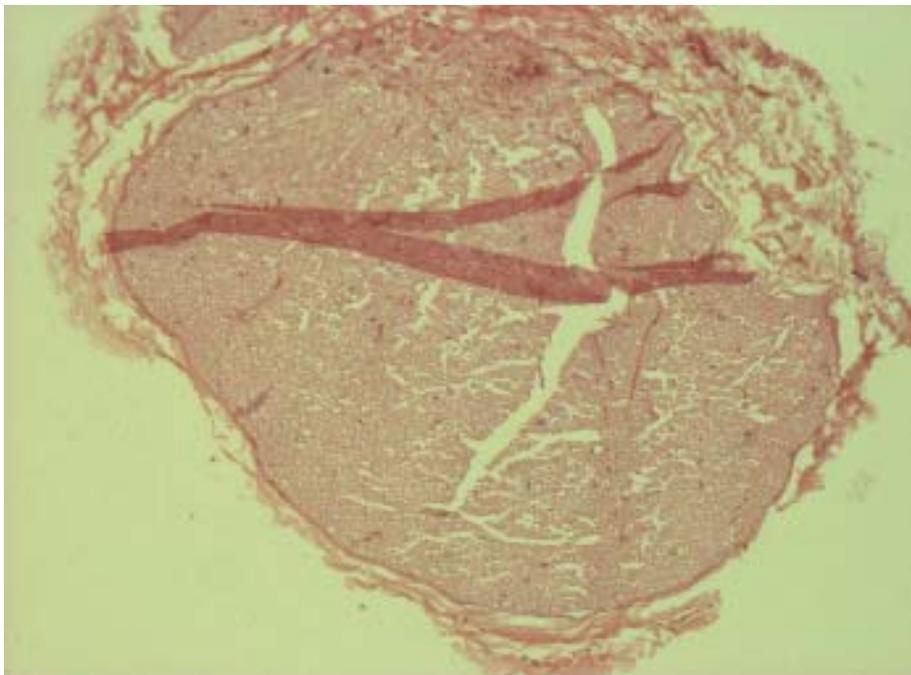


Figura 19 – Nervo regenerado após 64 dias, coloração hematoxilina-eosina com 100 aumentos

6 DISCUSSÃO

Optou-se por trabalhar com o rato da espécie Wistar, por ser um modelo utilizado em outros estudos do nervo facial,^{37-38,57-58,64,66} por haver uma padronização das técnicas de secção e avaliação da mímica facial neste modelo.³⁷⁻³⁸ Além disso, o modelo é de fácil obtenção junto ao biotério de nossa Instituição, com rotinas de manipulação, anestesia e cuidados bem estabelecidos. A anatomia extratemporal do nervo facial do rato já está bem descrita na literatura,^{34,64} sendo que seu tronco é fácil e constantemente acessado por via retroauricular e não sofre influencia quanto ao peso do animal.⁶⁵

Quanto ao tipo de lesão neural, escolheu-se a secção completa com ressecção de parte do nervo, por tratar-se de uma lesão reprodutível, com a intenção de gerar uma paralisia grau V na classificação de Sunderland em todos os procedimentos.^{57,65} Na reparação utilizou-se sutura epineural com interposição de tubo de silicone, pois já foi descrita em estudos com nervos periféricos.¹⁶

A objetividade no modelo experimental de paralisia facial periférica é a característica básica para o estudo da regeneração do nervo facial, porém não pode faltar praticidade, eficácia e reprodutibilidade ao sistema de avaliação da mímica facial. Sistemas muito sofisticados como o utilizado por Heaton⁴⁰ são muito precisos, mas são de difícil acesso, caros e impraticáveis no nosso meio. Por isto foi utilizado um sistema adaptado,³⁷⁻³⁸ com maior facilidade na execução, todavia com algumas restrições, tais como dificuldade para observação da movimentação da musculatura do rato em seu habitat. Também foi observado problema na reprodutibilidade dos achados entre observadores diferentes na classificação do grau de recuperação dos movimentos dos ratos, o que não foi o motivo do presente estudo.

Realizou-se o teste funcional ao invés de testes eletrofisiológicos,⁵⁹ que avaliam muito bem a condução nervosa, porque freqüentemente a melhora nestes parâmetros não acompanha a evolução clínica. Porém sabemos que a classificação adaptada, conforme descrita pelos próprios autores,³⁷⁻³⁸ apresenta um inegável e significativo grau de subjetividade.

Após o procedimento que gera a paralisia, evidencia-se um desvio da comissura nasal para o lado contralateral ao paralisado em 100% dos ratos estudados, principalmente associado ao ato do rato fuçar, explorando o ambiente. Este dado não foi relacionado como resultado porque a classificação utilizada não previa esta alteração e não encontramos nenhum estudo na literatura fazendo referência a tal achado, de maneira que não foi possível padronizar a análise da recuperação deste fenômeno.

A inexistência de diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados pode estar relacionada ao tamanho amostral, o qual foi estabelecido esperando-se uma diferença de grande magnitude, de no mínimo dois desvios-padrão. Da mesma forma, não foi encontrado na literatura estudada nenhuma referência ao tamanho da lesão crítica do nervo facial, nem em humanos quanto menos em ratos. Sabemos, por estudos anteriores, que a lesão crítica para o nervo ciático em ratos é de dez milímetros,¹⁶ porém este tamanho de lesão para um nervo com média de seis milímetros de tronco, como é o caso do nervo em estudo, é impraticável. Realizou-se a ressecção de quatro milímetros do tronco do nervo, o que foi possível em 100% dos animais, todavia em nenhum rato haveria a possibilidade de uma ressecção maior.

Os ratos do grupo 2 (controle) apresentaram uma boa recuperação da funcionalidade do nervo facial, ao menos no que diz respeito aos parâmetros estudados, sendo que, no critério somatório vibrissas-olhos, a diferença entre os valores das medianas finais e iniciais foi de 1,5 (DELTA = -1,50), de maneira que ficou difícil para averiguar uma diferença acentuada dos ratos do grupo 1 (CMN), já que as medianas finais foram muito próximas às iniciais mesmo no grupo controle. Apesar disto, houve uma discreta superioridade na recuperação funcional dos ratos do grupo 1 durante os sessenta e quatro dias de seguimento.

Como em outros estudos,^{37,45} o parâmetro fechamento ocular parece ser o mais precocemente recuperado, atingindo uma boa melhora funcional já no primeiro mês após o dano e reparo. Ainda este critério foi o único a revelar uma diferença estatisticamente significativa entre a segunda e terceira semanas em favor do grupo tratado com CMN.

Em suma, achamos que a lesão criada, no modelo experimental adotado, deixa pouca margem para revelação de diferenças significativas entre os grupos, pois mesmo nos ratos controles a recuperação funcional, por meio dos testes funcionais aplicados, foi satisfatória.

7 CONCLUSÃO

Os dois grupos, CMN e controle, obtiveram recuperação da mímica facial no teste funcional após a lesão aguda do VII par craniano no período de 64 dias.

O grupo que utilizou as CMN apresentou recuperação funcional mais precoce no critério fechamento da rima ocular entre a segunda e terceira semanas.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo de CMN em relação à recuperação funcional, por meio da análise da movimentação e posição das vibrissas, do fechamento da rima ocular e reflexo de piscamento e do somatório vibrissas-olhos no período do estudo.

Houve uma melhora progressiva dos parâmetros relacionados à mímica facial durante os sessenta e quatro dias de seguimento dos ratos envolvidos no estudo, tanto do grupo controle como do grupo de CMN, com uma discreta e não significativa superioridade do grupo das CMN.

REFERÊNCIAS

1. Bento RF, Miniti A. Comparison between fibrin tissue adhesive, epineural suture and natural union in the intratemporal facial nerve of cats. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1989;465:1-36.
2. Khomura E, Yuguchi T, Yoshimine T, Fujinaka T, Koseki N, Sano A, et al. BDNF atelocollagen mini-pellet accelerates facial nerve regeneration. *Brain Res.* 1999;849:235-8.
3. Choi D, Dunn LT. Facial nerve repair and regeneration: an overview of basic principles for neurosurgeons. *Acta Neurochir (Wien).* 2001;143:107-14.
4. Lazarini PR, Mitre EI, Szajubok A. Paralisia facial periférica. In: Campos CAH, Costa HOO. *Tratado de Otorrinolaringologia.* São Paulo: Roca; 2003. p.395-424.
5. Bento RF, Brito RV. Tratamento das paralisias faciais – presente e futuro. In: Lavinsky L. *Tratamento em Otologia.* Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p.709-38.
6. Diaz LM, Steele MH, Guerra AB, Aubert FE, Sloop GD, Diaz HA, et al. The role of topically administered FK506 (tacrolimus) at the time of facial nerve repair using entubulation neuroorrhaphy in a rabbit model. *Ann Plast Surg.* 2004;52:407-13.
7. Selesnick SH, Patwardhan A. Acute facial paralysis: evaluation and early management. *Am J Otolaryngol.* 15;1994:387-408.
8. Vaughan ED, Richardson D. Facial nerve reconstruction following ablative parotid surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1993;31:274-80.
9. Lazarini PR, Mitre EI, Takatu E, Tidei R. Graphic-visual adaptation of House-Brackmann facial nerve grading for peripheral facial palsy. *Clin Otolaryngol.* 2006;31:192-7.

10. Adour KK, Swanson PJ. Facial paralysis in 403 consecutive patients: emphasis on treatment response in patients with Bell's palsy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1971;75:1284-301.
11. Botman JWM, Jongkees LBW. The results of intratemporal treatment of facial palsy. *Pract Otorrhinolaringol.* 1975;17:80-100.
12. Smith IM, Murray JA, Cull RE, Slattery J. Facial weakness. A comparison of clinical and photographic methods of observation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991;117:906-9.
13. House JW, Brackmann DE. Facial nerve grading system. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1985;93:146-7.
14. House JW. Facial nerve grading systems. *Laryngoscope.* 1983;93:1056-69.
15. Spector GJ. Neural repair in facial paralysis: clinical and experimental studies. *Eur Arch Otorrhinolaryngol.* 1997;254:S68-S75.
16. Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, et al. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res.* 2003;974:17-24.
17. Gordon T, Sulaiman O, Boyd G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst.* 2003;8:236-50.
18. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194:1-14.
19. Gluck T. Ueber Transplantation, regeneration und entzündliche Neubildung. *Berl Klin Wochenschr.* 1881;18:529-31.
20. Bunnell S. Suture of the facial nerve within the temporal bone with a report of the first successful case. *Surg Gynecol Obstet* 1927;45:7-12.
21. Spector GJ. Mimetic surgery for the paralyzed face. *Laryngoscope.* 1985;95:1494-522.
22. Spector GJ, Lee P, Peterein J, Roufa D. Facial nerve regeneration through autologous nerve grafts: a clinical and experimental study. *Laryngoscope.* 1991;101:537-54.
23. Pinna BR, Testa JRG, Fukuda Y. Estudo de paralisias faciais traumáticas: análise de casos clínicos e cirúrgicos. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004;70:479-82.
24. Wong JF, Mattox DE. Experimental nerve regeneration. *Otolaryngol Clin North Am.* 1991;24:739-52.

