

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIRURGIA**

MAGNO ERIC BARBOSA PEIXOTO

**HISTOMORFOMETRIA DAS TERMINAÇÕES NERVOSAS DAS CONCHAS NAS AIS
INFERIORES DE HUMANOS POR IMUNOFLORESCÊNCIA E MICROSCOPIA
CONFOCAL A LASER**

FORTALEZA

2017

MAGNO ERIC BARBOSA PEIXOTO

**HISTOMORFOMETRIA DAS TERMINAÇÕES NERVOSAS DAS CONCHAS NASAIS
INFERIORES DE HUMANOS POR IMUNOFLORESCÊNCIA E MICROSCOPIA
CONFOCAL A LASER**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Luzete Costa Cavalcante

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P431h Peixoto, Magno Eric Barbosa.
Histomorfometria das terminações nervosas das conchas nasais inferiores de humanos por imunofluorescência e microscopia confocal a laser / Magno Eric Barbosa Peixoto. – 2017.
61 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Maria Luzete Costa Cavalcante .
1. Obstrução Nasal. 2. Conchas Nasais. 3. Imunofluorescência. 4. Terminações Nervosas. 5. Microscopia Confocal. I. Título.

CDD 617

MAGNO ERIC BARBOSA PEIXOTO

**HISTOMORFOMETRIA DAS TERMINAÇÕES NERVOSAS DAS CONCHAS NASAIS
INFERIORES DE HUMANOS POR IMUNOFLOURESCÊNCIA E MICROSCOPIA
CONFOCAL A LASER**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em ___ / ___ / _____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Doutora Maria Luzete Costa Cavalcante
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Doutor José Alberto Dias Leite
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Doutor Daniel Chung
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Ao Senhor Altíssimo e Onipotente, a Quem todo louvor, honra e glória são devidos.

Ao meu pai Sisto Moreira Peixoto, meu grande exemplo de vida.

À minha mãe Sidneide Barbosa Peixoto, pelo carinho e dedicação cotidiana incansável.

Ao meu irmão Carlos Alan Barbosa Peixoto, pelo companheirismo eterno.

À minha esposa Anna Rosa Guerra Cavalcanti Peixoto, pelo amor incondicional.

Aos meus queridos filhos Mateus Guerra Cavalcanti Peixoto e Davi Guerra Cavalcanti Peixoto por trazerem uma outra dimensão à minha existência.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Luzete Costa Cavalcante, pela orientação, doação pessoal e atenção dedicadas a esse projeto.

Ao Professor Titular José Alberto Dias Leite, pelo incentivo e apoio à essa pesquisa, bem como pelos valorosos ensinamentos.

Ao Professor Titular Lusmar Veras Rodrigues, Coordenador do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação que muito contribuíram com suas aulas.

À Sra. Maria Luciene Vieira de Oliveira e à Sra. Magda Fontenele de Sousa, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio irrestrito para o êxito desse trabalho.

À Professora Doutora Margarida Maria de Lima Pompeu, coordenadora do Mestrado em Patologia da Universidade Federal do Ceará, por ter cedido a utilização do criostato para o corte das peças.

À Professora Diane Isabelle Magno Cavalcante pela colaboração na leitura das lâminas.

Ao Professor Titular Manoel Odorico de Moraes Filho, diretor do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, por ter possibilitado a utilização do microscópio confocal, fundamental para realização desse estudo.

Ao Doutor Danilo Damasceno Rocha, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pelo auxílio na utilização do microscópio confocal e processamento das imagens dos tecidos estudados.

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, na figura da Doutora Rosemayre Souza Freire, por proporcionar a aquisição de imagens dos tecidos estudados como o microscópio confocal.

Ao Coordenador de Medicina Legal da Perícia Forense do Ceará Dr. Renato Evando Moreira Filho, por viabilizar o uso das instalações da PEFOCE.

Aos colegas médicos Dr. José Mário de Lima Júnior, Dr. Carlos Eduardo Coelho Barbalho e Dr. Victor Hugo Medeiros Alencar, pelo inestimável auxílio da obtenção das amostras.

À Dulce Maria Nascimento Coelho e Matheus de Souza Santos, acadêmicos de Farmacologia e ao Pedro de Castro Neto, acadêmico de Medicina, pela ajuda na coloração das lâminas.

Ao colega médico Dr. Sami de Andrade Cordeiro Gadelha, pela colaboração com o registro fotográfico das lâminas em HE.

À Deiziane Viana da Silva Costa pelo auxílio na leitura das lâminas.

À colega de mestrado Dra. Janaína Gonçalves da Silva Leite, por dividir e me auxiliar nessa nova linha de pesquisa.

RESUMO

Obstrução nasal é uma das principais queixas em pacientes com rinite, sendo frequentemente associada ao aumento da resistência nasal pela hipertrofia das conchas nasais inferiores, contudo, estudos têm demonstrado que mensurações objetivas da resistência de via aérea nasal nem sempre se correlacionam à percepção subjetiva do grau de obstrução nasal. As conchas nasais inferiores são estruturas alongadas, pareadas e situadas nas paredes nasais laterais, constituídas de um eixo ósseo central envolto, quase exclusivamente, por epitélio respiratório pseudoestratificado cilíndrico ciliado, com uma membrana basal bem definida e uma espessa lâmina própria. Possuem um papel importante na fisiologia nasal através de respostas reflexas. Os nervos sensoriais monitoram o microambiente da mucosa nasal e iniciam os mecanismos protetores imediatamente, via respostas axonais. Essas terminações nervosas também possuem importante ação na percepção da patência nasal. Apesar do importante papel dessas estruturas, pouco é conhecido acerca de sua morfologia e distribuição na mucosa nasal normal de conchas inferiores de humanos. Com o objetivo de obter dados morfológicos e de distribuição das terminações nervosas em conchas nasais inferiores, espécimes retirados de seis indivíduos (três homens e três mulheres) com idades variando de 16 a 76 anos foram submetidos a estudo de imunofluorescência com o marcador pan-axonal antiproduto gênico protéico 9,5 e microscopia confocal de varredura a laser. Foram identificadas terminações nervosas livres, principalmente, nas camadas mais superficiais da lâmina própria, algumas bem próximas à membrana basal. Não foram identificadas terminações nervosas complexas, do tipo corpusculares. Não houve diferenças na distribuição das terminações nervosas quando comparadas as faces septal e meatal ou em função do sexo dos indivíduos avaliados. As terminações nervosas livres mantêm relação íntima com glândulas seromucosas e seus ductos nas camadas mais superficiais da lâmina própria, bem como com vasos sanguíneos, sobretudo, em suas porções mais profundas, apontando para o papel que possuem na neuromodulação dos fenômenos de secreção glandular e controle vasomotor. Técnicas cirúrgicas que permitam a preservação dessas terminações nervosas livres talvez possibilitem

desfechos pós-operatórios melhores, com maior resolução da queixa clínica de obstrução nasal e menor índice de complicações como a síndrome do nariz vazio (*empty nose*).

Palavras-chaves: Obstrução Nasal. Conchas Nasais. Imunofluorescência. Terminações Nervosas. Microscopia Confocal.

ABSTRACT

Nasal obstruction is one of the main complaint of patients with rhinitis, which is frequently associated with increased nasal airway resistance caused by hypertrophic changes of the inferior turbinates, however, studies have demonstrated that the objective measurement of nasal airway resistance does not always correlate with the subjective perception of the degree of nasal obstruction. The inferior turbinates are elongated, paired structures situated at the lateral nasal wall and made of a central core of osseous skeleton and a mucosal layer on each side almost exclusively covered with a pseudostratified ciliated columnar epithelium, with a well-defined basement membrane zone and a thick lamina propria. They play an important function in nasal physiology through reflex responses. The sensory nerves monitor the conditions of the mucosal microenvironment and initiate protective mechanisms immediately via axon responses. These nerve endings also have an important role on the perception of nasal patency. Despite the importance of these structures, little is known about their morphology and distribution in the normal nasal mucosa of human inferior turbinates. In order to obtain morphological and distribution data of nerve endings in inferior turbinates, specimens obtained from six individuals (three men and three women) with ages ranging from 16 to 76 years were submitted to fluorescent antibody technique with the marker pan -axonal anti-protein gene product 9.5 and confocal laser scanning microscopy. Free nerve endings were identified, mainly in the superficial layers of the lamina propria, some very close to the basement membrane. No complex nerve endings of the corpuscular type were identified. There were no differences in the distribution of nerve endings when compared to the septal and meatal faces or according to the gender of the individuals evaluated. Free nerve endings maintain an intimate relationship with seromucous glands and their ducts in the more superficial layers of the lamina propria, as well as with blood vessels, especially in their deeper portions, pointing to the role they play in the neuromodulation of glandular secretion and vasomotor control. Surgical techniques that allow the preservation of these free nerve endings may provide better postoperative outcomes, with a higher resolution of the clinical complaint of nasal obstruction and a lower rate of complications such as empty nose syndrome.

Keywords: Nasal Obstruction. Turbinates. Fluorescent Antibody Technique. Nerve Endings. Microscopy Confocal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Visão da face septal (medial) da concha nasal inferior esquerda após ressecção	25
Figura 2 - Medição da concha inferior	26
Figura 3 - Pesagem da concha inferior	26
Figura 4 - Secção da concha em três segmentos	26
Figura 5 - Segmento central em posicionamento de aspecto coronal.....	27
Figura 6 - Fixação da peça na base	27
Figura 7 - Ajuste da base no criostato com as referências e disposição dos cortes na lâmina.....	28
Figura 8 - Epitélio respiratório da concha nasal inferior	32
Figura 9 - Porção óssea da concha nasal inferior.	32
Figura 10 - Infiltrado inflamatório na lâmina própria da concha nasal inferior	33
Figura 11 - Sinusóides venosos (cabeças de setas brancas) na lâmina própria da concha nasal inferior.	33
Figura 12 - Arteriola (cabeça de seta branca) na lâmina própria da concha nasal inferior.	33
Figura 13 - Glândulas seromucosas (cabeças de setas brancas) na lâmina própria da concha nasal inferior	34
Figura 14 - Porção septal da lâmina própria (cabeça de seta preta), porção óssea (seta branca) e porção meatal da lâmina própria (seta preta).....	34
Figura 15 - Terminações nervosas em proximidade à membrana basal do epitélio respiratório	35
Figura 16 - Terminações nervosas livres de aspecto ondulado, deixando o fascículo e se aproximando da membrana basal do epitélio respiratório	36
Figura 17 - Terminações nervosas em proximidade a glândulas seromucosas	37
Figura 18 - Terminações nervosas em proximidade a ducto excretor de glândula seromucosa.....	38
Figura 19 - Fascículos nervosos mais calibrosos em camada profunda da lâmina própria	39