25. Weber RA, Breidenbach WC, Brown RE, Jabaley ME, Mass DP. Randomized prospective study of polyglycoic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans. *Plast Reconstr Surg.* 2000;106:1036-45.
26. Terris DJ, Toft KM, Moir M, Lum J, Wang M. Brain-derived neurotrophic factor-enriched collagen tubule as a substitute for autologous nerve grafts. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;127:294-8.
27. Spector JG, Lee P, Derby A, Friedrich G, Burke JJ, Vogler GP, et al. Facial nerve regeneration through semipermeable chambers in the rabbit. *Laryngoscope.* 1992;102:784-96.
28. Chen YS, Wang-Bennet LT, Coker NJ. Facial nerve regeneration in the silicone chamber: influence of nerve growth factor. *Exp Neurol.* 1989;103:52-60.
29. Woolley AL, Hollowell JP, Rich KM. Fibronectin-laminin combination enhances peripheral nerve regeneration across long gaps. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1990;103:509-18.
30. Dellon AL, Mackinnon SE. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast Reconstr Surg.* 1988;82:849-56.
31. Spector JG, Lee P, Derby A, Roufa DG. Comparison of rabbit facial nerve regeneration in nerve growth factor-containing silicone tubes to that in autologous neural graft. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995;104:875-85.
32. Spector JG, Lee P, Derby A, Friedrich GE, Neises G, Roufa DG. Rabbit facial nerve regeneration in NGF-containing silastic tubes. *Laryngoscope* 1993;103:548-58.
33. Spector JG, Lee P, Derby A. Rabbit facial nerve regeneration in autologous nerve grafts after antecedent injury. *Laryngoscope* 2000;110:660-7.
34. Greene EC. Nervous System. In: Green EC. *Anatomy of the rat.* New York: Hafner; 1995. p.115-75.
35. Angelov DN, Guntinas-Lichius O, Wewetzer K, Neiss WF, Streppel M. Axonal branching and recovery of coordinated muscle activity after transaction of the facial nerve in adult rats. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2005;180:1-130.
36. Guntinas-Lichius O, Irintchev A, Streppel M, Lenzen M, Grosheva M, Wewetzer K, et al. Factors limiting motor recovery after facial nerve transaction in the rat combined structural and functional analyses. *Eur J Neurosci.* 2005;21:391-402.
37. Ozcan G, Shenaq S, Spira M. Vascularized nerve tube: an experimental alternative for vascularized nerve grafts over short gaps. *J Reconstr Microsurg.* 1993;9:405-13.

38. Borin A, Toledo RN, Faria SD, Testa JR, Cruz OL. Behavioral and histologic experimental model of facial nerve regeneration in rats. *Braz J Otorrhinolaryngol.* 2006;72:775-84.
39. de Faria SD, Testa JR, Borin A, Toledo RN. Standardization of techniques used in facial nerve section and facial movement evaluation in rats. *Braz J Otorrhinolaryngol.* 2006;72:341-7.
40. Heaton JT, Kowaleski JM, Bermejo R, Zeigler HP, Ahlgren DJ, Hadlock TA. A system for studying facial nerve function in rats through simultaneous bilateral monitoring of eyelid and whisker movements. *J Neurosci Methods.* 2008;171:197-206.
41. Lewin SL, Utley DS, Cheng ET, Verity AN, Terris DJ. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transaction and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope.* 1997;107:992-9.
42. Choi D, Raisman G. Somatotopic organization of the facial nucleus is disrupted after lesion and regeneration of the facial nerve: The histological representation of synkinesis. *Neurosurgery.* 2002;50:355-63.
43. Choi D, Raisman G. Disorganization of the facial nucleus after nerve lesioning and regeneration in the rat: effects of transplanting candidate reparative cells to the site of injury. *Neurosurgery.* 2005;56:1093-100.
44. Kimura H, Kawatani M, Ito E, Ishikawa K. Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on facial nerve recovery in the guinea pig. *Laryngoscope.* 2003;113:1000-6.
45. Borin A, Toledo RN, Ho PL, Testa JR, Cruz OL, Fukuda Y. Influence of cyclic AMP on facial nerve regeneration in rats. *Braz J Otorrhinolaryngol.* 2008;74:675-83.
46. Jones KJ. Recovery from facial paralysis following crush injury of the facial nerve in hamsters: differential effects of gender and androgen exposure. *Exp Neurol.* 1993;121:133-8.
47. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:605-31.
48. Kaji EH, Leiden JM. Gene and stem cell therapies. *JAMA* 2001;285:545-50.
49. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells. the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol.* 2006;169:338-46.
50. Huss R. Isolation of primary and immortalized CD34 hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem Cells.* 2000;18:1-9.

51. Haas S, Weidner N, Winkler J. Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol*. 2005;18:59-64.
52. Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:398-418.
53. Rice CM, Scolding NJ. Adult stem cells-reprogramming neurological repair? *Lancet*. 2004;364:193-9.
54. Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M, et al. Comparison of mononuclear and mesenchymal stem cell transplantation in myocardium infarction. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2005;20:270-8.
55. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355:1199-209.
56. Tohil M, Terenghi G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem*. 2004;40:17-24.
57. Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Periphe Nerv Syst*. 2003;8:236-50.
58. Guntinas-Linchius O, Streppel M, Angelov DN, Stennert E, Neiss WF. Effect of delayed facial-facial suture on facial nerve regeneration: a horseradish peroxidase tracing study in the rat. *Acta Otolaryngol*. 1997;117:670-4.
59. Jergovic D, Stal P, Lindman D, Lindvall B, Hildebrand C. Changes in a rat facial nerve after facial nerve injury and repair. *Muscle Nerve*. 2001;24:1202-12.
60. Sandrini FA, Pereira-Júnior ED, Gay-Escoda C. Rabbit facial nerve anastomosis with fibrin glue: nerve conduction velocity evaluation. *Braz J Otorrinolaryngol*. 2007;73:196-201.
61. Costa HJ, Silva CF, Korn GP, Lazarini PR. Posttraumatic facial nerve regeneration in rabbits. *Braz J Otorrinolaryngol*. 2006;72:786-93.
62. Kinderman NB, Jones KJ. Axotomy-induced changes in ribosomal RNA levels in female hamster facial motoneurons: differential effects of gender and androgen exposure. *Exp Neurol*. 1994;126:144-8.
63. Fawcett JP, Bamji SX, Causing CG, Aloyz R, Ase AR, Reader TA, et al. Functional evidence that BDNF is an anterograde neural trophic factor in the CNS. *J Neurosci*. 1998;18:2808-21.

64. David DM. Facial nerve trauma: optimal timing for repair. *Laryngoscope*. 1991;101:835-48.
65. Mattox DE, Felix H. Surgical anatomy of the rat facial nerve. *Am J Otol*. 1987;8:43-7.
66. Semba K, Egger MD. The facial “motor” nerve of the rat: control of vibrissal movement and examination of motor and sensory components. *J Comp Neurol*. 1986;247:144-58.
67. Guntinas-Linchius O, Effenberger K, Angelov DN, Klein J, Streppel M, Stennert E, et al. Delayed rat facial nerve repair leads to accelerated and enhanced muscle reinnervation with reduced collateral axonal sprouting during a definitive denervation period using a cross-anastomosis paradigm. *Exp Neurol* 2000;162:98-111.
68. Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Schulte E, Stennert E. Qualitative image analysis of the chromatolysis in rat facial nerve and hypoglossal motoneurons following axotomy with and without reinnervation. *Cell Tissue Res* 1996;286:537-41.
69. Brasil. Senado Federal. Subsecretaria de Informações. Decreto de lei N. 24.645 de 10 de julho de 1934. Estabelece medidas de proteção aos animais [Internet]. Brasília – [capturado em 2009 jan 26]. Disponível em <http://www6.senado.gov.br/legislacao/ListaPublicacoes.action?id=39567>.
70. Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília – [capturado 2009 fev 05]. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccIVIL_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm.
71. Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Lei N. 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõem sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente. Brasília – [capturado em 2009 jan 26]. Disponível em http://www.ibama.gov.br/fauna/legislacao/lei_9605_98.pdf.

APÊNCIDE A - Teste funcional de cada rato

Rato número: 1001 (controle)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	15.10.08	5	5	5	5	10	10
01°	20.10.08	2	5	4	5	6	10
03°	22.10.08	2	5	4	5	6	10
05°	24.10.08	2	5	4	5	6	10
07°	27.10.08	2	5	4	5	6	10
10°	29.10.08	1	5	4	5	5	10
12°	31.10.08	1	5	4	5	5	10
14°	03.11.08	1	5	4	5	5	10
17°	05.11.08	1	5	4	5	5	10
19°	07.11.08	1	5	4	5	5	10
21°	10.11.08	1	5	4	5	5	10
24°	12.11.08	1	5	4	5	5	10
26°	14.11.08	1	5	4	5	5	10
28°	17.11.08	2	5	4	5	6	10
35°	24.11.08	2	5	4	5	6	10
42°	1°.12.08	2	5	4	5	6	10
49°	8.12.08	2	5	4	5	6	10
56°	15.12.08	2	5	4	5	6	10
64°	22.12.08	2	5	4	5	6	10
DF		Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1002 (controle)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	15.10.08	5	5	5	5	10	10
01°	20.10.08	1	5	3	5	3	10
03°	22.10.08	1	5	3	5	4	10
05°	24.10.08	1	5	3	5	4	10
07°	27.10.08	1	5	3	5	4	10
10°	29.10.08	1	5	2	5	3	10
12°	31.10.08	1	5	2	5	3	10
14°	03.11.08	1	5	4	5	5	10
17°	05.11.08	1	5	4	5	5	10
19°	07.11.08	1	5	4	5	5	10
21°	10.11.08	1	5	4	5	5	10
24°	12.11.08	2	5	4	5	6	10
26°	14.11.08	2	5	4	5	6	10
28°	17.11.08	2	5	4	5	6	10
35°	24.11.08	2	5	4	5	6	10
42°	1°.12.08	2	5	4	5	6	10
49°	8.12.08	2	5	4	5	6	10
56°	15.12.08	3	5	4	5	7	10
64°		3	5	3	5	7	10
DF	22.12.08	Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1003 (caso)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	27.10.08	5	5	5	5	10	10
01°	29.10.08	1	5	2	5	3	10
03°	31.10.08	1	5	2	5	3	10
05°	03.11.08	1	5	2	5	3	10
07°	05.11.08	1	5	2	5	3	10
10°	07.11.08	1	5	2	5	3	10
12°	10.11.08	1	5	2	5	3	10
14°	12.11.08	1	5	2	5	3	10
17°	14.11.08	3	5	2	5	5	10
19°	17.11.08	3	5	2	5	5	10
21°	19.11.08	3	5	2	5	5	10
24°	21.11.08	3	5	2	5	5	10
26°	24.11.08	3	5	2	5	5	10
28°	26.11.08	3	5	2	5	5	10
35°	3.12.08	3	5	2	5	5	10
42°	10.12.08	3	5	2	5	5	10
49°	17.12.08	3	5	2	5	5	10
56°	24.12.08	3	5	2	5	5	10
64°	31.12.08	3	5	2	5	5	10
DF		Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1004 (caso)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	27.10.08	5	5	5	5	10	10
01°	29.10.08	1	5	3	5	3	10
03°	31.10.08	1	5	3	5	3	10
05°	03.11.08	1	5	3	5	3	10
07°	05.11.08	1	5	2	5	3	10
10°	07.11.08	1	5	2	5	3	10
12°	10.11.08	1	5	2	5	3	10
14°	12.11.08	1	5	2	5	3	10
17°	14.11.08	1	5	2	5	5	10
19°	17.11.08	1	5	2	5	5	10
21°	19.11.08	1	5	2	5	5	10
24°	21.11.08	1	5	3	5	5	10
26°	24.11.08	2	5	3	5	5	10
28°	26.11.08	2	5	3	5	5	10
35°	3.12.08	2	5	3	5	5	10
42°	10.12.08	2	5	3	5	5	10
49°	17.12.08	3	5	4	5	5	10
56°	24.12.08	4	5	4	5	5	10
64°	31.12.08	4	5	4	5	5	10
DF		Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1005 (caso)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	27.10.08	5	5	5	5	10	10
01°	29.10.08	1	5	1	5	2	10
03°	31.10.08	1	5	1	5	2	10
05°	03.11.08	1	5	1	5	2	10
07°	05.11.08	1	5	1	5	2	10
10°	07.11.08	1	5	1	5	2	10
12°	10.11.08	1	5	1	5	2	10
14°	12.11.08	1	5	1	5	2	10
17°	14.11.08	2	5	2	5	4	10
19°	17.11.08	2	5	2	5	4	10
21°	19.11.08	2	5	2	5	4	10
24°	21.11.08	2	5	2	5	4	10
26°	24.11.08	2	5	2	5	4	10
28°	26.11.08	3	5	3	5	6	10
35°	03.12.08	3	5	3	5	6	10
42°	10.12.08	3	5	3	5	6	10
49°	17.12.08	3	5	3	5	6	10
56°	24.12.08	4	5	4	5	8	10
64°	31.12-08	4	5	4	5	8	10
DF		Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1006 (caso)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	27.10.08	5	5	5	5	10	10
01°	29.10.08	1	5	2	5	3	10
03°	31.10.08	1	5	2	5	3	10
05°	03.11.08	1	5	2	5	3	10
07°	05.11.08	1	5	3	5	4	10
10°	07.11.08	1	5	3	5	4	10
12°	10.11.08	1	5	3	5	4	10
14°	12.11.08	1	5	3	5	4	10
17°	14.11.08	1	5	3	5	4	10
19°	17.11.08	2	5	3	5	5	10
21°	19.11.08	2	5	3	5	5	10
24°	21.11.08	2	5	3	5	5	10
26°	24.11.08	2	5	3	5	5	10
28°	26.11.08	2	5	4	5	6	10
35°	03.12.08	2	5	4	5	6	10
42°	10.12.08	3	5	4	5	7	10
49°	17.12.08	3	5	4	5	7	10
56°	24.12.08	4	5	4	5	8	10
64°	31.12-08	5	5	4	5	9	10
DF		Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1007 (controle)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	31.10.08	5	5	5	5	10	10
01°	03.11.08	1	5	1	5	2	10
03°	05.11.08	1	5	1	5	2	10
05°	07.11.08	1	5	1	5	2	10
07°	10.11.08	1	5	1	5	2	10
10°	12.11.08	1	5	2	5	3	10
12°	14.11.08	2	5	3	5	5	10
14°	17.11.08	2	5	3	5	5	10
17°	19.11.08	2	5	3	5	5	10
19°	21.11.08	2	5	3	5	5	10
21°	24.11.08	2	5	3	5	5	10
24°	26.11.08	2	5	3	5	5	10
26°	28.11.08	2	5	3	5	5	10
28°	01.12.08	2	5	3	5	5	10
35°	08.12.08	2	5	3	5	5	10
42°	15.12.08	3	5	3	5	6	10
49°	22.12.08	4	5	4	5	8	10
56°	29.12.08	5	5	5	5	10	10
64°		5	5	5	5	10	10
DF	05.01.09	Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1008 (controle)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	31.10.08	5	5	5	5	10	10
01°	03.11.08	1	5	1	5	2	10
03°	05.11.08	1	5	1	5	2	10
05°	07.11.08	1	5	2	5	3	10
07°	10.11.08	1	5	2	5	3	10
10°	12.11.08	2	5	2	5	4	10
12°	14.11.08	2	5	2	5	4	10
14°	17.11.08	2	5	2	5	4	10
17°	19.11.08	2	5	2	5	4	10
19°	21.11.08	2	5	3	5	5	10
21°	24.11.08	2	5	3	5	5	10
24°	26.11.08	2	5	4	5	6	10
26°	28.11.08	2	5	4	5	6	10
28°	01.12.08	2	5	4	5	6	10
35°	08.12.08	3	5	4	5	7	10
42°	15.12.08	4	5	4	5	8	10
49°	22.12.08	4	5	4	5	8	10
56°	29.12.08	5	5	4	5	9	10
64°		5	5	4	5	9	10
DF	05.01.09	Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1009 (controle)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	07.11.08	5	5	5	5	10	10
01°	10.11.08	1	5	1	5	2	10
03°	12.11.08	1	5	1	5	2	10
05°	14.11.08	1	5	2	5	3	10
07°	17.11.08	1	5	2	5	3	10
10°	19.11.08	1	5	3	5	4	10
12°	21.11.08	1	5	3	5	4	10
14°	24.11.08	1	5	3	5	4	10
17°	26.11.08	1	5	3	5	4	10
19°	28.11.08	2	5	3	5	5	10
21°	1°.12.08	2	5	3	5	5	10
24°	03.12.08	2	5	3	5	5	10
26°	05.12.08	3	5	3	5	6	10
28°	08.12.08	4	5	3	5	7	10
35°	15.12.08	5	5	4	5	9	10
42°	22.12.08	5	5	4	5	9	10
49°	29.12.08	5	5	4	5	9	10
56°	05.01.09	5	5	4	5	9	10
64°	12.01.09	Remoção da peça para fixação					
DF							