Figura 20 - Vaso sanguíneo arterial com imunorreatividade ao PGP 9,5 em suas paredes	40
Figura 21 - Comparação das médias de distribuição das terminações nervosas entre as camadas superficiais da lâmina própria das faces septal e meatal, com IC de 95%	41
Figura 22 - Comparação das médias de distribuição das terminações nervosas em função do sexo, com IC de 95%.....	42
Quadro 1 - Trabalhos que também analisaram terminações nervosas em tecidos humanos do trato respiratório superior.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela de escores para quantificação da inervação	30
Tabela 2 - Sexo e idade dos indivíduos.	31
Tabela 3 - Dados morfológicos gerais das conchas nasais avaliadas.	31
Tabela 4 - Comparação da inervação em função das faces: septal e meatal.	41
Tabela 5 - Comparação da inervação das conchas nasais em função do sexo.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CONTEXTO CLÍNICO.....	15
1.2 HISTOLOGIA DAS CONCHAS NASAIS INFERIORES	16
1.3 NEUROFISIOLOGIA DAS CAVIDADES NASAIS.....	17
1.4 NEUROMODULAÇÃO DOS REFLEXOS NASAIS	19
1.5 MECANISMO DE PERCEPÇÃO DA PATÊNCIA NASAL	20
1.6 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 GERAL.....	23
2.2 ESPECÍFICOS	23
3 CASUÍSTICA E MÉTODO	24
3.1 OBTENÇÃO DAS CONCHAS NASAIS	24
3.2 COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA.....	25
3.3 PREPARO DOS CORTES PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	25
3.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA	28
3.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	29
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4 RESULTADOS	31
4.1 COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA.....	31
4.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-PGP 9,5.....	34
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

APÊNDICES	57
APÊNDICE A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	57
APÊNDICE B – DADOS GERAIS DOS INDIVÍDUOS.	60
APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO CLÍNICO

A obstrução nasal é uma queixa clínica muito frequente e que promove não apenas grande prejuízo na qualidade de vida dos pacientes afetados, mas também impacto econômico significativo em virtude dos gastos com consultas médicas, exames complementares, licenças médicas, tratamentos clínicos e cirúrgicos, resultando em custos de até seis bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos (STEWART; FERGUSON; FROMER, 2010).

A causa mais comum de obstrução nasal crônica são as rinites, em especial a rinite alérgica, que induzem um processo inflamatório da mucosa nasal e podem determinar a hipertrofia das conchas nasais inferiores (BUSH, 2004; SKONER, 2001; PASSÀLI *et al.*, 2003; (LAI; COREY, 1993; JACKSON; KOCH, 1999). Dessa forma, quando o tratamento clínico da rinite falha e a obstrução nasal é persistente, a abordagem cirúrgica é direcionada, em especial, a essas estruturas, com o emprego de técnicas diversas: luxação lateral da concha nasal, turbinectomia parcial, turbinoplastia inferior, criocirurgia, vaporização a laser, ressecção submucosa, eletrocauterização de superfície, eletrocauterização da submucosa e ablação por radiofrequência, todas com o objetivo de aumentar o corredor de fluxo aéreo das cavidades nasais.

Contudo, a sensação de patência nasal não está exclusivamente relacionada ao volume de fluxo aéreo nasal. Estudos têm demonstrado a falta de correlação entre a percepção subjetiva de obstrução ou de patência nasal frente a mensurações objetivas do fluxo aéreo nasal, como a rinometria acústica, rinomanometria e o pico de fluxo inspiratório nasal (YEPES-NUNEZ *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2011; YANIV *et al.*, 1997).

Em concordância com essas evidências, temos a chamada obstrução nasal paradoxal que acontece na síndrome do nariz vazio (*empty nose*), uma temível complicação pós-operatória das conchas nasais inferiores, na qual, a despeito da existência de uma ampla passagem nasal para o fluxo aéreo, persiste a sensação de obstrução, em virtude da falta de turbilhonamento do ar inspirado, o que reduz o seu contato com as paredes mucosas (SCHEITHAUER, 2010). Dados da literatura apontam

para uma incidência dessa complicação, com graus variáveis de intensidade, em até 20% de pacientes submetidos a tratamentos cirúrgicos das conchas nasais (CHHABRA; HOUSER, 2009).

Ainda nesse contexto, a aplicação de anestésico local nas cavidades nasais produz uma sensação de congestão nasal sem mudanças objetivas na mensuração do fluxo aéreo. Por outro lado, a aplicação tópica nasal de substância mentolada promove a sensação de desobstrução sem alterar, contudo, a morfologia nasal, indicando que o mecanismo fisiológico primário da sensação de patência nasal é sobretudo neurogênico e não simplesmente mecânico e aerodinâmico (ECCLES; MORRIS; TOLLEY, 1988; ECCLES, 2003).

Embora a busca por intervenções cirúrgicas efetivas das conchas nasais inferiores remonte há mais de um século (JONES, 1895 apud OPHIR *et al.*, 1992), alguns estudos de seguimento pós-operatório de longo prazo, por mais de dez anos, demonstram falhas na resolução da queixa clínica de obstrução nasal entre 28 e 59% (COURTISS; GOLDWYN, 1990; WARWICK-BROWN; MARKS, 1987), fazendo supor que a ação terapêutica voltada apenas ao fator estrutural (mecânico) tem sua eficácia limitada por outros elementos, dentre os quais, possivelmente, o fator neurogênico de percepção do fluxo aéreo nasal.

Dessa forma, o estudo e compreensão da morfologia e fisiologia das conchas nasais inferiores, em especial no que concerne a sua inervação e fenômenos neurogênicos, é fundamental para otimizar o adequado manejo clínico desses pacientes com obstrução nasal crônica, promover indicações cirúrgicas mais assertivas e contribuir para o aprimoramento das técnicas operatórias, resultando em menores índices de falha terapêutica e de complicações como o *empty nose*.

1.2 HISTOLOGIA DAS CONCHAS NASAIS INFERIORES

As conchas nasais inferiores são estruturas alongadas, pareadas, uma em cada fossa nasal, que se articulam com suas paredes laterais. São quase exclusivamente cobertas por epitélio respiratório (pseudoestratificado cilíndrico ciliado, com células caliciformes), havendo áreas propensas à metaplasia, decorrente, em especial, do atrito do ar inspirado, como em sua porção mais anterior (DOLCI, 1994).

As células caliciformes predominam no epitélio da face lateral (zona de menor fluxo aéreo). A camada de revestimento mucoso medial da concha inferior é mais espessa que a camada lateral e a membrana basal do seu epitélio de revestimento é bem definida e também mais espessa em sua face medial. As conchas inferiores possuem um eixo ósseo trabeculado de onde parte seu suprimento arterial. Entre a membrana basal do epitélio e o periósteo da camada óssea central, encontra-se a lâmina própria, que corresponde ao maior volume da concha inferior e é formada por um tecido conjuntivo frouxo, com presença, em sua porção mais superficial, de um infiltrado celular inflamatório constituído, principalmente, por linfócitos, bem como por outras células imunocompetentes (macrófagos e mastócitos) e presente mesmo em indivíduos normais. A lâmina própria contém ainda muitas glândulas seromucosas, cujos ductos excretores se abrem para o epitélio. Uma rica rede de sinusóides venosos também está presente ao longo de grandes porções da lâmina própria, com predomínio em suas camadas medial e inferior. A porção mais profunda da lamina própria abriga fibras nervosas mais espessas, que se ramificam e se tornam mais delgadas ao longo de seu trajeto em direção às camadas mais superficiais (BERGER; BALUM-AZIM; OPHIR, 2003).

1.3 NEUROFISIOLOGIA DAS CAVIDADES NASAIS

As cavidades nasais atuam na percepção do olfato, como corredor para o fluxo aéreo e drenagem de secreções, na ressonância vocal e na proteção do trato respiratório por meio do condicionamento do ar inspirado e dos reflexos nasais.

Através da extensa superfície mucosa determinada, sobretudo pelas estruturas da parede lateral, como a concha nasal inferior, bem como pelas características de seu revestimento epitelial e do plexo sanguíneo capilar e sinusoidal venoso, as cavidades nasais regulam a corrente aérea, filtrando, aquecendo e umidificando o ar inspirado. Tais ações são dinâmicas e dependem de um equilíbrio entre a permeabilidade, o tônus vascular e a secreção seromucínica, sofrendo influência de fatores externos (ambientais) e internos (BABATOLA, 1998; ASSANASEN *et al.*, 1999; BAMFORD; ECCLES, 1982).

O controle desses fenômenos é neurogênico e se deve à inervação trigeminal da mucosa nasal, com suas fibras sensoriais aferentes, bem como simpáticas,

parassimpáticas e autônomas não adrenérgicas e não colinérgicas, que utilizam neuromediadores como o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), a substância P, o polipeptídeo pancreático de ave, o peptídeo ligado ao gene da calcitonina, a neurocinina e o neuropeptídeo Y. O sistema simpático regula, em grande parte, o fluxo sanguíneo pela rede vascular da mucosa nasal, através do controle da capacitância do tecido venoso erétil das conchas inferiores, conchas médias e do septo nasal. O sistema parassimpático tem pouco efeito sobre o tecido erétil vascular, estando mais relacionado ao controle da função glandular, resultando de sua estimulação, o aumento da secreção nasal aquosa. Já o sistema autônomo peptidérgico (não adrenérgico e não colinérgico), induz vasodilatação e hipersecreção por aumento da permeabilidade da mucosa nasal, resultando em congestão nasal, mediada, principalmente pelo polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e pela substância P. A resposta inflamatória também é modulada pelos neuropeptídeos liberados durante os reflexos axonais simpático e parassimpático (AUGUSTO *et al.*, 2011).

O conjunto dessas ações neuromoduladoras contribui para a hiper-reatividade nasal, que se configura em um aspecto importantíssimo tanto para as rinites não alérgicas, como para a rinite alérgica. A hiper-reatividade nasal é responsável pela característica de resposta exacerbada da mucosa nasal, seja a estímulos inespecíficos (fumaça de cigarro, perfume, odores fortes, tintas), seja a estímulos específicos como os alérgenos (MION; MELLO JÚNIOR, 2011).

Estudos levaram à formulação da hipótese de que, em um subgrupo de pacientes com rinite não alérgica, anormalidades da função neural podem ser responsáveis por seus sintomas (VAN RIJSWIJK; BLOM; *et al.*, 2003; BRAAT *et al.*, 1998).

Anormalidades no arco reflexo parassimpático podem contribuir para o desenvolvimento da obstrução nasal, como resultante do aumento da sensibilidade das fibras aferentes aos estímulos irritantes e/ou aumento da resposta glandular à ativação parassimpática, podendo levar à sensação de congestão nasal mesmo na ausência de bloqueio ao fluxo aéreo (NACLERIO; BACHERT; BARANIUK, 2010).

Além disso, aplicações repetidas de capsaicina levariam a uma desativação de terminações nervosas de neurônios aferentes tipo C, promovendo uma melhora na

sintomatologia desses pacientes (VAN RIJSWIJK; BOEKE; *et al.*, 2003; LACROIX *et al.*, 1991; BLOM *et al.*, 1997).

1.4 NEUROMODULAÇÃO DOS REFLEXOS NASAIS

Diversos trabalhos apontam para a influência de estímulos tácteis e térmicos na mucosa nasal humana e de seu envolvimento, não somente em eventos fisiológicos, mas também fisiopatológicos, resultando tanto em respostas reflexas locais, quanto em outros órgãos, como as vias aéreas inferiores e o sistema cardiovascular.

Em 1980, pesquisadores relataram a existência de um reflexo nasobrônquico possivelmente desencadeado pelo estímulo de mecanorreceptores na mucosa nasal, observado por ocasião do tamponamento da cavidade nasal com gases (ISHIZUKA; USUI, 1980).

Trabalhos de Fontanari *et al.* (1996; 1997) confirmam a existência do reflexo nasobrônquico, ao demonstrarem o aumento da resistência da via aérea inferior uma vez que as cavidades nasais são estimuladas com ar frio, sendo essa resposta abolida com a anestesia nasal ou com a inalação brônquica de atropina. Outro dado interessante é que essa resposta foi específica do nariz, tendo em vista que, através da cavidade oral, o ar frio não teve efeitos na resistência da via aérea inferior.

O reflexo do mergulho, no qual bradicardia, ou até mesmo parada cardíaca, podem ocorrer após exposição da mucosa nasal à água fria, é um exemplo de resposta do sistema cardiovascular à súbita irritação nasal (GOODEN, 1994). O reflexo nasocardíaco também pode ser evocado pela estimulação mecânica resultante da inserção de um tubo endotraqueal via fossa nasal, promovendo bradicardia (ADRIAN, 2008).

As fibras nervosas sensoriais não olfatórias, responsáveis pelas vias aferentes desses reflexos, são formadas tanto por fibras mielínicas como não mielínicas, essas últimas, com condução lenta e, em sua maioria, fibras nociceptoras do tipo-C. Já as fibras mielínicas são mais espessas e possuem maior velocidade de condução. Algumas dessas fibras, as mais delgadas dentre as mielínicas, pertencem a categoria A δ , podendo também ter funções nociceptivas (SARIN *et al.*, 2006).

Em gatos, fibras A δ nasais foram caracterizadas como tendo funções mecanorreceptoras e quimiorreceptoras (LUCIER; EGIZIL, 1989).

Em aves, 75 mecanorreceptores foram identificados, estando distribuídos em toda mucosa nasal. Alguns deles eram receptores de adaptação lenta e outros de adaptação rápida. Quando expostos à amônia, parte deles foi estimulada, sugerindo serem receptores polimodais que respondem aos estímulos mecânicos e químicos com diferentes limiares (MCKEEGAN, 2004).

Em um outro estudo com felinos, mecanorreceptores estimulados por pressão foram mais comumente encontrados na região posterior nasal e na área de inervação infraorbital (WALLOIS *et al.*, 1991).

Em ratos, receptores responsivos à pressão foram identificados na mucosa nasal, distribuídos na área de inervação etmoidal, sendo, em sua maioria, estimulados com pressões negativas mantidas enquanto inativos com pressões positivas. Seu exato mecanismo de ação é desconhecido, mas uma das hipóteses propostas é que a distorção da mucosa, durante a aplicação da pressão negativa, leve ao estiramento e estimulação dessas terminações (TSUBONE, 1990).

1.5 MECANISMO DE PERCEPÇÃO DA PATÊNCIA NASAL

Embora seja atraente a hipótese de que a corrente de fluxo aéreo poderia promover forças de cisalhamento que levariam à distorção da superfície da mucosa nasal, com consequente ativação dos mecanorreceptores, influenciando a sensação de patência nasal, não há evidências de que isso realmente aconteça, pelo contrário, um estudo russo realizado em gatos, demonstra que nenhum estímulo de mecanorreceptores, durante a respiração, é observado (GLEBOVSKIĬ; BAEV, 1984).

Corroborando esse dado, um outro trabalho, dessa vez utilizando modelos computacionais de dinâmicas de fluido em três dimensões, obtidos a partir de imagens de tomografia computadorizada, não encontrou correlação entre a percepção subjetiva de fluxo aéreo nasal e o cisalhamento da mucosa nasal (KIMBELL *et al.*, 2013).

Canais iônicos receptores de potencial transitório (TRP) são amplamente expressos em neurônios sensoriais e possuem funções termo, químico, osmo e mecanorreceptoras em terminações nervosas. Um conjunto de evidências aponta para a

participação de um desses canais, um tipo de termorreceptor, no mecanismo fisiológico primário que produz a sensação de amplo fluxo aéreo nasal: o canal iônico receptor de potencial transitório do tipo melastatina 8 (TRPM8), o qual seria estimulado pelo arrefecimento da superfície da mucosa nasal, bem como por substâncias mentoladas (SULLIVAN *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2011; ECCLES, 2003; ZHAO *et al.*, 2014; WILLATT; JONES, 1996; KIMBELL *et al.*, 2013; LINDEMANN *et al.*, 2008).

A água presente na secreção da mucosa nasal evapora para umidificar o ar inalado. O calor perdido devido à evaporação estimula o termorreceptor TRPM8. Como a perda de calor é proporcional ao fluxo de ar inspiratório, essa estimulação neural determina a percepção de patência nasal, além de prover sinais aferentes ao centro respiratório, no tronco cerebral, dando origem a ações reflexas de controle da respiração, como a modulação da atividade muscular inspiratória (BARANIUK; MERCK, 2009).

1.6 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Não obstante o importante papel que o sistema neural tem, tanto para a fisiologia nasal como no contexto de processos patológicos; na literatura pesquisada, há uma relativa escassez de trabalhos voltados ao estudo histomorfométrico das terminações nervosas na mucosa nasal de humanos, em especial, das conchas nasais inferiores. Um recente artigo de revisão de literatura sobre mecanorreceptores em mucosa nasal (RAZAQ; MOHAMAD; SALIM, 2015) corrobora essa exiguidade de estudos.

Marcações por imunofluorescência, com utilização de anticorpos primários seletivos para estruturas neurais, são mais eficientes que as clássicas colorações com prata e ouro, por serem mais específicas. A associação dessa técnica ao estudo com microscopia confocal de varredura a laser permite que estruturas muito delicadas, como as terminações nervosas, possam ser detalhadamente distinguidas, com excepcional resolução de imagens, minimizando as distorções e permitindo reconstruções tridimensionais das mesmas.

Dessa forma, o presente estudo, com o uso de microscopia confocal de varredura a laser e técnica de imunofluorescência com o marcador pan-axonal antiproduto gênico protéico 9,5 (PGP 9,5), propõe-se a descrever a morfologia e

distribuição das terminações nervosas em mucosa nasal das conchas inferiores de humanos, com o intuito de contribuir para um maior entendimento dessas estruturas, o que pode ser útil no aprimoramento de opções de manejo clínico e cirúrgico de pacientes com obstrução nasal crônica e outras afecções nasais ou mesmo no desenvolvimento de novas técnicas, mais assertivas, com menores índices de falhas terapêuticas e de complicações.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar a morfologia e distribuição das terminações nervosas nas conchas nasais inferiores de humanos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Comparar a distribuição das terminações nervosas entre as faces das conchas nasais inferiores (septal e meatal), correlacionando com o sexo dos indivíduos.
- Avaliar a aplicabilidade da técnica de imunofluorescência com uso do PGP 9,5 e microscopia confocal de varredura a laser no estudo da mucosa nasal de conchas inferiores de humanos.

3 CASUÍSTICA E MÉTODO

A pesquisa foi desenvolvida através do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará - UFC, com a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade, conforme parecer número 470.149 (Apêndice A).

Foram estudadas as conchas nasais inferiores esquerdas de seis cadáveres, procedendo-se a retirada dos espécimes durante autópsias realizadas no necrotério da Coordenadoria de Medicina Legal da Perícia Forense do Estado do Ceará - PEFOCE.

Foram três indivíduos do sexo masculino e três do sexo feminino com idades variando entre 16 e 76 anos (Apêndice B).

3.1 OBTENÇÃO DAS CONCHAS NASAIS

A ressecção das conchas ocorreu, em média, 13 horas após o óbito e só era efetuada depois da realização de uma entrevista com o familiar responsável, por ocasião da qual eram esclarecidas as dúvidas acerca da pesquisa, com preenchimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice C), bem como indagações sobre o histórico de manifestações clínicas nasais do indivíduo autopsiado.

Foram excluídos indivíduos com histórico pessoal de crises frequentes de espirros, rinorréia ou obstrução nasal, o que poderia sugerir possível quadro de rinosinusite crônica. Também foram excluídos indivíduos em que, durante a autópsia, evidenciavam-se sinais de trauma facial ou sinais macroscópios de lesões inflamatórias ou neoplásicas da mucosa nasal.

As conchas nasais inferiores eram removidas por via endoscópica transnasal, através de leve luxação medial seguida de ressecção com tesoura cirúrgica para turbinectomia, efetuando-se o corte bem próximo à inserção da concha com a parede lateral da cavidade nasal (Figura 1).

Figura 1 - Visão da face septal (medial) da concha nasal inferior esquerda após ressecção



Fonte: elaborada pelo autor.

Realizava-se a marcação da parte posterior das peças (cauda) com fio Nylon®, então, elas eram colocadas em recipientes com solução de paraformaldeído a 4%, onde permaneciam por 48 a 72 horas, sob refrigeração. Em seguida, as peças eram transferidas para recipientes com solução de sucrose a 20% e acondicionadas em freezer a -70°C até serem cortadas e coradas.

3.2 COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA

Foi confeccionada uma lâmina corada com hematoxilina de Harris (Laborclin®, Pinhais, PR) e com eosina amarelada (Inlab®, Diadema, SP) de cada concha nasal, para avaliar a preservação e integridade dos tecidos e para servir de referência nos estudos histomorfométricos.

3.3 PREPARO DOS CORTES PARA IMUNOFLOURESCÊNCIA

As conchas nasais eram posicionadas com suas faces septais voltadas para cima e porções anteriores voltadas para a direita, sendo então tomadas as suas medidas: altura e comprimento relativos a seus maiores eixos (Figura 2).

Figura 2 - Medição da concha inferior



Fonte: elaborada pelo autor.

Na sequência, elas eram pesadas em balança de precisão (Figura 3).

Figura 3 - Pesagem da concha inferior



Fonte: elaborada pelo autor.

As conchas nasais foram, então, seccionadas em três segmentos e a porção central de cada uma foi utilizada para a confecção das lâminas (Figura 4).

Figura 4 - Secção da concha em três segmentos



Fonte: elaborada pelo autor.

Cada porção central foi então posicionada de modo a se ter uma visão de aspecto coronal do segmento da concha inferior (Figura 5).

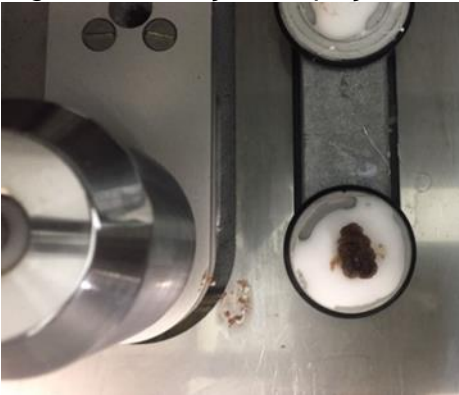
Figura 5 - Segmento central em posicionamento de aspecto coronal



Fonte: elaborada pelo autor.