Rato número: 1010 (controle)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	07.11.08	5	5	5	5	10	10
01°	10.11.08	1	5	1	5	2	10
03°	12.11.08	1	5	1	5	2	10
05°	14.11.08	1	5	2	5	3	10
07°	17.11.08	1	5	3	5	4	10
10°	19.11.08	1	5	3	5	4	10
12°	21.11.08	1	5	3	5	4	10
14°	24.11.08	1	5	3	5	4	10
17°	26.11.08	1	5	3	5	4	10
19°	28.11.08	2	5	3	5	5	10
21°	1°.12.08	2	5	3	5	5	10
24°	03.12.08	2	5	3	5	5	10
26°	05.12.08	2	5	3	5	5	10
28°	08.12.08	2	5	3	5	5	10
35°	15.12.08	3	5	3	5	6	10
42°	22.12.08	3	5	4	5	7	10
49°	29.12.08	3	5	5	5	8	10
56°	05.01.09	3	5	5	5	8	10
64°	12.01.09	5	5	5	5	10	10
DF		Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1011 (controle)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	14.11.08	5	5	5	5	10	10
01°	17.11.08	1	5	1	5	2	10
03°	19.11.08	2	5	2	5	4	10
05°	21.11.08	2	5	3	5	5	10
07°	24.11.08	2	5	3	5	5	10
10°	26.11.08	3	5	4	5	7	10
12°	28.11.08	3	5	4	5	7	10
14°	01.12.08	3	5	4	5	7	10
17°	03.12.08	3	5	4	5	7	10
19°	05.12.08	3	5	4	5	7	10
21°	8.12.08	3	5	4	5	7	10
24°	10.12.08	3	5	4	5	7	10
26°	12.12.08	3	5	4	5	7	10
28°	15.12.08	3	5	4	5	7	10
35°	22.12.08	4	5	4	5	8	10
42°	29.12.08	5	5	4	5	9	10
49°	05.12.08	5	5	5	5	10	10
56°	12.01.09	5	5	5	5	10	10
64°	19.01.09	5	5	5	5	10	10
DF		Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1012 (controle)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	14.11.08	5	5	5	5	10	10
01°	17.11.08	1	5	3	5	4	10
03°	19.11.08	1	5	3	5	4	10
05°	21.11.08	1	5	3	5	4	10
07°	24.11.08	1	5	3	5	4	10
10°	26.11.08	1	5	4	5	5	10
12°	28.11.08	1	5	4	5	5	10
14°	01.12.08	1	5	4	5	5	10
17°	03.12.08	2	5	4	5	6	10
19°	05.12.08	2	5	4	5	6	10
21°	8.12.08	3	5	4	5	7	10
24°	10.12.08	3	5	4	5	7	10
26°	12.12.08	3	5	4	5	7	10
28°	15.12.08	4	5	4	5	8	10
35°	22.12.08	4	5	4	5	8	10
42°	29.12.08	5	5	5	5	10	10
49°	05.12.08	5	5	5	5	10	10
56°	12.01.09	5	5	5	5	10	10
64°	19.01.09	5	5	5	5	10	10
DF		Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1013 (caso)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	27-11-08	5	5	5	5	10	10
01°	28-11-08	1	5	2	5	3	10
03°	01-12-08	1	5	2	5	3	10
05°	03-11-08	1	5	2	5	3	10
07°	05-12-08	1	5	2	5	3	10
10°	08-12-08	1	5	2	5	3	10
12°	10-12-08	1	5	2	5	3	10
14°	12-12-08	1	5	3	5	4	10
17°	15-12-8	1	5	3	5	4	10
19°	17-12-08	2	5	3	5	5	10
21°	19-12-08	2	5	3	5	5	10
24°	22-12-08	2	5	4	5	6	10
26°	24-12-09	2	5	4	5	6	10
28°	26-12-08	3	5	4	5	7	10
35°	02-01-09	3	5	4	5	7	10
42°	09-01-09	4	5	4	5	8	10
49°	16-01-09	5	5	5	5	10	10
56°	23-01-09	5	5	5	5	10	10
64°	30-01-09	5	5	5	5	10	10
DF		Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1014 (caso)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	27-11-08	5	5	5	5	10	10
01°	28-11-08	1	5	2	5	3	10
03°	01-12-08	1	5	2	5	3	10
05°	03-11-08	1	5	2	5	3	10
07°	05-12-08	1	5	2	5	3	10
10°	08-12-08	1	5	3	5	4	10
12°	10-12-08	1	5	3	5	4	10
14°	12-12-08	2	5	3	5	5	10
17°	15-12-8	2	5	3	5	5	10
19°	17-12-08	3	5	3	5	6	10
21°	19-12-08	3	5	3	5	6	10
24°	22-12-08	3	5	3	5	6	10
26°	24-12-09	3	5	3	5	6	10
28°	26-12-08	3	5	3	5	6	10
35°	02-01-09	4	5	4	5	8	10
42°	09-01-09	4	5	5	5	9	10
49°	16-01-09	5	5	5	5	10	10
56°	23-01-09	5	5	5	5	10	10
64°	30-01-09	5	5	5	5	10	10
DF		Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1015 (caso)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	27-11-08	5	5	5	5	10	10
01°	28-11-08	1	5	1	5	2	10
03°	01-12-08	1	5	1	5	2	10
05°	03-11-08	1	5	1	5	2	10
07°	05-12-08	1	5	1	5	2	10
10°	08-12-08	2	5	1	5	3	10
12°	10-12-08	2	5	2	5	4	10
14°	12-12-08	2	5	3	5	5	10
17°	15-12-8	2	5	3	5	5	10
19°	17-12-08	2	5	3	5	5	10
21°	19-12-08	3	5	3	5	6	10
24°	22-12-08	3	5	3	5	6	10
26°	24-12-09	3	5	3	5	6	10
28°	26-12-08	3	5	3	5	6	10
35°	02-01-09	4	5	4	5	8	10
42°	09-01-09	4	5	5	5	9	10
49°	16-01-09	5	5	5	5	10	10
56°	23-01-09	5	5	5	5	10	10
64°	30-01-09	5	5	5	5	10	10
DF		Remoção da peça para fixação					

Rato número: 1016 (caso)

Dia	Data	Vibrissas		Olhos		Soma	
		DIR	ESQ	DIR	ESQ	DIR	ESQ
DI	27-11-08	5	5	5	5	10	10
01°	28-11-08	1	5	3	5	4	10
03°	01-12-08	1	5	3	5	4	10
05°	03-11-08	1	5	3	5	4	10
07°	05-12-08	1	5	3	5	4	10
10°	08-12-08	2	5	3	5	5	10
12°	10-12-08	2	5	3	5	5	10
14°	12-12-08	3	5	3	5	6	10
17°	15-12-8	3	5	3	5	6	10
19°	17-12-08	3	5	3	5	6	10
21°	19-12-08	3	5	3	5	6	10
24°	22-12-08	3	5	4	5	7	10
26°	24-12-09	3	5	4	5	7	10
28°	26-12-08	3	5	4	5	7	10
35°	02-01-09	3	5	4	5	7	10
42°	09-01-09	3	5	5	5	8	10
49°	16-01-09	3	5	5	5	8	10
56°	23-01-09	3	5	5	5	8	10
64°	30-01-09	3	5	5	5	8	10
DF		Remoção da peça para fixação					

APÊNDICE B - Artigo Original

Esta é um versão gerada unicamente para visualização dentro do SGP.
 A versão a ser impressa utilizará outros padrões de formatação.
 This is a version generated only for visualization inside of SGP.
 The version to be printed will use other formatting patterns.