A peça era, assim, ajustada na base do criostato, com sua face superior alinhada ao marco de referência e fixada com Jung TissueFreezing Medium® (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) (Figura 6).

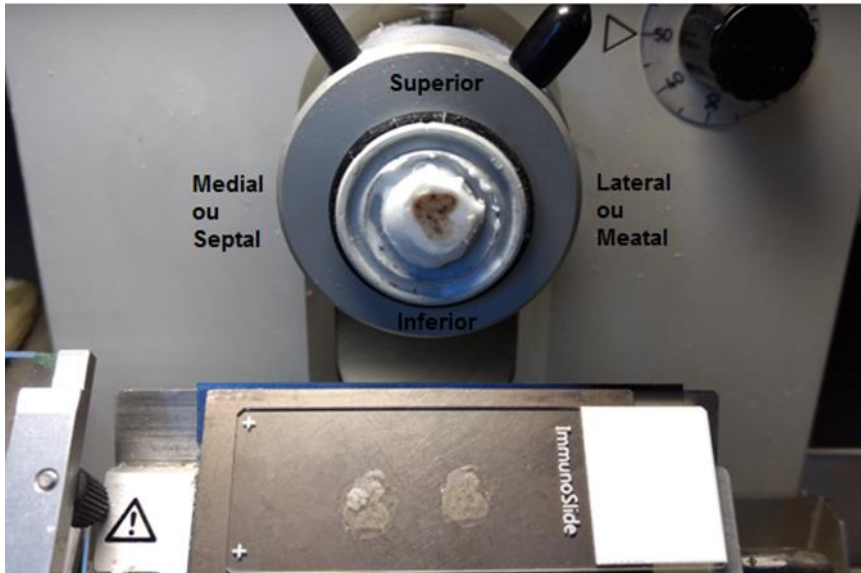
Figura 6 - Fixação da peça na base



Fonte: elaborada pelo autor.

A base era então posicionada com seu marco de referência voltado para a parte superior do criostato, assegurando-se a correta identificação das regiões da concha na lâmina (Figura 7). Realizaram-se cortes com espessura de 50µm, em criostato Leica® modelo CM1850 (LeicaMicrosystems, Nussloch, Germany), à temperatura de -18 a -20°C.

Figura 7 - Ajuste da base no criostato com as referências e disposição dos cortes na lâmina



Fonte: elaborada pelo autor.

3.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A preparação das lâminas seguiu o método de imunofluorescência com anticorpo primário PGP 9,5 e anticorpo secundário Alexa flúor 488, descrito por JEW e colaboradores (JEW *et al.*, 2003).

As secções foram lavadas quatro vezes por 15 minutos com solução fria de tampão fosfato-salino a 0,1 mol (0,1M TFS, Laborclin®, Pinhais, PR) contendo 3% de Triton X-100 (TX-100, Inlab®, Diadema, SP), seguido de incubação por duas horas na temperatura ambiente, com solução de bloqueio contendo 4% de soro normal de cabra (Jackson Immuno Research Inc., West Grove, PA), 0,25% de albumina sérica bovina (Inlab®, Diadema, SP), 2% de TX-100 e 0,1M TFS.

Os tecidos foram lavados por 15 minutos, quatro vezes com 0,1M TFS gelado e incubado com anticorpo primário por 18 a 20 horas a 4°C. O anticorpo primário foi o PGP 9,5 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL), diluído em 1:200 em solução consistindo de 0,5% TX-100 em 0,1M TFS. Em seguida, foi lavado quatro vezes por 15 minutos em 0,1M TFS e então, incubado no escuro por duas horas na temperatura ambiente com o segundo anticorpo marcador fluorescente Alexa Flúor 488 – IgG (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL), diluído em 1:200 com os diluentes do anticorpo primário. As lâminas

foram protegidas da luz e foram realizadas uma série de lavagens: duas vezes por 15 minutos com 0,1M TFS frio, uma vez por 20 minutos com 0,05M TFS frio e uma vez com água destilada. As lâminas foram cobertas com lamínulas, colocadas em estojos e estocadas em refrigerador a -70° C.

3.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Avaliaram-se 06 cortes por imunofluorescência de cada indivíduo. As lâminas foram examinadas com microscópio confocal a laser equipado com epifluorescência (modelo LM 710, Carl Zeiss Inc., Jena, Alemanha). As secções foram vistas com epifluorescência, usando um filtro de excitação (492-630nm) para emissão de feixe (520-525nm) Dualexis – fluor 488.

Cada corte, foi examinado no aumento de 100 vezes para avaliar a orientação dos tecidos e mapear as estruturas de interesse. Quando identificadas, foram utilizados aumentos de 200 vezes e 400 vezes para ver maiores detalhes.

As estruturas identificadas nas lâminas estudadas de cada indivíduo foram fotografadas e suas dimensões, conformações e localização relativa foram avaliadas.

Para a avaliação e comparação da distribuição das terminações nervosas entre as faces das conchas nasais de cada indivíduo e entre os indivíduos, utilizou-se um sistema de pontuação semiquantitativo, através de uma tabela de escores ordinais, no qual os dados foram classificados em grupos categóricos definidos e organizados em uma progressão "ordenada" pela intensidade de ocorrência das terminações nervosas marcadas pelo anticorpo primário PGP 9,5 e evidenciadas pelo anticorpo secundário Alexa flúor 488.

Após tal quantificação, os dados foram combinados em uma pontuação total (Tabela 1), permitindo assim, a comparação entre indivíduos e entre porções da concha nasal, com a aplicação de testes estatísticos não paramétricos (GIBSON-CORLEY; OLIVIER; MEYERHOLZ, 2013).

Tabela 1 - Tabela de escores para quantificação da inervação

Escore	Intensidade de ocorrência das terminações
0	Ausência
1	Fraca
2	Moderada
3	Intensa

Fonte: Elaborada pelo autor.

Cada imagem selecionada e obtida a partir das fotografias das lâminas de imunofluorescência foi avaliada sem identificação específica, portanto, de maneira "cega", duas vezes por dois examinadores diferentes.

Os escores atribuídos por cada avaliador foram comparados entre si através do teste de concordância não paramétrico de Kappa e não demonstraram diferenças significantes intra ou interobservadores, validando, assim, a sua concordância e reprodutibilidade.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Calcularam-se a média e o desvio padrão para os dados descritivos: medidas das peças estudadas (peso, comprimento e altura).

As médias obtidas a partir dos valores resultantes das pontuações da tabela de escores para inervação, foram submetidas ao teste não paramétrico de Mann-Whitney para a avaliação de possíveis diferenças em função do sexo.

O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para a comparação das médias de escores relativas à inervação entre as faces septal e meatal.

A partir dos escores de inervação das faces septal e meatal, formulou-se também uma medida que foi chamada de inervação geral, correspondente à média obtida das médias entre os escores atribuídos pelos dois examinadores a cada uma das lâminas avaliadas.

Os programas Microsoft Excel 2007 e SPSS versão 20 foram utilizados para a realização dos procedimentos estatísticos.

4 RESULTADOS

Seis indivíduos foram selecionados para o estudo após passarem pelos critérios de exclusão e pela autorização por parte dos familiares, compondo a amostra da seguinte forma: três indivíduos do sexo masculino e três do sexo feminino com idades variando entre 16 e 76 anos (Tabela 2).

Tabela 2 - Sexo e idade dos indivíduos

Dados	Indivíduo 1	Indivíduo 2	Indivíduo 3	Indivíduo 4	Indivíduo 5	Indivíduo 6
Sexo	Masc	Masc	Fem	Fem	Masc	Fem
Idade	24,7 anos	25,9 anos	76,1 anos	16,0 anos	70,0 anos	41,0 anos

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados morfológicos gerais das peças anatômicas estudadas mostraram uma relativa uniformidade entre as dimensões altura e comprimento, com uma maior variação em relação ao peso das conchas nasais (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados morfológicos gerais das conchas nasais avaliadas

Dados	Indivíduo 1	Indivíduo 2	Indivíduo 3	Indivíduo 4	Indivíduo 5	Indivíduo 6	Média ± DP
Peso da Concha	1,292g	0,512g	2,451g	1,347g	3,110g	2,072g	1,8 (±0,9)
Comp. da Concha	4,3cm	3,3cm	4,4cm	3,4cm	4,6cm	3,8cm	4,0 (±0,5)
Altura da Concha	1,0cm	0,7cm	1,3cm	1,2cm	1,3cm	1,3cm	1,1 (±0,2)

DP: desvio padrão.

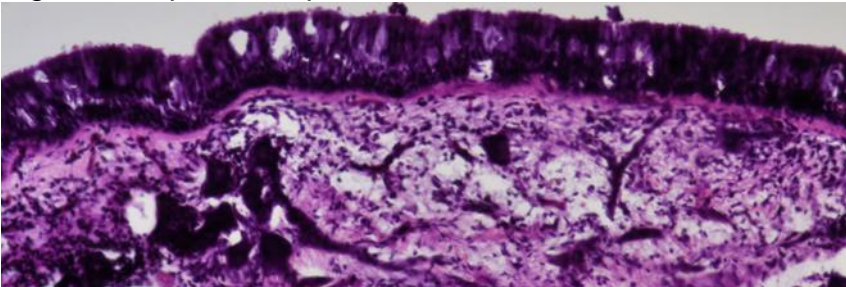
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1 COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA

A análise das lâminas coradas com hematoxilina-eosina sob microscopia óptica demonstrou aspectos típicos.

Conchas nasais inferiores revestidas por um epitélio respiratório pseudoestratificado cilíndrico ciliado, com células caliciformes, com uma membrana basal bem definida (Figura 8).

Figura 8 - Epitélio respiratório da concha nasal inferior

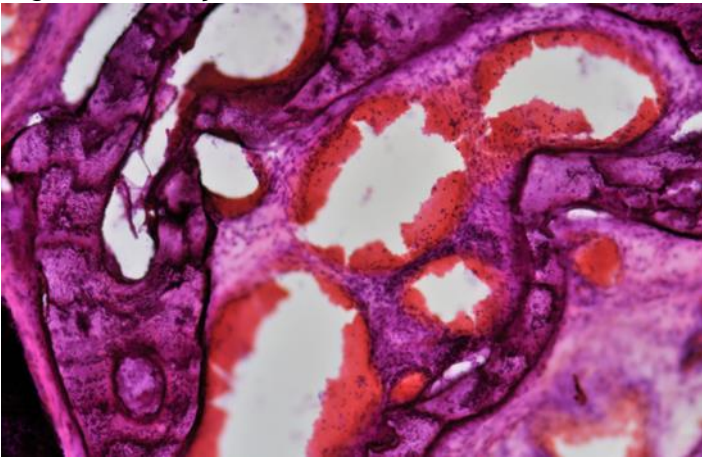


Aumento de 100x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Em suas porções mais profundas, um eixo ósseo, não homogêneo, com presença de um trabeculado fino e de vasos sanguíneos (Figura 9).

Figura 9 - Porção óssea da concha nasal inferior

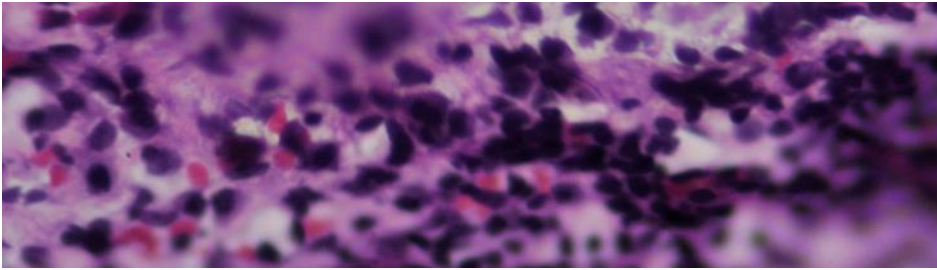


Aumento de 100x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Entre a membrana basal do epitélio e o tecido ósseo, apresentava-se a lâmina própria, correspondendo ao maior volume da concha nasal inferior. Na lâmina própria, foi encontrado um infiltrado inflamatório característico constituído, principalmente, por linfócitos (Figura 10).

Figura 10 - Infiltrado inflamatório na lâmina própria da concha nasal inferior

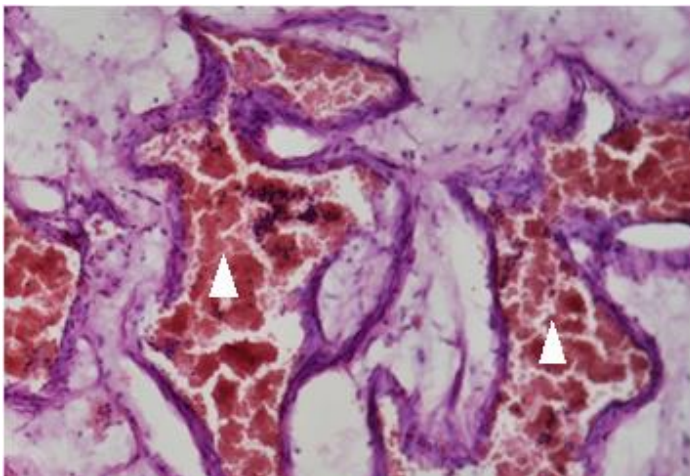


Aumento de 400x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Também estavam presentes na lâmina própria vasos sanguíneos constituídos por: sinusóides venosos (Figura 11) e arteríolas (Figura 12).

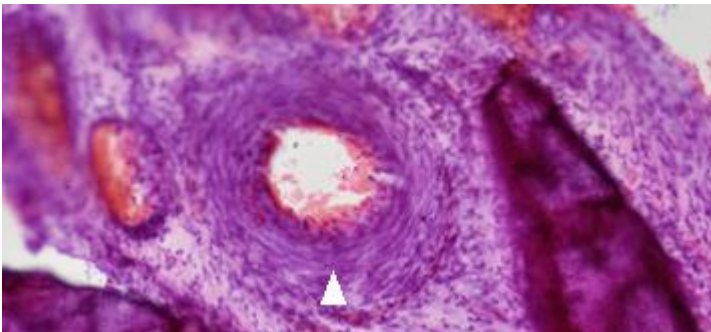
Figura 11 - Sinusóides venosos (cabeças de setas brancas) na lâmina própria da concha nasal inferior



Aumento de 100x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 12 - Arteríola (cabeça de seta branca) na lâmina própria da concha nasal inferior

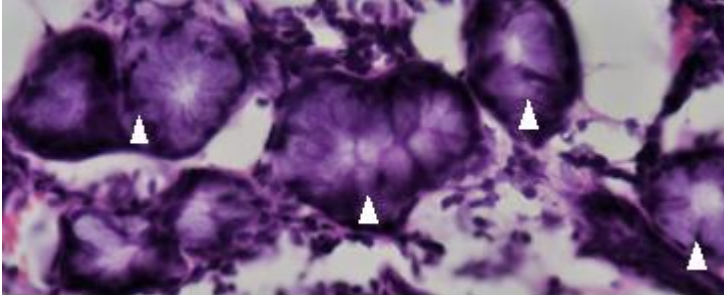


Aumento de 100x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Outro elemento característico encontrado na lâmina própria, sobretudo em suas camadas mais superficiais, foram glândulas seromucosas (Figura 13).

Figura 13 - Glândulas seromucosas (cabeças de setas brancas) na lâmina própria da concha nasal inferior

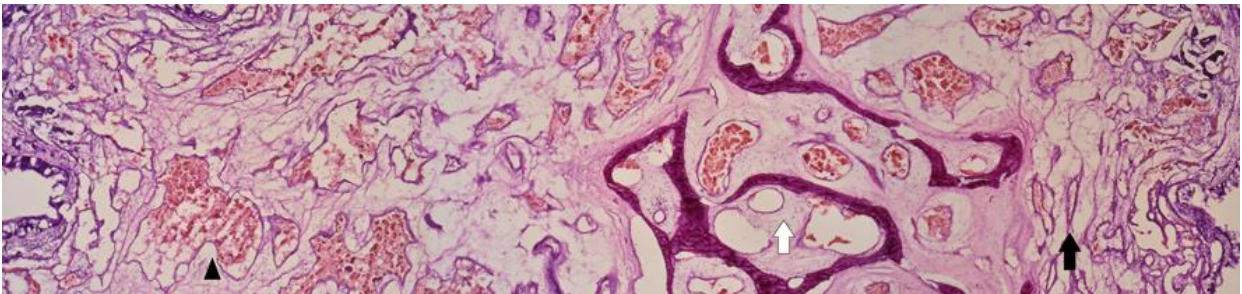


Aumento de 400x.

Fonte: elaborada pelo autor.

A porção medial (septal) da lâmina própria demonstrou ser mais espessa que a lateral (meatal) (Figura 14).

Figura 14 - Porção septal da lâmina própria (cabeça de seta preta), porção óssea (seta branca) e porção meatal da lâmina própria (seta preta)



Aumento de 50x.

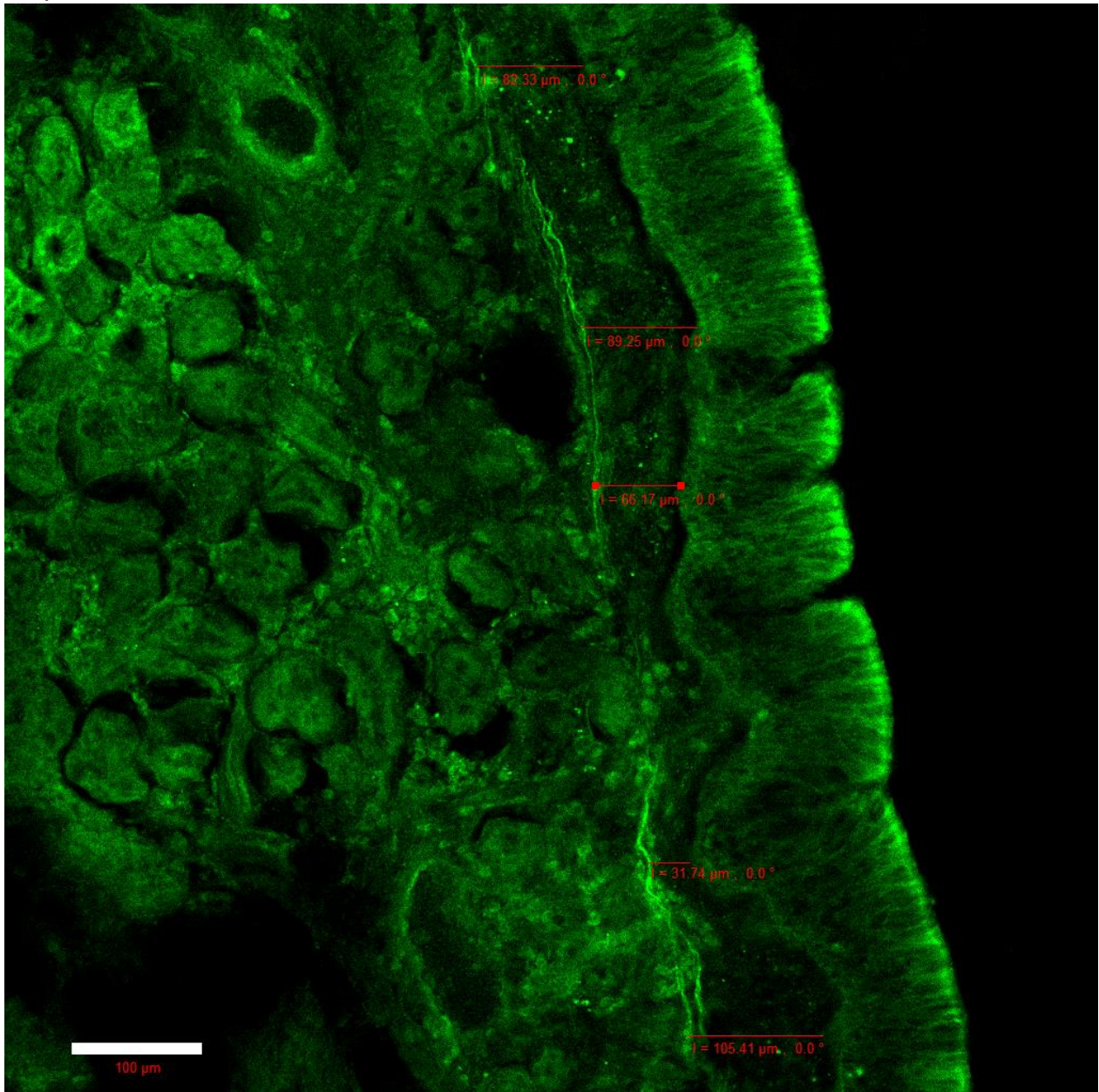
Fonte: elaborada pelo autor.

4.2 IMUNOFLORESCÊNCIA PARA ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-PGP 9,5

A análise das lâminas preparadas com imunofluorescência sob microscopia confocal de varredura a laser evidenciou a presença de terminações nervosas livres em todas as camadas da lâmina própria, com especial destaque para as porções mais superficiais.

Nessas regiões, as fibras aparecem em delicados fascículos com trajeto paralelo à superfície da mucosa, com as menores distâncias variando em pouco mais de 30µm até a membrana basal do epitélio respiratório (Figura 15).