Artigo Original

Código de Fluxo: 6245

CÉLULAS MONONUCLEARES NA REGENERAÇÃO DO VII PAR CRANIANO: ESTUDO EXPERIMENTAL

MONONUCLEAR CELLS IN VII CRANIAL NERVE REGENERATION: EXPERIMENTAL STUDY

Autores (Authors)

Diogo Marilio Martins: Especialista - Médico colaborador do Serviço de Otorrinolaringologia da PUCRS

Marcos Ricardo Jaeger: Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS - Médico contratado do Hospital São Lucas da PUCRS

Jefferson Luis Braga da Silva: Professor Livre-Docente em Cirurgia UNIFESP - Professor adjunto do Departamento de Cirurgia da Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul, PUCRS

Descritores (Palavras-chave)

Paralisia Facial; Nervo Facial; Regeneração Nervosa; Recuperação de Função Fisiológica

Keywords

Facial Paralysis; Facial Nerve; Nerve Regeneration; Recovery of Function

Resumo

Introdução: A paralisia facial periférica traz impacto significativo na vida dos pacientes. Anastomoses término-terminais são viáveis em poucos casos. As células-tronco têm mostrado bons resultados na regeneração de nervos periféricos. O trabalho tem como objetivo estudar as células mononucleares na recuperação funcional do VII par craniano. **Material e Método:** Dezesesseis ratos Wistar foram divididos em dois grupos. Foram ressecados quatro milímetros do tronco do nervo facial e, então, interposto um tubo de silicone, preenchido com células mononucleares (grupo 1) e com veículo (grupo 2). Foram avaliados por testes funcionais: observação do movimento das vibrissas e do fechamento ocular durante 64 dias. O nível de significância foi 5%. **Forma de Estudo:** Estudo experimental, controlado, cegado e randomizado. **Resultados:** O DELTA para o somatório vibrissas-olhos foi -0,50 no grupo 1 e -1,50 no grupo 2, mostrando uma recuperação funcional satisfatória em ambos os grupos. O grupo que utilizou as células mononucleares apresentou recuperação funcional mais precoce no fechamento ocular entre a segunda e terceira semanas. **Conclusões:** Os dois grupos obtiveram recuperação da mímica facial no teste funcional após a lesão aguda do VII par craniano no período de 64 dias, com uma recuperação mais precoce do fechamento ocular com as células mononucleares.

Abstract

Introduction: Peripheral facial paralysis has significant impact on patient's life. End-to-end anastomosis is possible in very few cases. The stem cells have shown good results in peripheral nerves regeneration. This paper aims to study the mononuclear cells in functional recovery of the VII cranial nerve. **Material and Methods:** Sixteen Wistar rats were divided into two groups. It was resected four millimeters of facial nerve trunk and then interposed a silicone tube, filled with mononuclear cells (group 1) and vehicle (group 2). Rats were evaluated by functional tests: observation of vibrissae movement and eye closure for 64 days. The significance level was 5%. **Study Design:** Experimental, controlled, randomized and blind study. **Results:** The vibrissae-eyes sum DELTA was -0.50 for group 1 and -1.50 for group 2, showing a functional recovery in both groups. The eye closure was an early improvement in mononuclear cells group, evidenced by the median between the second and third weeks. **Conclusions:** Both groups had recovery of facial movements in functional tests after acute injury of the facial nerve in the period of 64 days. The mononuclear cells group had an early improvement in the eye closure test.

Trabalho submetido em (Article's submission in): 9/2/2009 12:57:38

Instituição (Affiliation): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Correspondência (Correspondence): Av. Ganzo, 664/201 Menino Deus, Porto Alegre/RS CEP-90150-070

Suporte Financeiro (Financial support): CAPES

Submetido para (Submitted for): Revista Brasileira de Otorrinolaringologia

Artigo numerado no SGP sob código de fluxo (The Article was numbered in SGP for the flux code): 6245

INTRODUÇÃO

A paralisia facial periférica é uma entidade comum em consultórios e emergências,¹⁻⁵ sendo que a recuperação funcional do nervo facial permanece pobre e a síndrome pós-paralítica ainda é inevitável em grande parte dos casos, envolvendo paresias, sincinesias e disreflexias com consideráveis seqüelas para os pacientes.⁶

Na avaliação da paralisia facial periférica é fundamental estabelecer parâmetros para o grau de comprometimento da atividade motora.⁷ Vários autores desenvolveram sistemas classificatórios, porém não existe um método internacionalmente aceito, sendo as classificações de Sunderland⁸ e a de House-Brackmann⁹ as mais utilizadas.

A natureza da lesão, o tempo de evolução e fatores individuais são fatores que implicam na regeneração nervosa. Anastomoses término-terminais imediatas produzem resultados satisfatórios, porém são possíveis em apenas 6% das lesões transfixantes do tronco do nervo e em 12% das lesões dos ramos.¹⁰⁻¹³

A inervação da musculatura facial de ratos é semelhante a dos humanos e também de fácil acesso, podendo ser um parâmetro adequado para avaliar as lesões e recuperação do nervo facial. Existem diversas graduações, como tentativa de padronizar a observação da mímica facial do rato.¹⁴⁻¹⁵ Alguns estudos utilizam além de simples tabelas, sistemas com sensores fotoelétricos, mecanismos pneumáticos e gravadores para objetivar ainda mais as avaliações.¹⁶

As células mononucleares (CMN) da medula óssea apresentam alta capacidade de diferenciação em uma ampla gama de células.¹⁷⁻²⁰ Alguns estudos sugerem que a utilização destas células em modelos experimentais permite uma melhora significativa na regeneração de nervos periféricos,²¹⁻²³ porém em pares cranianos, isto não está bem estabelecido.

Vários modelos animais são utilizados para estudar as paralisias faciais periféricas,

porém o rato Wistar é bastante utilizado,^{14-15,24-27} que a anatomia extratemporal do nervo facial deste animal está bem descrita na literatura e o seu acesso via retroauricular é de fácil execução.^{26,28} Também existem estudos padronizando a avaliação do movimento das vibrissas e do fechamento ocular.¹⁴⁻¹⁵

O objetivo deste trabalho é estudar a recuperação funcional do nervo facial após lesão aguda com reparação imediata utilizando CMN em um modelo experimental.

MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de um estudo experimental, controlado, cegado e randomizado. Foram utilizados 18 ratos albinos da linhagem Wistar, isogênicos, pesando entre 250 e 300 gramas, adquiridos no biotério do Laboratório de Microcirurgia de nossa Instituição, os quais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambientes climatizados, com ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo água e comida *ad libitum*. Os animais foram manipulados em ambiente silencioso e adequado.

Dos 18 animais, dois foram utilizados para a obtenção das CMN da medula óssea. Os demais animais foram divididos em dois grupos de comparação, contendo oito animais cada grupo.

Após o sacrifício dos dois animais, foi removida a medula óssea dos fêmures, tíbias e úmeros por lavagem com solução salina 0,9%. As células obtidas da medula óssea foram diluídas em meio RPMI 1640 (1:1) (Gibco®, EUA), que foram fracionadas em um gradiente de densidade gerado por centrifugação sobre Histopaque® na densidade de 1,077g/L (Sigma-Aldrich®, EUA) a 400g durante 30 minutos a 25°C. A fração mononuclear situada sobre a interface com o Histopaque® (Figura 1) foi coletada e lavada duas vezes com solução salina 0,9% estéril. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com Trypan Blue Stain 0,4% (Gibco, EUA). Após verificada viabilidade de 99,9%, as células foram adicionadas ao meio gelificado de HPMC 3% numa concentração de 1×10^6 células por 50 micro litros.

<!--[if !vml]-->

Figura 1 - Fração mononuclear sobre a interface de Histopaque®

Os animais foram submetidos à anestesia geral, após período de 8 horas de jejum

prévio, com clorpromazina (0,2ml/kg) e quetamina 10% (0,8ml/kg) intraperitoneal. A seguir foi realizada tricotomia da região retroauricular no lado a ser operado. O procedimento foi realizado por um único cirurgião, com a utilização de Microscópio Óptico DF Vasconcelos com lente de 200 milímetros e aumento de 6 a 16 vezes. Os procedimentos foram documentados por fotografia com câmera digital Nikon Coolpix S51.

Realizou-se uma incisão retroauricular com extensão anterior e dissecação por planos. O músculo platíma foi identificado e seccionado, expondo a glândula parótida e os ramos zigomático, bucal e mandibular do nervo facial, os quais foram seguidos em sentido proximal até a identificação da veia jugular externa, a qual foi ligada, permitindo a visualização completa do tronco do nervo facial e seu limite proximal no forâmen estilo-mastoideo (Figura 2). O tronco do nervo facial foi seccionado com micro-tesoura próximo ao forâmen estilo-mastoideo (Figura 3). Após foi realizado os procedimentos de acordo com os dois grupos. Grupo 1 (CMN): secção do nervo facial unilateral com ressecção parcial do tronco do nervo, produzindo um defeito de quatro milímetros e interposição de tubo de silicone da espessura do nervo (sonda de aspiração traqueal número 4) com sutura proximal e distal com fio mononylon 8-0 entre o tubo e o epineuro (Figura 4 e 5) e, antes do término da sutura, o tubo foi preenchido com o preparado de CMN; Grupo 2 (controle): mesmo procedimento e preenchimento do tubo com o veículo gelificado de hidroxil-propil-metil celulose (HPMC) a 3%. A pele foi suturada com mononylon 4-0.

Os animais foram submetidos a teste funcional, análise comportamental, previamente ao procedimento e após em dias alternados durante trinta dias e semanalmente por mais trinta dias, totalizando sessenta e quatro dias de seguimento. Esta análise foi feita por gravação em câmera digital Nikon Coolpix S51. As gravações foram avaliadas por um examinador cegado quanto ao grupo do animal. Sessenta e quatro dias após os procedimentos, os ratos foram anestesiados novamente para remoção do nervo facial, o qual foi levado para estudo histológico com a confecção de cortes semifinos de 10 micrômetros e coloração com hematoxilina-eosina (HE) e os ratos foram disponibilizados para outros procedimentos no Laboratório.

Nos dias destinados ao teste funcional, os animais foram observados quanto à mímica facial espontânea durante o movimento típico do rato ao explorar o ambiente e sob estímulo de insuflação de ar na face do animal para desencadear o reflexo do piscamento e o bater de palmas para gerar maior movimentação das vibrissas. Os

parâmetros observados foram: a movimentação e a posição das vibrissas, o fechamento da rima ocular e o reflexo de piscamento, conforme os quadros 1 e 2.¹⁴⁻¹⁵ Para tanto, cada rato foi avaliado individualmente em uma caixa de isopor (60x36x30cm) com a face interna pintada na cor preta. O lado não operado serviu como controle (reflexo de piscamento presente com fechamento ocular completo; movimentação das vibrissas presente e posicionamento anterior das mesmas).

Escore	Movimento e Posição
1	Sem movimento
2	Tremor leve com posicionamento posteriorizado e amplitude e freqüência inferior ao lado contralateral.
3	Tremor maior com posicionamento posteriorizado e amplitude e freqüência inferior ao lado contralateral.
4	Movimentação efetiva com posicionamento posteriorizado e amplitude e freqüência inferior ao lado contralateral.
5	Movimentação efetiva, com posicionamento, amplitude e freqüência semelhantes ao contralateral.

Quadro 1 - Escala de pontuação para movimento das vibrissas

Fonte: Adaptado de Borin A et al.¹⁴ e de Faria SD et al.¹⁵

Escore	Movimento
1	Sem movimento perceptível
2	Contração, mas sem fechamento perceptível (até 25%)
3	Fechamento de 25% até 50%

4	Fechamento de 50% até 75%
5	Fechamento de 75% até 100%
Quadro 2 - Escala de pontuação para fechamento da rima ocular	
Fonte: Adaptado de Borin A et al. ¹⁴ e de Faria SD et al. ¹⁵	

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCRS, registro 07/04020. Os protocolos experimentais utilizados seguiram a lei número 11.794 de 8 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.²⁹ Todos os procedimentos foram realizados tomando os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados e o seu sofrimento.

O tamanho de amostra foi calculado em sete animais por grupo, mantendo-se um poder estatístico de 90% e nível de significância de 5%. Todos os escores foram descritos por mediana e a comparação dos grupos ponto a ponto avaliada pelo teste *U de Mann-Whitney*.