Figura 15 - Terminações nervosas em proximidade à membrana basal do epitélio respiratório

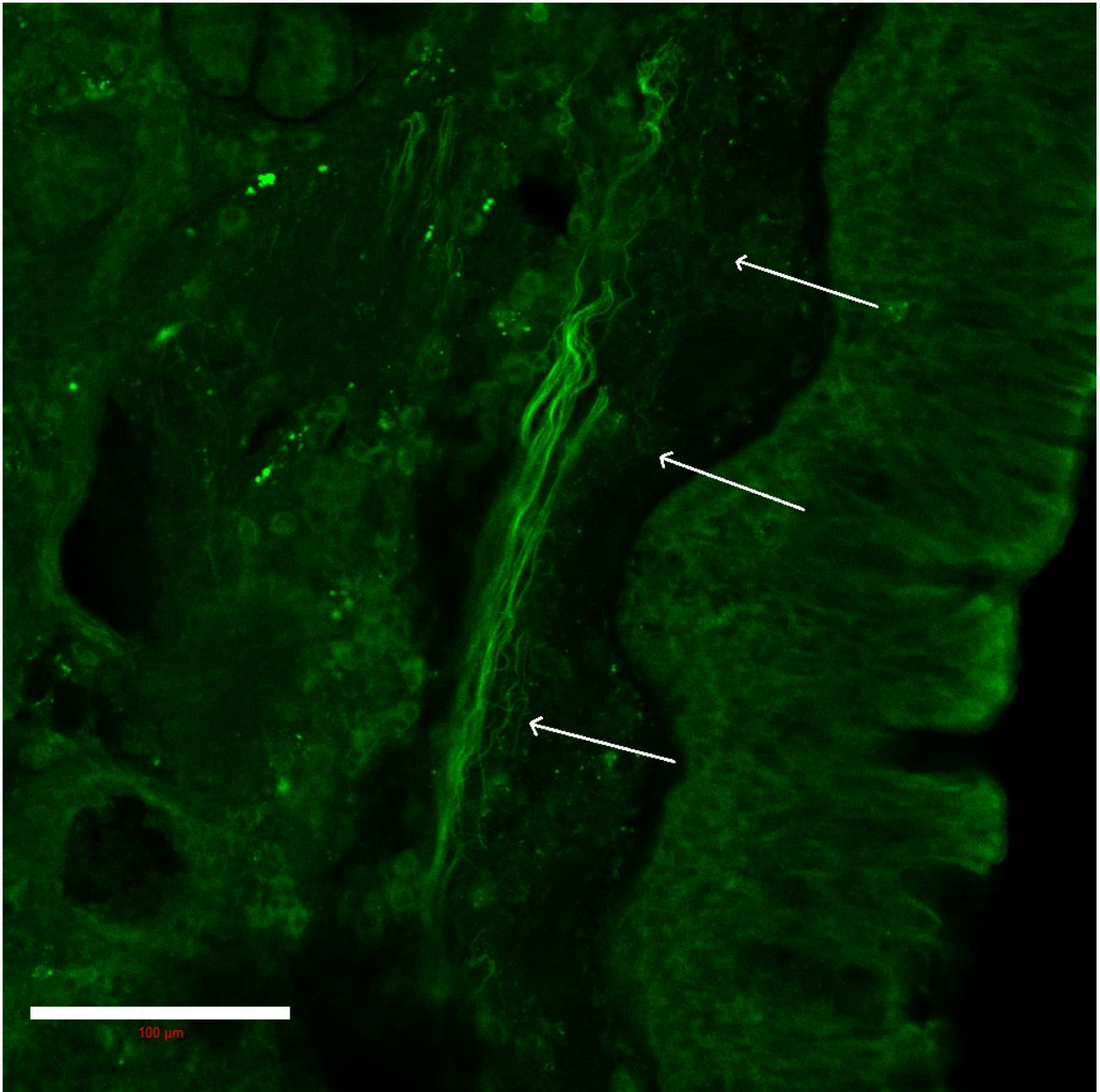


Barra = 100μm Aumento de 200x.

Fonte: elaborada pelo autor.

A conformação desses fascículos é de aspecto ondulado, percorrendo longas distâncias. Algumas terminações nervosas livres, com calibre de cerca de 1μm ou pouco menos, destacam-se do fascículo de origem e se insinuam em direção ao epitélio respiratório, aproximando-se ainda mais da zona da membrana basal (Figura 16).

Figura 16 - Terminações nervosas livres de aspecto ondulado, deixando o fascículo e se aproximando da membrana basal do epitélio respiratório

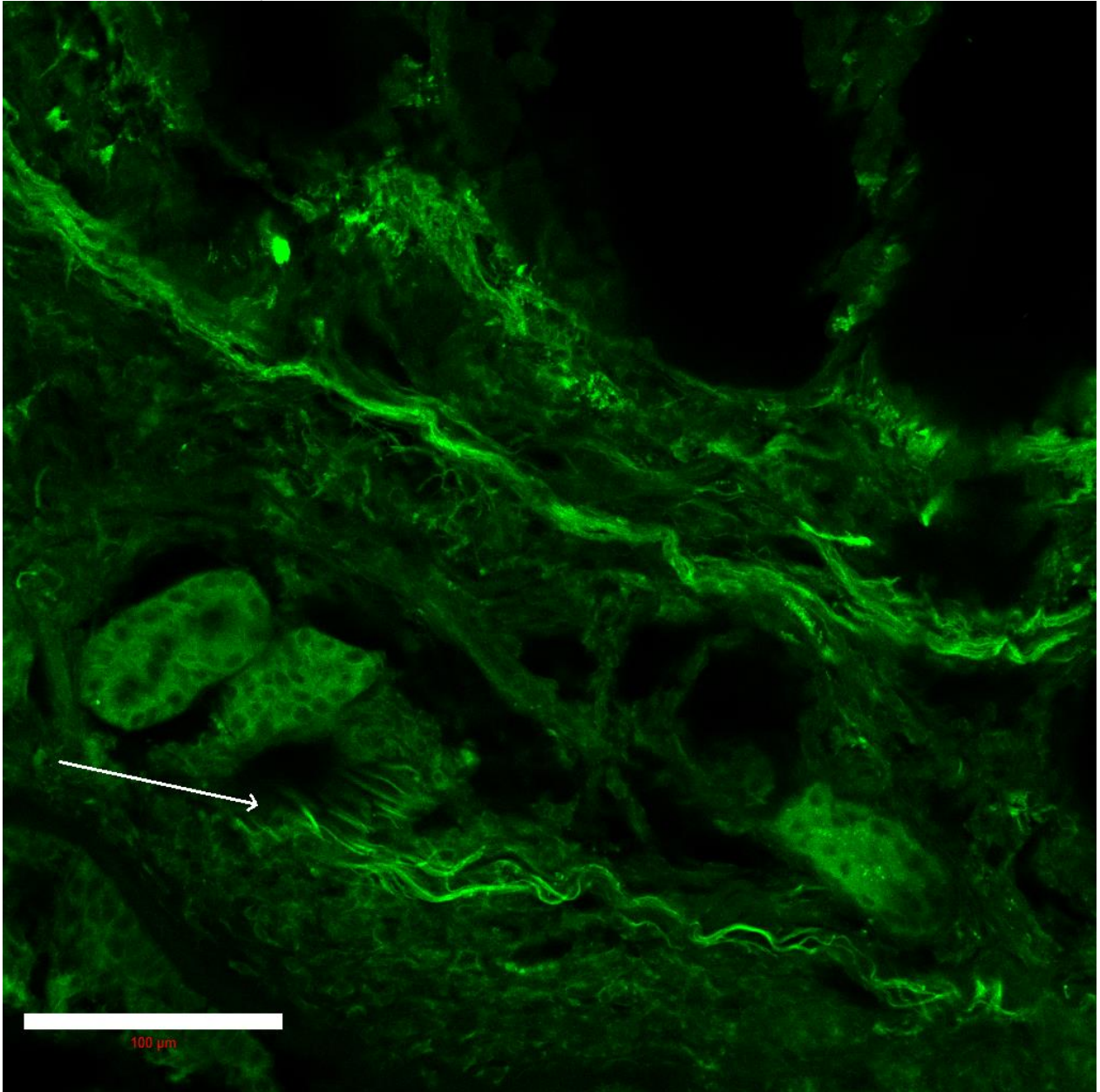


Barra = 100μm Aumento de 400x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Na camada mais superficial da lâmina própria da concha nasal inferior, foram encontradas também terminações nervosas mantendo íntima relação com as glândulas seromucosas (Figura 17), assim como com seus ductos excretórios (Figura 18).

Figura 17 - Terminações nervosas em proximidade a glândulas seromucosas

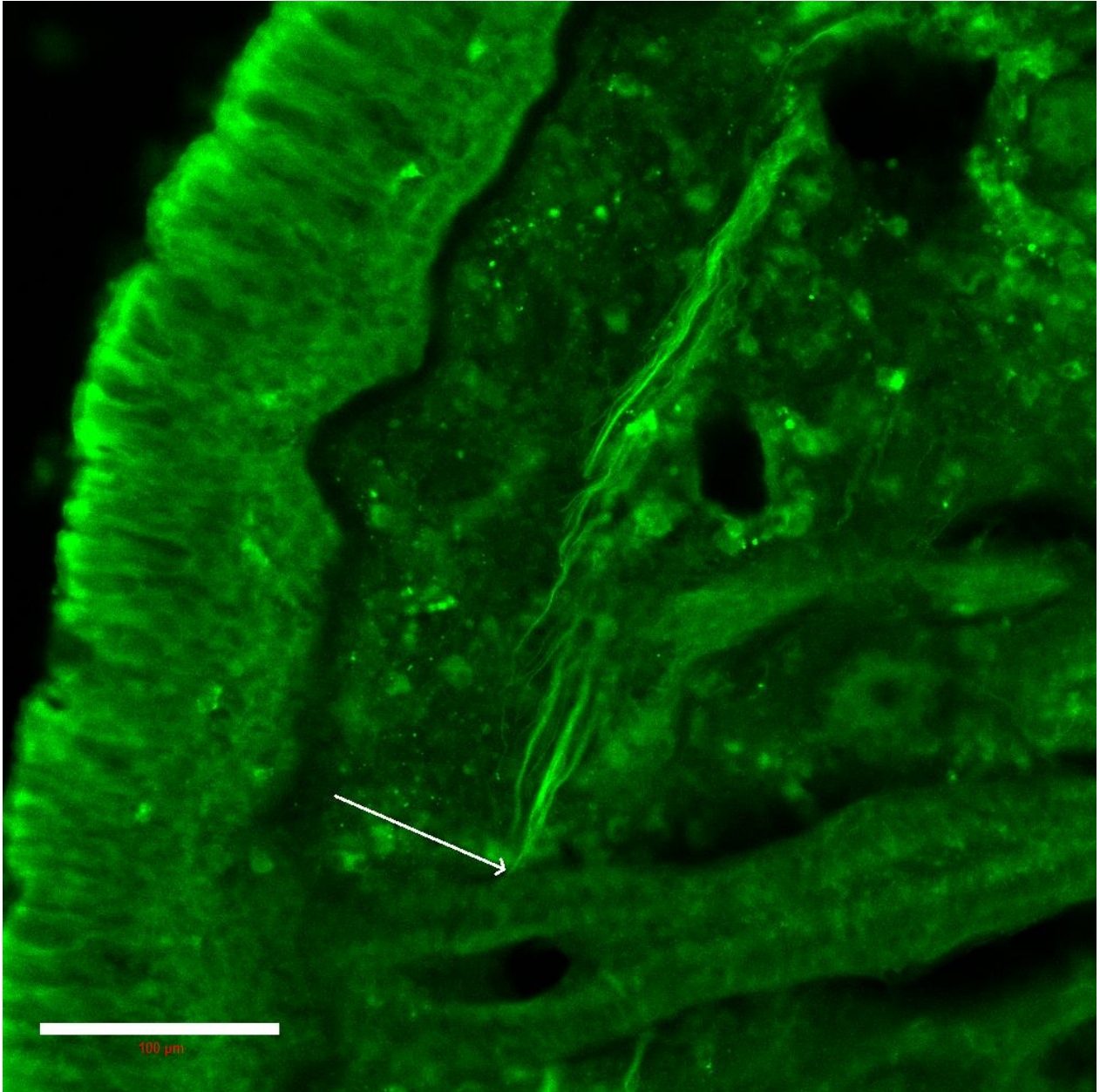


Barra = 100μm.

Aumento de 400x.

Fonte: elaborada pelo autor.

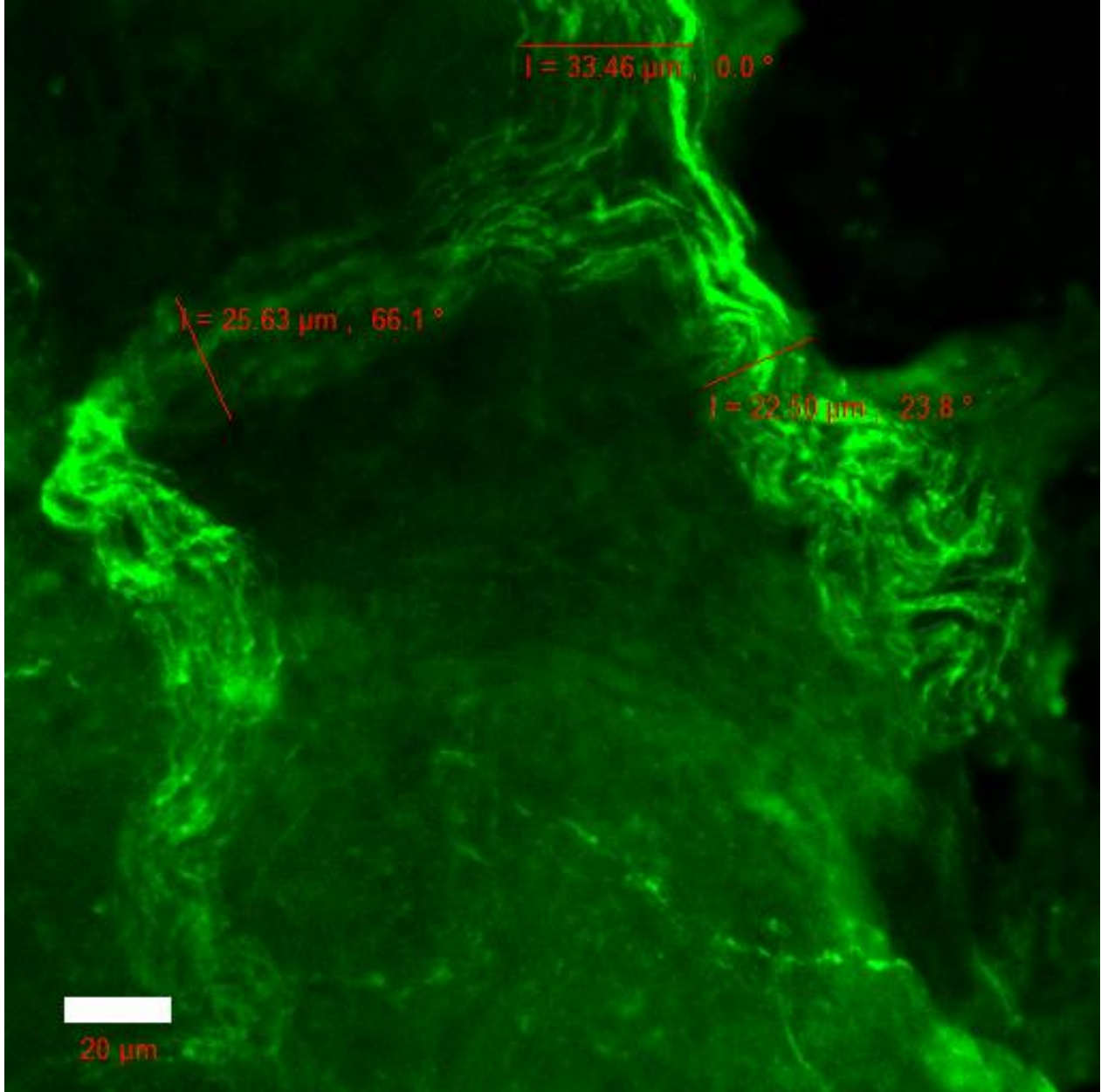
Figura 18 - Terminações nervosas em proximidade a ducto excretor de glândula seromucosa



Barra = 100μm Aumento de 400x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Nas camadas mais profundas da lâmina própria, fascículos nervosos mais calibrosos, medindo mais de 30μm de espessura, foram identificados. Tais estruturas tendem a se ramificar em direção a superfície, com redução progressiva de seu calibre (Figura 19).

Figura 19 - Fascículos nervosos mais calibrosos em camada profunda da lâmina própria



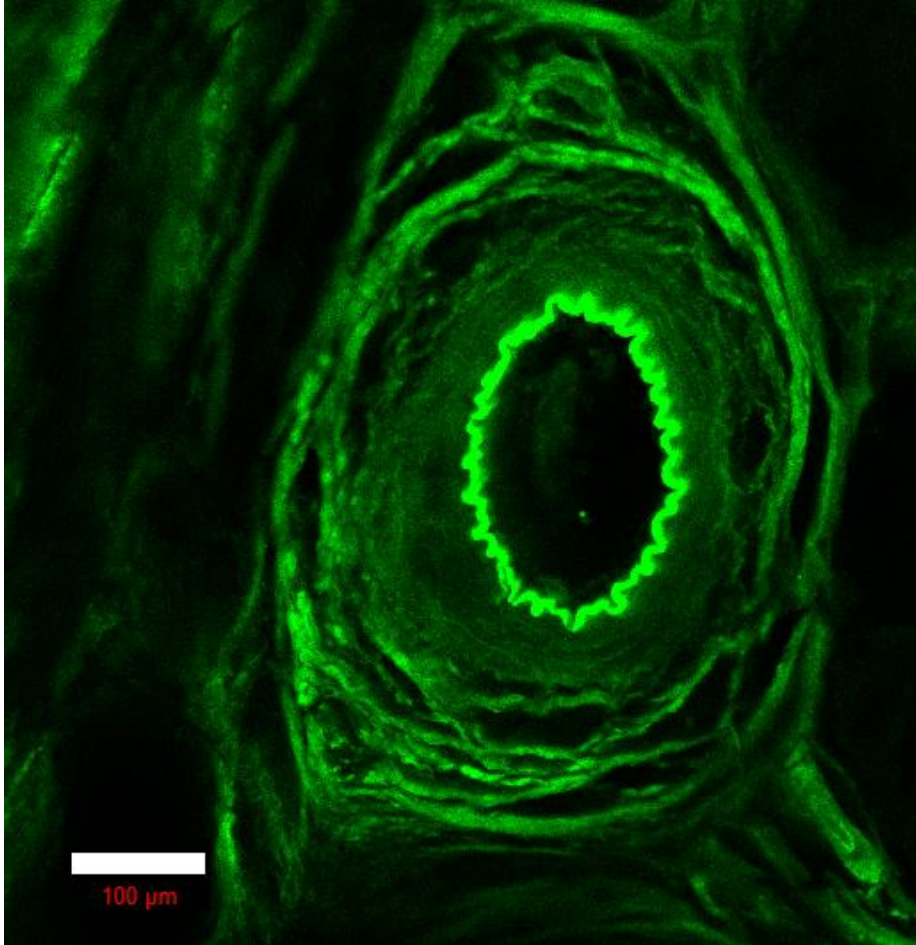
Barra = $20\mu\text{m}$ Aumento de 400x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Nessas regiões mais profundas da lâmina própria, arteríolas evidenciando imunorreatividade ao PGP 9,5 em camadas mais próximas ao endotélio de suas paredes foram visualizadas com frequência (Figura 20).

A presença dessas fibras nervosas em proximidade a sinusóides venosos foi mais escassa.

Figura 20 - Vaso sanguíneo arterial com imunorreatividade ao PGP 9,5 em suas paredes



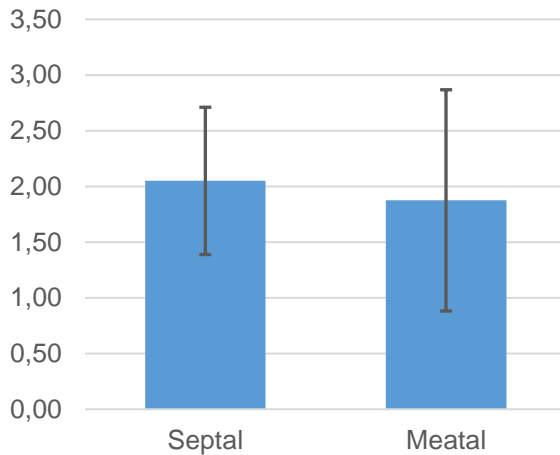
Barra = 100μm Aumento de 100x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Não foram evidenciadas terminações nervosas mais complexas, do tipo corpusculares, em nenhuma das lâminas avaliadas, mas tão somente terminações nervosas livres.

Não houve diferença na distribuição das terminações nervosas livres entre as camadas mais superficiais da lâmina própria, quando comparadas as faces septal e meatal das conchas nasais dos diversos indivíduos (Figura 21 e Tabela 4).

Figura 21 - Comparação das médias de distribuição das terminações nervosas entre as camadas superficiais da lâmina própria das faces septal e meatal, com IC de 95%



Fonte: Elaborada pelo autor.