Para consideração do efeito global ao longo do período usamos a abordagem da área sob a curva (AUC: area under the curve). Adicionalmente, para avaliar o processo de recuperação funcional, utilizamos a abordagem do DELTA (valor final - valor inicial). O nível de significância adotado foi de $\alpha=0,05$ e a análise dos dados foi realizada por meio do programa SPSS versão 11.5.

RESULTADOS

Todos os ratos dos dois grupos apresentavam os movimentos das vibrissas e fechamento ocular sem alterações antes dos procedimentos, ou seja, o somatório vibrissas-olhos igual a 10. Nenhum rato que entrou no estudo foi perdido, de maneira que todos chegaram vivos ao último dia do estudo (D64). Todos os ratos foram avaliados no dia inicial (D00), D01, D03, D05, D07, D10, D12, D14, D17, D19, D21, D24, D26, D28, D35, D42, D49, D56 e D64.

Foi realizada a mediana do escore obtido por cada rato para movimento das vibrissas, fechamento da rima ocular e somatório vibrissas-olhos. Ao final do estudo, no

sexagésimo quarto dia, no critério movimento das vibrissas, a mediana dos escores do grupo 1 foi 5,00 contra 4,50 do grupo 2 ($p=0,544$); no parâmetro fechamento ocular, a mediana dos escores do grupo 1 foi 4,50 contra 4,50 do grupo 2 ($p=0,814$); e no somatório vibrissas-olhos o escore foi 9,50 para grupo 1 e 8,50 pontos para grupo 2 ($p=0,581$).

A tabela 1 mostra a mediana obtida por cada grupo nos critérios movimentação de vibrissas, no qual não se evidencia diferença estatisticamente significativa entre os grupos; fechamento ocular, de forma que houve diferença dos dias 14 a 21 em favor do grupo 1 (CMN), com medianas dos escores de 3,50 para o grupo 1 e 3,00 para o grupo 2 com $p=0,04$ no décimo quarto dia e medianas dos escores de 3,50 para o grupo 1 e 3,00 para o grupo 2 com $p=0,01$ no vigésimo primeiro dia.

Tabela 1 - Valores das medianas por dias, DELTA^a e AUC^b dos escores de movimentação das vibrissas, fechamento da rima ocular e somatório vibrissas-olhos

	Vibrissas			Olhos			Somatório		
	Grupo1	Grupo2	p ^c	Grupo1	Grupo2	p ^c	Grupo1	Grupo2	p ^c
D00	5,00	5,00	1,00	5,00	5,00	1,00	10,00	10,00	1,00
D01	1,00	1,00	0,32	1,00	2,00	0,58	3,00	3,00	0,58
D03	1,00	1,00	0,14	1,50	2,00	0,83	3,25	3,00	0,91
D05	1,00	1,00	0,14	2,50	2,00	0,26	3,75	3,00	0,22
D07	1,00	1,00	0,14	3,00	2,00	0,15	4,00	3,00	0,12
D10	1,00	1,00	0,64	3,00	2,00	0,09	4,00	3,00	0,18
D12	1,00	1,00	0,52	3,00	2,00	0,05	4,50	3,50	0,06
D14	1,00	1,00	1,00	3,50	3,00	0,04	5,00	4,00	0,19

D17	1,50	2,00	0,53	3,50	3,00	0,04	5,00	4,50	0,41
D19	2,00	2,00	0,27	3,50	3,00	0,01	5,00	5,00	0,40
D21	2,00	2,50	0,31	3,50	3,00	0,01	5,00	5,00	0,56
D24	2,00	2,50	0,42	4,00	3,00	0,08	5,50	5,50	0,51
D26	2,00	2,50	0,48	4,00	3,00	0,08	6,00	5,50	0,44
D28	2,00	3,00	0,49	4,00	3,00	0,26	6,00	6,00	0,66
D35	3,00	3,00	0,91	4,00	4,00	0,52	6,50	6,50	0,59
D42	3,50	3,00	0,55	4,00	4,00	0,96	7,50	7,50	0,52
D49	4,00	3,00	1,00	4,00	4,50	0,91	8,00	7,50	0,79
D56	5,00	4,00	0,78	4,50	4,50	0,81	9,00	8,00	0,78
D64	5,00	4,50	0,54	4,50	4,50	0,81	9,50	8,50	0,58
DELTA^a	0,00	-0,50	0,54	-0,50	-0,50	0,81	-0,50	-1,50	0,58
AUC^b	176,50	164,75	0,75	229,25	221,75	0,29	382,25	396,25	0,43

a - DELTA: diferença entre valor final menos valor inicial

b - AUC: área sob a curva

c - P: significância estatística (Teste *U de Mann-Whitney*)

Na tabela 1, também se evidencia as medianas de cada grupo para o somatório vibrissas-olhos, na qual a diferença apresentada no quesito fechamento da rima ocular não se repete.

A diferença entre os valores finais menos os valores iniciais é observado no parâmetro DELTA, também explícito na tabela 1, mostrando que ambos os grupos, CMN e controle, obtiveram uma recuperação funcional satisfatória, praticamente retornando as medianas dos valores iniciais, de forma que o DELTA para somatório vibrissas-olhos foi de -0,50 para o grupo 1 e -1,50 para o grupo 2, não mostrando diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,58$). A área sob a curva (AUC), observada na tabela 1, evidencia o efeito global dos tratamentos. Este critério também não foi estatisticamente significativo.

Para melhor visualização da característica da recuperação funcional de cada grupo foram criados os gráficos 1, 2 e 3 que correspondem ao movimento das vibrissas, fechamento da rima ocular e somatório vibrissas-olhos, respectivamente. Os gráficos mostram uma melhora em todos os critérios no decorrer dos 64 dias de estudo, mostrando uma superioridade do grupo que utilizou as CMN em praticamente todos os dias em que foi realizado o teste funcional, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa.

<!--[if !vml]-->

Gráfico 1 - Medianas do escore movimento das vibrissas em relação ao tempo de observação

<!--[if !vml]-->

Gráfico 2 - Medianas do escore fechamento da rima ocular em relação ao tempo de observação

<!--[if !vml]-->

Gráfico 3 - Medianas do escore somatório vibrissas-olhos em relação ao tempo de observação

A figura 6 mostra a estrutura histológica de um nervo normal do lado contralateral à lesão do facial do rato 2 do grupo controle, na qual se evidencia arquitetura normal das fibras nervosas, enquanto o crescimento de novas fibras nervosas em meio a tecido intersticial e neovascularização intensa é evidenciado na figura 7 que corresponde a um nervo regenerado após 64 dias de procedimento realizado no rato 3 do grupo controle.

<!--[if !vml]-->

Figura 6 - Nervo normal coloração hematoxilina-eosina com 50 aumentos

<!--[if !vml]-->

Figura 7 - Nervo regenerado após 64 dias, coloração hematoxilina-eosina com 100 aumentos

DISCUSSÃO

Optamos por trabalhar com o rato da espécie Wistar, por ser um modelo utilizado em outros estudos do nervo facial,^{14-15,24-27} por haver uma padronização das técnicas de secção e avaliação da mímica facial neste modelo.¹⁴⁻¹⁵ Além disso, o modelo é de fácil obtenção junto ao biotério de nossa Instituição, com rotinas de manipulação, anestesia e cuidados bem estabelecidos. A anatomia extratemporal do nervo facial do rato já está bem descrita na literatura,^{26,28} sendo que seu tronco é fácil e constantemente acessado por via retroauricular e não sofre influencia quanto ao peso do animal.³⁰

Quanto ao tipo de lesão neural, escolhemos a secção completa com ressecção de parte do nervo, por tratar-se de uma lesão reprodutível, com a intenção de gerar uma paralisia grau V na classificação de Sunderland em todos os procedimentos.^{24,30} Na reparação utilizamos sutura epineural com interposição de tubo de silicone, pois já foi descrita em estudos com nervos periféricos.³¹

A objetividade no modelo experimental de paralisia facial periférica é a característica básica para o estudo da regeneração do nervo facial, porém não pode faltar praticidade, eficácia e reprodutibilidade ao sistema de avaliação da mímica facial. Sistemas muito sofisticados como o utilizado por Heaton¹⁶ são muito precisos, mas são de difícil acesso, caros e impraticáveis no nosso meio. Por isto utilizamos um sistema adaptado,¹⁴⁻¹⁵ com maior facilidade na execução, todavia com algumas restrições, tais como dificuldade para observação da movimentação da musculatura do rato em seu habitat. Também observamos problema na reprodutibilidade dos achados entre observadores diferentes na classificação do grau de recuperação dos movimentos dos ratos, o que não foi o motivo do presente estudo.

Realizamos o teste funcional ao invés de testes eletrofisiológicos,³² que avaliam muito

bem a condução nervosa, tendo em vista que frequentemente a melhora nestes parâmetros não acompanha a evolução clínica. Porém sabemos que a classificação adaptada, conforme descrita pelos próprios autores,¹⁴⁻¹⁵ apresenta um inegável e significativo grau de subjetividade.

Após o procedimento que gera a paralisia, evidenciamos um desvio da comissura nasal para o lado contralateral ao paralisado em 100% dos ratos estudados, principalmente associado ao ato do rato explorar o ambiente. Este dado não foi relacionado como resultado porque a classificação utilizada não previa esta alteração e não encontramos nenhum estudo na literatura fazendo referência a tal achado, de maneira que não conseguimos padronizar a análise da recuperação deste fenômeno.

A inexistência de diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados pode estar relacionada ao tamanho amostral, o qual foi estabelecido esperando-se uma diferença de grande magnitude, de no mínimo dois desvios-padrão. Da mesma forma, não encontramos na literatura estudada nenhuma referência ao tamanho da lesão crítica do nervo facial, nem em humanos quanto menos em ratos. Sabemos, por estudos posteriores, que a lesão crítica para o nervo ciático em ratos é de dez milímetros,¹⁷ porém este tamanho de lesão para um nervo com média de seis milímetros de tronco, como é o caso do nervo em estudo, é impraticável. Realizamos a ressecção de quatro milímetros do tronco do nervo, o que foi possível em 100% dos animais, todavia em nenhum rato haveria a possibilidade de uma ressecção maior.

Os ratos do grupo 2 (controle) apresentaram uma boa recuperação da funcionalidade do nervo facial, ao menos no que diz respeito aos parâmetros estudados, sendo que, no critério somatório vibrissas-olhos, a diferença entre os valores das medianas finais e iniciais foi de 1,5 (DELTA = -1,50), de maneira que ficou difícil para averiguar uma diferença acentuada dos ratos do grupo 1 (CMN), já que as medianas finais foram muito próximas às iniciais mesmo no grupo controle. Apesar disto, houve uma discreta superioridade na recuperação funcional dos ratos do grupo 1 durante os sessenta e quatro dias de seguimento.

Como em outros estudos,^{14,33} o parâmetro fechamento ocular parece ser o mais precocemente recuperado, atingindo uma boa melhora funcional já no primeiro mês após o dano e reparo. Ainda este critério foi o único a revelar uma diferença estatisticamente significativa, porém somente entre a segunda e terceira semanas em favor do grupo tratado com CMN.

Em suma, achamos que a lesão criada, no modelo experimental adotado, deixa pouca margem para revelação de diferenças significativas entre os grupos, pois mesmo nos ratos controles a recuperação funcional, por meio dos testes funcionais aplicados, foi satisfatória.

CONCLUSÃO

Os dois grupos, CMN e controle, obtiveram recuperação da mímica facial no teste funcional após a lesão aguda do VII par craniano no período de 64 dias.

O grupo que utilizou as CMN apresentou recuperação funcional mais precoce no critério fechamento da rima ocular entre a segunda e terceira semanas.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo de CMN em relação à recuperação funcional, por meio da análise da movimentação e posição das vibrissas, do fechamento da rima ocular e reflexo de piscamento e do somatório vibrissas-olhos no período do estudo.

Houve uma melhora progressiva dos parâmetros relacionados à mímica facial durante os sessenta e quatro dias de seguimento dos ratos envolvidos no estudo, tanto no grupo controle como no grupo de CMN, com uma discreta e não significativa superioridade do grupo das CMN.

REFERÊNCIAS

1. Bento RF, Miniti A. Comparison between fibrin tissue adhesive, epineural suture and natural union in the intratemporal facial nerve of cats. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1989;465:1-36.
2. Khomura E, Yuguchi T, Yoshimine T, Fujinaka T, Koseki N, Sano A et al. BDNF atelocollagen mini-pellet accelerates facial nerve regeneration. *Brain Res.* 1999;849:235-8.
3. Choi D, Dunn LT. Facial nerve repair and regeneration: an overview of basic principles for neurosurgeons. *Acta Neurochir (Wien).* 2001;143:107-14.
4. Lazarini PR, Mitre EI, Szajubok A. Paralisia facial periférica. In: Campos CAH, Costa

HOO. Tratado de Otorrinolaringologia. São Paulo: Roca; 2003. 395-424.

5. Bento RF, Brito RV. Tratamento das paralisias faciais - presente e futuro. In: Lavinsky L. Tratamento em Otologia. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. 709-738.

6. Vaughan ED, Richardson D. Facial nerve reconstruction following ablative parotid surgery. Br J Oral Maxillofac Surg. 1993;31:274-80.

7. Lazarini PR, Mitre EI, Takatu E, Tidei R. Graphic-visual adaptation of House-Brackmann facial nerve grading for peripheral facial palsy. Clin Otolaryngol. 2006;31:192-7.

8. Selesnick SH, Patwardhan A. Acute facial paralysis: evaluation and early management. Am J Otolaryngol. 15;1994:387-408.

9. House JW, Brackmann DE. Facial nerve grading system. Otolaryngol Head Neck Surg. 1985;93:146-147.

10. Spector GJ. Neural repair in facial paralysis: clinical and experimental studies. Eur Arch Otorrhinolaryngol. 1997;254:S68-S75.

11. Spector GJ. Mimetic surgery for the paralyzed face. Laryngoscope. 1985;95:1494-522.

12. Spector GJ, Lee P, Peterein J, Roufa D. Facial nerve regeneration through autologous nerve grafts: a clinical and experimental study. Laryngoscope. 1991;101:537-54.

13. Pinna BR, Testa JRG, Fukuda Y. Estudo de paralisias faciais traumáticas: análise de casos clínicos e cirúrgicos. Rev Bras Otorrinolaringol. 2004;70:479-82.

14. Borin A, Toledo RN, Faria SD, Testa JR, Cruz OL. Behavioral and histologic experimental model of facial nerve regeneration in rats. Braz J Otorrhinolaryngol. 2006;72:775-84.

15. de Faria SD, Testa JR, Borin A, Toledo RN. Standardization of techniques used in facial nerve section and facial movement evaluation in rats. Braz J Otorrhinolaryngol. 2006;72:341-7.

16. Heaton JT, Kowaleski JM, Bermejo R, Zeigler HP, Ahlgren DJ, Hadlock TA. A system for studying facial nerve function in rats through simultaneous bilateral monitoring of eyelid and whisker movements. *J Neurosci Methods*. 2008;171:197-206.
17. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells. the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*. 2006;169:338-46.
18. Huss R. Isolation of primary and immortalized CD34 hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem Cells*. 2000;18:1-9.
19. Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M et al. Comparison of mononuclear and mesenchymal stem cell transplantation in myocardium infarction. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2005;20:270-8.
20. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355:1199-209.
21. Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y et al. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res*. 2003;974:17-24.
22. Tohil M, Terenghi G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem*. 2004;40:17-24.
23. Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Periphe Nerv Syst*. 2003;8:236-50.
24. Guntinas-Linchius O, Streppel M, Angelov DN, Stennert E, Neiss WF. Effect of delayed facial-facial suture on facial nerve regeneration: a horseradish peroxidase tracing study in the rat. *Acta Otolaryngol*. 1997;117:670-4.
25. Jergovic D, Stal P, Lindman D, Lindvall B, Hildebrand C. Changes in a rat facial nerve after facial nerve injury and repair. *Muscle Nerve*. 2001;24:1202-12.
26. Mattox DE, Felix H. Surgical anatomy of the rat facial nerve. *Am J Otol*. 1987;8:43-7.

27. Guntinas-Linchius O, Effenberger K, Angelov DN, Klein J, Streppel M, Stennert E et al. Delayed rat facial nerve repair leads to accelerated and enhanced muscle reinnervation with reduced collateral axonal sprouting during a definitive denervation period using a cross-anastomosis paradigm. *Exp Neurol* 2000;162:98-111.
28. Greene EC. Nervous System. In: Green EC. *Anatomy of the rat*. New York: Hafner; 1995. p.115-75.
29. Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília - [capturado 2009 fev 05]. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccIVIL_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm.
30. Semba K, Egger MD. The facial "motor" nerve of the rat: control of vibrissal movement and examination of motor and sensory components. *J Comp Neurol*. 1986;247:144-58.
31. Chen YS, Wang-Bennet LT, Coker NJ. Facial nerve regeneration in the silicone chamber: influence of nerve growth factor. *Exp Neurol*. 1989;103:52-60.
32. Sandrini FA, Pereira-Júnior ED, Gay-Escoda C. Rabbit facial nerve anastomosis with fibrin glue: nerve conduction velocity evaluation. *Braz J Otorrhinolaryngol*. 2007;73:196-201.
33. Jones KJ. Recovery from facial paralysis following crush injury of the facial nerve in hamsters: differential effects of gender and androgen exposure. *Exp Neurol*. 1993;121:133-8.

Imagens enviadas pelo autor. (Images sent by the author)

Tronco do nervo facial com seus ramos zigomático, bucal e mandibular



Figura 2

Tronco do nervo facial seccionado próximo ao forâmen estilo-mastoideo



Figura 3

Sutura do tubo de silicone ao epineuro do coto proximal do tronco do nervo facial

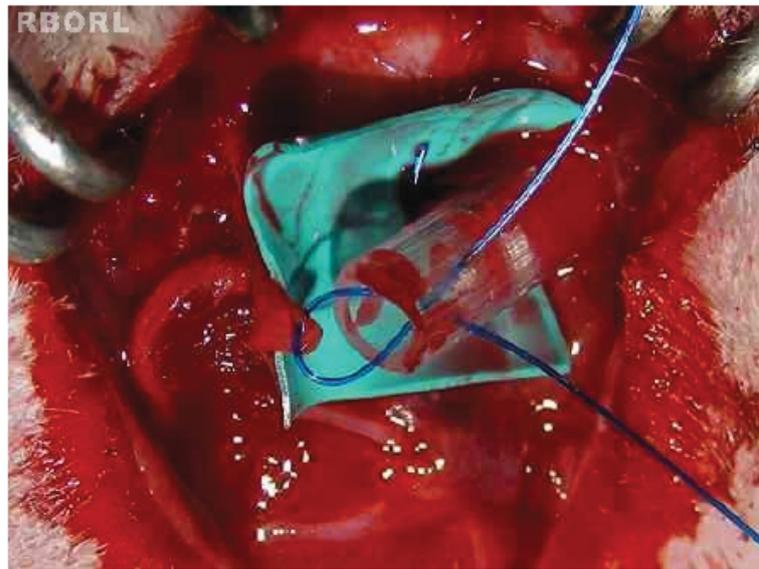


Figura 4

Interposição do tubo de silicone com ponto proximal e distal

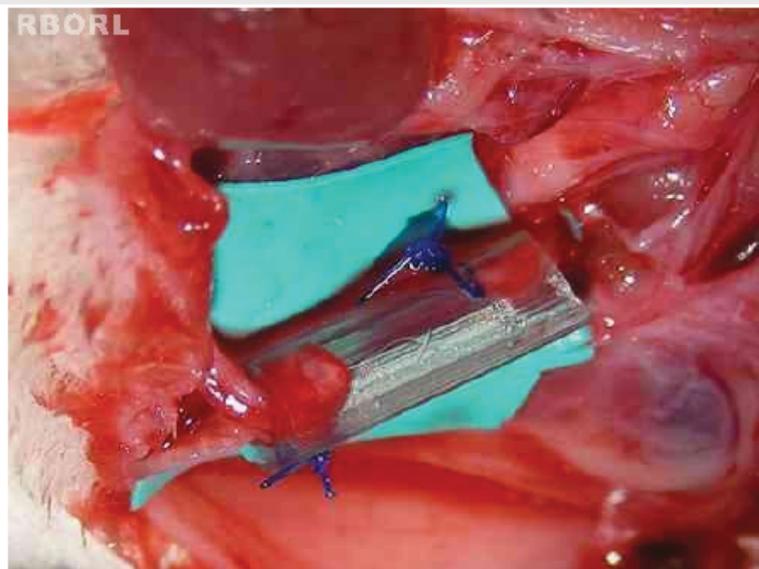


Figura 5

ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 1479/07-CEP

Porto Alegre, 06 de dezembro de 2007.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 07/04020, intitulado: **"Uso de células tronco mesenquimais na regeneração nervosa do VII par craniano: estudo experimental em ratos.**

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser entregues a este CEP.

Atenciosamente

Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Jefferson Luis Braga da Silva
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO B – Critérios e normas da Revista Brasileira de Otorrinolaringologia

CRITÉRIOS GERAIS PARA ELABORAÇÃO E ACEITAÇÃO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

O texto está dividido em duas partes: quanto ao formato e quanto ao conteúdo.

QUANTO AO FORMATO

Extensão e apresentação

O artigo completo não deve exceder 25 laudas de papel tamanho A4 (21 cm x 29,7 cm), escritas em letra Times New Roman de tamanho 12, espaço duplo entre linhas e com margens laterais, superior e inferior de 3 cm. Se o revisor considerar pertinente poderá sugerir ao autor a supressão de gráficos e tabelas ou mesmo condensação de texto.

Título e autores

Um bom título permite aos leitores identificar o tema e ajuda aos centros de documentação a catalogar e a classificar o material. O título deverá se limitar ao máximo de dez palavras e seu conteúdo deve descrever de forma concisa e clara o tema do artigo. O uso de títulos demasiado gerais, assim como de abreviaturas e siglas, deve ser evitado.

Devem ser citados como autores somente aqueles que participaram efetivamente do trabalho. Outras formas de citação podem vir ao final do artigo. Um trabalho com mais de 7 autores só deverá ser aceito se o tema for de abrangência multidisciplinar ou de ciências básicas.

Consideramos salutar que os responsáveis pelo artigo identifiquem a atuação de cada um dos autores na confecção do trabalho. Lembramos que podem e devem ser considerados autores aqueles que cumprem as seguintes tarefas:

1. Concebem e planejam o projeto, assim como analisam e interpretam os dados,
2. Organizam o texto ou revisam criticamente o conteúdo do manuscrito,
3. Dão suporte e aprovação final ao artigo a ser submetido.

Todos os três critérios devem ser atingidos para que o indivíduo possa ser considerado autor ou co-autor.

Critérios que não qualificam um indivíduo como autor são os seguintes:

1. Oferecer financiamento ou suporte de pesquisa,
2. Coletar dados para a pesquisa,
3. Dar supervisão geral a um grupo de pesquisa,

4. Ser chefe de serviço ou Titular de Departamento.

Se o indivíduo não se encaixar na figura de autor, mas tiver sua importância para o trabalho final, pode ser lembrado nos agradecimentos finais.

Resumo e palavras-chave (descritores)

Cada artigo DEVE ser acompanhado de um resumo em português e outro em inglês de cerca de 200 palavras, com seus tópicos devidamente salientados (estruturado), e indicando claramente:

- 1) as premissas teóricas e justificativas do estudo (introdução);
- 2) os objetivos do estudo (objetivo);
- 3) método básico utilizado (material e método);
- 4) desenho científico utilizado (estudo de caso, estudo de série, retrospectivo, prospectivo, clínico e experimental);
- 5) resultados principais e sua interpretação estatística (resultados) e
- 6) conclusões alcançadas (conclusão).

Não poderá ser incluída no resumo nenhuma informação não contida no texto. Deve ser escrito em voz impessoal e NÃO deve conter abreviaturas ou referências bibliográficas. O resumo deve ter a capacidade de ajudar o leitor a se decidir se há interesse em ler o artigo inteiro. Será, juntamente com o título, a única parte do texto que estará disponível na maior parte das bibliotecas e agências de catalogação e indexação, sendo, portanto, o cartão de visitas da pesquisa publicada.

Após o resumo devem estar descritos com três a cinco palavras, para fins de indexação, os descritores científicos baseados no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) e MeSH (Medical Subject Headings), que pode ser acessado na página eletrônica da BIREME (Biblioteca Regional de Medicina), www.bireme.org, ou em outro local do site da RBORL.

Corpo do artigo

Os trabalhos que expõem investigações ou estudos devem estar no chamado formato IMRDC: introdução, material e método, resultados, discussão e conclusões.

Na Introdução é onde estão o objetivo e a justificativa do trabalho. Nela devem estar presentes as razões e pertinência para a confecção do trabalho, sua importância e abrangência, lacunas, controvérsias e incoerências teóricas e as premissas teóricas ou experiências pessoais que levaram o autor a investigar o assunto.

No Material e Método espera-se encontrar a descrição da amostra estudada e um detalhamento suficiente do instrumento de investigação.

Nos estudos envolvendo seres humanos ou animais deve ser informado o número de protocolo de aprovação do estudo pela Comissão de Ética da instituição onde o mesmo foi realizado.

A amostra deve ser bem definida e os critérios de inclusão e exclusão descritos claramente. Também a maneira de seleção e alocação em grupos deve ser esclarecida (pareamento, sorteio, sequenciamento, estratificação, etc)

O método deve ter coerência com a questão apresentada e deve ser explicitado o desenho do estudo (coorte, caso-controle, experimental, contemporâneo, historio, estudo de prontuários, etc.)

Todo uso de método ou classificação alheia deverá ter correspondência com a literatura pertinente.

Os Resultados devem ser apresentados de forma sintética e clara. Tudo que conste deste item tem que ter sido extraído do método. O uso de gráficos e tabelas deve ser estimulado, assim como análises estatísticas descritivas e comparativas.

Na Discussão esperamos que o autor apresente sua experiência pessoal no assunto, explore seus referenciais teóricos e discuta os resultados frente a estas premissas. Também é este o local para expor possíveis dificuldades metodológicas.

As Conclusões devem ser sucintas e se ater ao objetivo proposto. É fundamental que o método e os resultados obtidos por ele sejam suficientes para fundamentar os itens arrolados na conclusão.

Os TRABALHOS DE REVISÃO e ATUALIZAÇÃO serão aceitos MEDIANTE CONVITE, devendo ter uma boa introdução com o formato seguindo as necessidades do trabalho, assim como apresentar a sistemática de levantamento utilizada. Não deve ter caráter opinativo, reservando esta tarefa para os comentários finais.

Lembramos que há diferenças entre um trabalho de revisão, uma revisão sistemática e uma meta-análise. No primeiro caso, não há um compromisso maior com os mecanismos de coleta de dados e a revisão se presta mais para ser usada em uma argumentação do autor. Tem pouco valor científico e não necessariamente representa evidência médica. Já na revisão sistemática, há um objetivo explícito para fazê-la, portanto o método deve ser detalhado, por exemplo: data limite de levantamento, local e perguntas estabelecidas para busca, critérios de inclusão e exclusão, tipos de trabalhos utilizados (retrospectivos, prospectivos, experimentais etc.). As conclusões deste tipo de revisão devem obrigatoriamente considerar apenas os dados obtidos na coleta bibliográfica.

Finalmente, a meta-análise segue os mesmos princípios da revisão sistemática, mas lança mão de análise estatística para interpretação dos dados. É óbvio, neste caso, que os trabalhos obtidos devem, necessariamente, ser considerados comparáveis entre si, uma vez que, não o sendo, poderiam falsear as conclusões finais.

Os RELATOS DE CASO devem conter introdução com revisão pertinente que justifique sua importância, seja pela raridade ou impacto clínico, apresentação do caso com riqueza de detalhes visuais e de descrição e comentários finais, com discussão das nuances que façam deste caso um artigo digno de publicação. Não há necessidade de envio de seu resumo.

- 1) Título – conciso e descritivo com no máximo 100 caracteres, não devendo constar as palavras relato de caso e revisão de literatura.
- 2) Palavras chave – no máximo 5 e em ordem alfabética.
- 3) Os textos não poderão ter mais de 5 autores, No caso de mais, uma justificativa deve ser enviada.
- 4) Corpo do texto estruturado em: introdução, apresentação do caso, discussão e comentários finais.
- 5) O texto completo, excetuando título e referências não deverá ultrapassar 600 palavras.
- 6) Referência bibliográfica – no máximo 6.
- 7) Aceitaremos 1 tabela ou figura apenas.

A CARTA AO EDITOR é utilizada para que os leitores da revista possam externar suas opiniões sobre os temas e artigos nela publicados. Sua submissão será através do sistema da internet, assim como qualquer outro artigo, devendo adequar-se à seguinte estruturação:

- 1) Quanto à formatação, deverão seguir as mesmas regras dos relatos de casos.
- 2) A carta será enviada ao autor do artigo, que terá 6 semanas para respondê-la.
- 3) A resposta deverá seguir a mesma formatação dos relatos de casos.
- 4) A carta e a resposta serão publicadas no mesmo número da revista, e não haverá mais réplicas.
- 5) As cartas não serão revisadas pelo corpo editorial. Contudo, se apresentarem caráter pessoal ou agressivo, a critério do Editor, poderão ter sua publicação negada.

Referências bibliográficas

São essenciais para identificar as fontes originais dos conceitos, métodos e técnicas a que se faz referência no texto e que provêm de investigações, estudos e experiências anteriores; apoiar os atos e opiniões expressados pelo autor; e proporcionar ao leitor a informação bibliográfica que necessita para consultar as fontes primárias.

As referências devem ser pertinentes e atualizadas.

Todas as referências devem ser citadas no texto com números consecutivos em forma de superíndices, segundo a ordem de sua aparição. No final do artigo estas citações farão parte das referências bibliográficas da seguinte forma:

Artigos de revistas científicas

É necessário proporcionar as seguintes informações: autor (es), título do artigo, título abreviado da revista em que este se publica; ano; volume (em números arábicos), número e

página inicial e final. Toda a informação se apresenta na língua original do trabalho citado. A seguir mostramos alguns exemplos que ilustram o estilo de Vancouver para a elaboração e pontuação de citações bibliográficas. Cabe ressaltar que quando as páginas final e inicial de uma citação estão em uma mesma dezena, centena, milhar etc. não há necessidade de grafar-se números repetidos. Por exemplo, uma referencia que se inicia na página 1320 e termina na 1329, deverá constar como 1320-9.

a. De autores individuais:

Os sobrenomes e iniciais dos primeiros seis autores e, se mais de 6, segue a expressão "et al.". Exemplos:

Kerschner H, Pegues JAM. Productive aging: a quality of life agenda. J Am Diet Assoc 1998; 98(12):1445-8.

Bin D, Zhilhui C, Quichang L, Ting W, Chengyin G, Xingzi W et al. Duracion de la inmunidad lograda con la vacuna antisarampionosa con virus vivos: 15 años de observación en la província de Zhejiang, China. Bol Oficina Sanit Panam 1992;112(5):381-94.

b. Que constam de várias partes:

Lessa A. I. Epidemiologia do infarto agudo do miocárdio na cidade do Salvador: II, Fatores de risco, complicações e causas de morte. Arq Brás Cardiol 1985;44:225-60.

c. De autor corporativo:

se constar de vários elementos, mencionar do maior ao menor. Em revistas publicadas por organismos governamentais ou internacionais, ,pode-se atribuir ao organismo responsável os trabalhos sem autor.

Pan American Health Organization, Expanded Program on Immunization. Strategies for the certification of the eradication of wild poliovirus transmission in the Americas. Bull Pan Am Health Organ 1993;27(3):287-95.

Organisation Mondiale de la Santé, Groupe de Travail. Déficit en glucose-6-phosphatase déshydrogenase. Bull World Health Organ 1990;68(1):13-24.

d. Quando sem autor:

só utilizar se dão detalhes acerca de informes escritos que os leitores possam solicitar e obter. É importante indicar o nome exato da entidade coletiva responsável pelo documento, além de seu título completo, cidade, ano e número. Se possível, informar a fonte do documento.

Cancer in South Africa [editorial]. S Afr Med J 1994;84:15.

e. Artigo em língua não portuguesa ou inglesa

Ryder TE, Haukeland EA, Solhaug JH. Bilateral infrapatellar seneruptur hostidligere frisk kvinne. Tidsskr Nor Laegeforen 1996;116:41-2.

f. Volume com suplemento

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 1:275-82.

g. Número com suplemento

Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Womens psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23(1 Suppl 2):89-97.

h. Volume com parte

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995;32(Pt 3):303-6.

i. Número com parte

Poole GH, Mills SM. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. *N Z Med J* 1994;107(986 Pt 1):377-8.

j. Número sem volume

Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 1995;(320):110-4.

k. Sem número ou volume

Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responses. *Curr Opin Gen Surg* 1993:325-33.

l. Paginação em números romanos

Fisher GA, Sikic BI. Drug resistance in clinical oncology and hematology. Introduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995 Apr;9(2):xi-xii.

m. Tipo de artigo indicado caso necessário

Enzensberger W, Fischer PA. Metronome in Parkinsons disease [carta]. *Lancet* 1996;347:1337. Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [resumo]. *Kidney Int* 1992;42:1285.

n. Artigo contendo retratação

Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. Ceruloplasmin gene defect associated with epilepsy in EL mice [retratação de Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. In: *Nat Genet* 1994;6:426-31]. *Nat Genet* 1995;11:104.

o. Artigo resumido

Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBP gene expression during mouse development [resumido em Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:3127]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:1083-8.

p. Artigo com errata publicada

Hamlin JA, Kahn AM. Herniography in symptomatic patients following inguinal hernia repair [errata publicada aparece em West J Med 1995;162:278]. West J Med 1995;162:28-31.

Livros ou outras Monografias

a. De autoria pessoal

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

b. Editor(es), compilador(es) como autor(es)

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

c. Organização como autora e publicadora

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

d. Capítulo em livro

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. Em: Laragh JH, Brenner BM, editores. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

e. Anais de conferência

Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

quando publicado em português:

Costa M, Hemodiluição para surdez súbita. Anais do 46th Congresso Brasileiro de Otorrinolaringologia; 2008 Out 23-25; Aracaju, Brasil. São Paulo, Roca; 2009.

f. Apresentação oral publicada

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

g. Relatório técnico ou científico

Elaborado através de apoio/financiamento da empresa XXX: Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Relatório final. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSIGOEI69200860.

ou

Elaborado através de apoio/financiamento da empresa XXX: Field MJ, Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract No.: AHCP282942008. Apoiado pela Agency for Health Care Policy and Research.

h. Dissertação

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderlys access and utilization [dissertação]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

i. Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Outros materiais publicados**a. Artigo de jornal**

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21;Sect. A:3 (col. 5).

b. Material audiovisual

HIV+/AIDS: the facts and the future [1 videocassette: 20 min]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

Sinuistis: a slide lecture series of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation [diapositivo]. Washington, DC: The Academy; 1988 [54 diapositivos acompanhados de manual preparado por HC Pillsbury e ME Johns]

Clark R, et al., eds American Society for Microbiology, prods. Topics in clinical microbiology [audiocassette]. Baltimore: Williams & Wilkins; 1976. [24 audiocassetes: 480 min; acompanhados de 120 diapositivos e um manual]

c. Material Legal

Lei Estadual:

Preventive Health Amendments of 1993, Pub. L. No. 103-183, 107 Stat. 2226 (Dec. 14, 1993).

Código de Regulamentações Federais:

Consentimento informado, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Audiência:

Increased Drug Abuse: the Impact on the Nations Emergency Rooms: Audiência para a Subcomissão on Human Resources and Intergovernmental Relations of the House Comm. on Government Operations, 103rd Cong., 1st Sess. (May 26, 1993).

d. Mapa

North Carolina. Tuberculosis rates per 100,000 population, 1990 [mapa demográfico]. Raleigh: North Carolina Dept. of Environment, Health, and Natural Resources, Div. of Epidemiology; 1991.

e. Bíblia

Bíblia. King James version. Grand Rapids (MI): Zondervan Publishing House; 1995. Ruth 3:1-18.

f. Dicionário e similares

Stedmans medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p. 119-20.

Material não publicado

Não se considera referência apropriada os resumos (abstracts) de artigos, os artigos que ainda não tenham sido aceitos para a publicação e os trabalhos ou documentos inéditos que não sejam facilmente acessáveis ao público. Excetuam-se os artigos já aceitos, mas pendentes de publicação e aqueles documentos que, ainda que inéditos, possam encontra-se com facilidade. Nesta categoria encontram-se as teses, alguns documentos de trabalho de organismos internacionais, protocolos de trabalhos científico registrados em comitês de ética e informes apresentados em conferências.

a.No prelo

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. In press 1996.

Se for absolutamente necessário citar fontes inéditas difíceis de conseguir, pode-se mencionar no texto (entre parênteses) ou como nota de rodapé. A citação no texto far-se-á da seguinte maneira:

“Foi observado1 que ...”

e ao pé da mesma página do artigo colocar-se-á a nota correspondente:

1 Lanos-Cuentas EA, Campos M. Identification and qualification of the risk factors associated with New World cutaneous leishmaniasis. In: International Workshop on control strategies for Leishmaniasis, Ottawa, June 1-4, 1987.

Ou

1 Herrick JB [e outros]. [Carta a Frank R Morton, secretário, Associação Médica de Chicago]. Documentos de Herrick. [1923]. Documentos incluídos na: University of Chicago Special collections, Chicago, Illinois, EUA.

Material eletrônico

a. Artigo de revista em formato eletrônico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [citado 1996 Jun 5];1(1):[24 telas]. Encontrado em: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

34. Monografia em formato eletrônico

CDI, clinical dermatology illustrated [monografia em CD-ROM]. Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

b. Arquivo de computador

Hemodynamics III: the ups and downs of hemodynamics [programa computadorizado]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

c. Site na Internet

Pritzker TJ. Na early fragment from Central Nepal [Site na Internet] Ingress Communications. Disponível em <http://www.ingress.com/âstanart/pritzker/pritzker.html>. Acessado em 8 de junho 1995.

d. Base de dados

Compact library: AIDS [base de dados em CD-ROM atualizada cada 3 meses]. Versão 1,55^a. Boston: Massachusetts Medical Society, Medical Publishing Group; 1980. [1 disco compacto; sistema operacional: IBM PC, OS/2 ou compatível; 640K de memória; MS-DOS 3.0 ou mais recente, extensão Microsoft CD-ROM]

Tabelas

As Tabelas, cujo propósito é agrupar valores em linhas e colunas fáceis de assimilar, devem apresentar-se em uma forma compreensível para o leitor; devem explicar-se por si mesmas e complementar - não duplicar - o texto. Não devem conter demasiada informação estatística, pois acabam incompreensíveis e confusas.

Devem ter um título breve, mas completo, de maneira que o leitor possa determinar, sem dificuldade, o que se tabulou; indicar, além disso, lugar, data e fonte da informação. O

cabeçalho de cada coluna deve incluir a unidade de medida e ser o mais breve possível; deve indicar-se claramente a base das medidas relativas (porcentagens, taxas, índices) quando estas são utilizadas. Só se deve deixar em branco as caselas correspondentes a dados que não forem aplicáveis; deve-se usar três pontos quando faltar informação porque não se inseriram observações. As chamadas de notas se farão mediante letras colocadas como expoentes em ordem alfabética: a, b, c etc.

Digite ou imprima cada tabela com espaçamento duplo em uma folha separada de papel. Não submeta tabelas como fotografias. Numere as tabelas consecutivamente na ordem da sua citação no texto. Dê a cada coluna um título curto ou abreviado. Coloque as explicações necessárias em notas de rodapé, não no título. Explique em notas de rodapé todas as abreviações sem padrão que são usadas em cada quadro. Para notas de rodapé use os símbolos seguintes, nesta seqüência:

Identifique medidas estatísticas de variações, como desvio padrão e erro padrão da média .

Não use linhas horizontais e verticais internas.

Esteja seguro que cada tabela esteja citada no texto.

Se você usa dados de outra fonte, publicada ou inédita, obtenha permissão e os reconheça completamente.

O uso de muitas tabelas em relação ao comprimento do texto pode produzir dificuldades na diagramação de páginas. Lembre-se que a revista brasileira de ORL aceita artigos com 25 laudas em sua totalidade.

O editor, ao aceitar o artigo, pode recomendar que quadros adicionais que contenham dados importantes mas muito extensos sejam depositadas em um serviço de arquivo, como o Serviço de Publicação Auxiliar Nacional nos Estados Unidos, ou os faça disponíveis para os leitores. Nesta situação, uma declaração apropriada será acrescentada ao texto. Submeta tais quadros para consideração com o artigo.

Figuras

As ilustrações (gráficos, diagramas, mapas ou fotografias, entre outros) devem ser utilizadas para destacar tendências e comparações de forma clara e exata; serem fáceis de compreender e agregar informação, não duplicá-la. Seus títulos devem ser tão concisos quanto possível, mas ao mesmo tempo muito explícitos. Não se colocam notas ao pé da figura, mas se identifica a fonte se tomada de outra publicação. Havendo espaço, a explicação dos gráficos e mapas deverá ser incluída dentro da própria figura. O excesso de quadros ou material gráfico, ou ambos, é custoso, diminui o efeito que se deseja e ocupa muito espaço. É preciso selecionar este tipo de material cuidadosamente. Todas as figuras e fotografias podem ser publica das em cores.

Figuras devem ser profissionalmente desenhadas ou fotografadas. Desenhos à mão livre ou datilografados são inaceitáveis. Em vez de desenhos originais, filmes de radiografia, e outro material, envie impressões fotográficas apuradas, em papel lustroso, preto-e-brancas, em torno de 127 × 173 mm, não maior que 203 × 254 mm. Cartas, números, e símbolos deveriam estar claros e em tamanho suficiente, para que mesmo quando reduzido para publicação cada

letra ainda seja legível. Títulos e explicações detalhadas devem ficar na legenda e não na figura.

Cada figura deveria ter um rótulo colado em sua parte de trás indicando o número da figura, o nome de autor e topo da figura. Não escreva na parte de trás de figuras ou arranhe ou use cliques de papel. Não dobre as figuras ou as monte em papelão.

Microfotografias devem ter marcadores de escala internos. Símbolos, setas ou cartas usados em microfotografias devem contrastar com o fundo.

Se fotografias das pessoas forem usadas, ou os mesmos não devem ser identificáveis ou suas fotos devem ser acompanhadas de permissão escrita para seu uso e publicação.

As figuras devem ser numeradas consecutivamente de acordo com a ordem na qual elas foram citadas no texto. Se uma figura já foi publicada previamente, deve ser reconhecida a fonte original e submetida a permissão escrita do proprietário protegido por direitos autorais para reproduzir o material. Permissão é requerida independente de autoria ou publicador, com exceção de documentos no domínio público.

Para ilustrações em cores, apresente negativos de cor, arquivos em qualidade de pelo menos 300 dpi, transparências positivas ou impressões coloridas de qualidade. Desenhos acompanhando as fotos podem ser úteis para a localização da região a ser reproduzida.

Lengedas para Ilustrações

Digite em espaçamento duplo, começando em uma página separada, com numeral árabe que corresponde à ilustração. Quando usados símbolos, setas, números, ou cartas para identificar partes das ilustrações, identificar e explicar cada um claramente na legenda. Explique a escala interna e identifique o método de coloração das microfotografias.

Unidades de Medida

Medidas de comprimento como altura, peso e volume devem ser informadas em unidades métricas (metro, quilograma, ou litro) ou seus múltiplos decimais.

As temperaturas devem ser informadas em graus centígrados. As pressões sanguíneas devem ser em milímetros de mercúrio.

Os dados hematológicos e medidas de análise laboratoriais devem aparecer no sistema métrico em termos do Sistema Internacional de Unidades (SI).

Abreviaturas e siglas

Utilizar o menos possível. Na primeira vez que uma abreviatura ou sigla aparece no texto, deve-se escrever o termo completo a que se refere, seguido da sigla ou abreviatura entre parênteses, como no exemplo, Programa Ampliado de Imunização (PAI). Devem ser expressas em português, por exemplo, DP (desvio padrão) e não SD (standard deviation), exceto quando correspondam a entidades de alcance nacional (FBI) ou conhecidas internacionalmente por suas siglas não portuguesas (UNICEF), ou a substâncias químicas

cujas siglas inglesas estão estabelecidas como denominação internacional, como GH (hormônio do crescimento), não HC.

Quanto ao conteúdo

Quando se planeja um estudo na área médica, seja experimental ou não, busca-se acrescentar alguma informação ao conhecimento atual. A motivação destes estudos poderia ser classificada conforme a questão pesquisada, como: anormalidade, diagnóstico, frequência (incidência e prevalência), risco, prognóstico, tratamento, prevenção, causa, custo etc.

Durante a pesquisa procura -se identificar e analisar os eventos clínicos mais relevantes para a saúde do sujeito (desfechos). Estes eventos são descritos como os 6 "D": desenlace (desfecho antes do tempo), doença, desconforto, deficiência, descontentamento, despesa.

Existem estratégias gerais para estudarmos cada questão específica, que denominamos delineamento ou desenho. Em linhas gerais teríamos as seguintes formas:

- Diagnóstico - corte transversal. Prevalência - corte transversal. Incidência - estudo de coorte
- Risco - estudo de coorte ou caso/ controle
- Prognóstico - estudo de coorte. Tratamento - ensaio clínico. Prevenção - ensaio clínico
- Causa - estudo de coorte ou caso/ controle

Cada estudo tem sua própria possibilidade de erro sistemático, o chamado viés ou vício. Estes erros podem comprometer os resultados do estudo em si (validade interna, credibilidade) ou sua capacidade de generalização das conclusões, para além da amostra estudada (validade externa, transferibilidade). Os erros podem surgir nas diferentes formas de estudo e suas fases, como: viés de seleção, de aferição, de confusão, de amostragem, de montagem, de adesão, de migração, de duração etc.

Alguns erros sistemáticos são evitados pela experiência e conhecimento do pesquisador que identifica fatores inerentes ao assunto. Outros são evitados ou minimizados a partir de métodos específicos como: randomização, restrição, emparelhamento, estratificação e ajustamento (caso melhor-caso pior).

Outro erro inerente ao estudo epidemiológico é o acaso, o erro aleatório, decorrente da variação, que pode surgir no processo de mensuração ou estar vinculado à natureza do estudo. O tratamento estatístico dos resultados obtidos visa minimizar os efeitos do acaso.

Um estudo com delineamento adequado e bem conduzido, mesmo sem tratamento estatístico, pode ser avaliado corretamente com uma certa dose de bom senso. Por outro lado, um estudo inadequado, com erros sistemáticos grosseiros, não permite conclusão alguma, mesmo com tratamento estatístico rigoroso.

Estes cuidados referem-se à capacidade de tirar conclusões conferidas a cada estudo. Entretanto, muitos estudos são motivados pela observação de fatos curiosos ou intrigantes, que muitas vezes trazem contribuições importantes para o direcionamento das pesquisas e, algumas vezes, até mesmo do "pensar" médico. Nestes casos, é fundamental o

posicionamento coerente do pesquisador no capítulo de "conclusões" onde ele deve apresentar as hipóteses geradas das observações, fundamentá-las e, se possível, formular maneiras de testá-las.