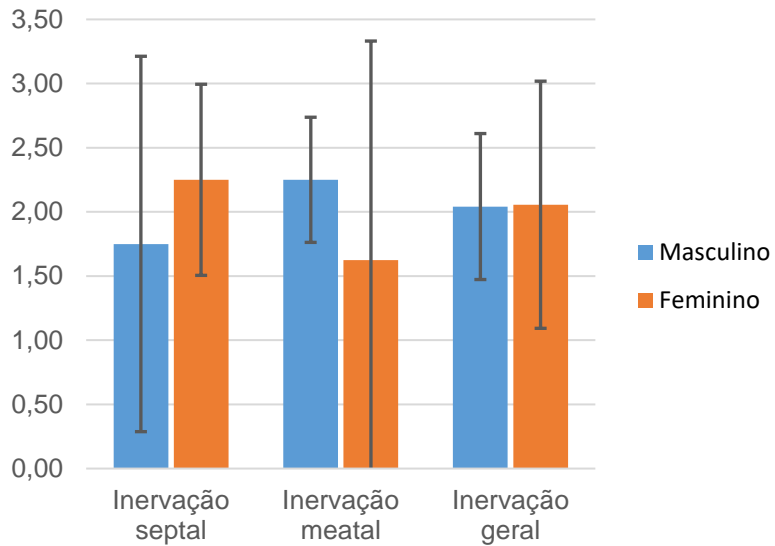
Tabela 4 - Comparação da inervação em função das faces: septal e meatal

Variável	Média (IC)	P-valor*
Septal	2,1 ($\pm 0,7$)	0,877
Meatal	1,9 ($\pm 1,0$)	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Da mesma forma, quando comparadas as médias de distribuição das terminações nervosas presentes em camadas mais superficiais da lâmina própria das faces septais, meatais ou mesmo a média geral de inervação, não houve diferença, estatisticamente significativa, em função do sexo dos indivíduos avaliados (Figura 22 e Tabela 5).

Figura 22 - Comparação das médias de distribuição das terminações nervosas em função do sexo, com IC de 95%



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 5 - Comparação da inervação das conchas nasais em função do sexo

Inervação	Masculino*	Feminino*	P-valor
Face septal	1,8 (±1,5)	2,3 (±0,7)	0,564
Face meatal	2,3 (±0,5)	1,6 (±1,7)	0,571
Geral	2,0 (±0,6)	2,1 (±1,0)	0,988

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

As terminações nervosas na mucosa nasal das conchas inferiores assumem papéis importantes no controle e mediação de diversos eventos fisiológicos. Ademais, também tomam parte no contexto de fenômenos patológicos, como a hiper-reatividade nasal observada em rinites crônicas. Dessa forma, ampliar o entendimento acerca de sua morfologia, relações estruturais e distribuição na mucosa, pode representar efetiva contribuição para o desenvolvimento de novas estratégias, ou otimização das já existentes, relativas ao manejo clínico e cirúrgico de pacientes com afecções nasais.

Nesse sentido, buscamos estabelecer padrões histomorfométricos das terminações nervosas presentes em conchas nasais inferiores, que fossem representativas de um estado de normalidade histológica. Para tanto, foram utilizados critérios de exclusão como histórico pessoal de manifestações clínicas nasais (crises esternutatórias, episódios frequentes de rinorréia e obstrução nasal), além de sinais macroscópicos de trauma local, processos inflamatórios ou neoplásicos.

A avaliação das conchas nasais inferiores através da coloração com hematoxilina-eosina confirmou a efetividade dos critérios de exclusão utilizados, uma vez que os espécimes da amostra selecionada apresentavam achados histológicos característicos entre as diversas camadas (epitélio respiratório, membrana basal do epitélio, lâmina própria e camada óssea) conforme dados histomorfológicos já descritos na literatura (BERGER; BALUM-AZIM; OPHIR, 2003), assegurando, assim, a integridade dos tecidos analisados.

Ao longo de um período de seis meses, destinado à coleta das peças, as pessoas autopsiadas, com características que respeitavam os critérios de exclusão estabelecidos e cujos familiares concordaram com as condições para participação no estudo, constituíram uma amostra de 06 indivíduos, comparável ao tamanho de amostras avaliadas em outros trabalhos que também analisaram terminações nervosas em tecidos humanos do trato respiratório superior (Quadro 1).

Quadro 1 - Trabalhos que também analisaram terminações nervosas em tecidos humanos do trato respiratório superior

Amostra	Autor/Ano	Título	Marcadores Neurais
06 indivíduos	CAUNA; HINDERER; WENTGES, 1969	Sensory receptor organs of the human nasal respiratory mucosa	Prata
03 indivíduos	JOHNSON; ELLER; JAFEK, 1997	Protein gene product 9.5-like and calbindin-like immunoreactivity in the nasal respiratory mucosa of perinatal humans	PGP 9,5
11 indivíduos	FIGUEROA; MANSILLA; SUBURO, 1998	Innervation of nasal turbinate blood vessels in rhinitic and non rhinitic children	PGP 9,5
03 indivíduos	LEITE et al., 2016	Morphology of nerve endings in vocal fold of human newborn	PGP 9,5

Fonte: elaborada pelo autor.

Padronizamos a ressecção da concha nasal inferior esquerda para obtermos uma maior homogeneidade dos espécimes coletados, bem como pelo fato de ser esse o lado, tecnicamente, mais fácil para um cirurgião destro, garantindo um corte mais preciso, uniforme e rente à inserção da concha.

Os segmentos mais centrais de cada concha nasal inferior foram escolhidos para a confecção das lâminas por apresentarem a maior altura, a porção óssea mais evidente e por estarem menos sujeitos a eventuais processos de metaplasia do epitélio respiratório, característico da porção mais anterior (cabeça).

O posicionamento desses segmentos centrais em aspecto coronal, durante o corte e preparo das lâminas, foi assim escolhido para permitir a adequada visualização e análise das diversas camadas e faces (septal e meatal) das conchas inferiores.

Para esse estudo, foi selecionado o anticorpo primário marcador pan-axonal antiproduto gênico protéico PGP 9,5 por ser um marcador neural mais geral, não restrito a subpopulações de células nervosas, resultando, assim, em uma visão mais ampla da inervação do tecido analisado, conforme se verifica em estudos realizados em tecidos humanos (JEW et al., 2003; HILLIGES et al., 1996; JOHNSON; ELLER; JAFEK, 1997) e de animais (YAMAMOTO et al., 1998; JOHNSON, 2000). Ao PGP 9,5 foi conjugado o fluoróforo Alexia Flúor 488.

Em modelo experimental de estudo de ligamentos do punho, Jew e colaboradores propuseram o uso da imunofluorescência com o anticorpo primário PGP 9,5 para a avaliação de terminações nervosas (JEW et al., 2003). Posteriormente, essa técnica foi aplicada em ligamento dorsal radiocarpal (TOMITA et al., 2007), na articulação interfalangeana proximal (CHIKENJI et al., 2010) e na articulação interfalangeana distal (CHIKENJI et al., 2011).

No presente trabalho, a técnica de imunofluorescência foi a mesma utilizada por Jew e colaboradores (JEW et al., 2003), com diferenciação na diluição do anticorpo primário, a qual foi alterada de 1:400 para 1:200, tendo em vista que essa concentração se mostrou mais adequada para a marcação das estruturas nervosas de interesse, nas condições do presente estudo. Essa diferenciação, possivelmente se deu em virtude das peculiaridades da mucosa nasal das conchas inferiores frente aos tecidos ligamentares avaliados por Jew e colaboradores. Dessa forma, o método demonstrou ser eficiente para o estudo, com detalhes, da morfologia das terminações nervosas das conchas nasais inferiores de humanos. Contudo, com a diluição de 1:200, também foi observado uma maior reatividade inespecífica de fundo, ou seja, um realce mais acentuado do chamado *background*, o que não comprometeu a diferenciação e estudo descritivo morfológico das terminações nervosas, mas dificultou a utilização de programas computacionais de análise de imagens para fins de cálculo de densidade dessas terminações. Em função disso, optou-se pela utilização de uma metodologia amplamente aplicada em estudos de histomorfometria, com o intuito de traduzir a percepção subjetiva que o examinador tem, frente à análise da expressão de um marcador tecidual específico, transformando essa percepção, através de uma tabela de escores, em dados quantitativos, os quais, dessa forma, podem ser submetidos aos testes estatísticos (FEDCHENKO; REIFENRATH, 2014).

Na microscopia convencional, se faz necessário o uso de cortes muito finos, uma vez que cortes mais espessos, maiores que três a cinco micrômetros, após a magnificação, produzem imagens ruins com menor contraste e resolução, em face da dissipação da luz por regiões não focadas, resultando em imagens que correspondem a planos de foco combinados. Por outro lado, a aplicação da técnica de imunofluorescência com o anticorpo primário PGP 9,5 permite o uso de microscopia confocal de varredura a laser, a qual, ao contrário da microscopia convencional, é capaz de avaliar cortes mais espessos de tecido,

em razão de sua propriedade de focar a imagem em estudo com grande resolução e mínima perda do contraste, no plano desejado, possibilitando a análise detalhada de estruturas nervosas em sua quase totalidade.

Em um trabalho com cachorros, analisando 10 animais, através da técnica de imuno-histoquímica com PGP 9,5 por microscopia óptica e eletrônica, identificou-se a presença de terminações nervosas corpusculares complexas, com expansões bulbares, laminares e varicosas, distribuídas na porção dorsal mais elevada do septo nasal e na concha nasal dorsal. As terminações apresentavam cerca de 300-500µm de comprimento e 100-250µm de largura. Alguns axônios originavam uma terminação única, enquanto outros se ramificavam em duas terminações. As terminações corpusculares estavam localizadas dentro do epitélio respiratório nasal. Essas terminações nervosas provavelmente seriam ativadas por mudanças de pressão (YAMAMOTO et al., 1998).

Trabalhos realizados em humanos, avaliando a mucosa da cavidade oral e da laringe, também identificaram a presença de terminações nervosas corpusculares (HILLIGES et al., 1996; VILLAVARDE et al., 1994; LEITE et al., 2016).

Em contraste com esses achados, o presente estudo das conchas nasais inferiores não identificou terminações nervosas mais complexas, do tipo corpusculares, mas tão somente foram evidenciadas terminações nervosas livres, o que está de acordo com dados da literatura (KEH et al., 2011; CAUNA; HINDERER; WENTGES, 1969).

Portanto, embora a mucosa nasal demonstre a capacidade de responder a estímulos mecânicos de pressão local contínua, como nos casos de tamponamento nasal com gases (ISHIZUKA; USUI, 1980), a transdução desse sinal não ocorre por meio de terminações nervosas complexas do tipo *Meissner-like*, mas sim através de terminações nervosas livres que possuem perfil polimodal, respondendo a estímulos diversos (térmicos, químicos, tácteis e mecânicos) em função da presença de canais iônicos receptores de potencial transitório (TRP) amplamente expressos em neurônios sensoriais.

As fibras aferentes trigeminais estão difusamente distribuídas na mucosa nasal e há a estimativa de que exista a expressão do termorreceptor TRPM8 em mais de 60% delas. Outros dois tipos de receptor também expressos em terminações nervosas sensoriais nasais são: o TRPV1 (um canal catiônico não seletivo ativado pela capsaicina, prótons e temperaturas acima de 43°C) e o TRPA1 (ativado em temperaturas inferiores às

do TRPM8, menos de 17°C, além de cinamaldeído e isotiocianato de alilo, o ingrediente ativo encontrado no óleo de mostarda). Em conchas nasais inferiores humanas, a imunorreatividade para TRPM8 foi determinada, principalmente, no epitélio ciliado e na lâmina própria, ao redor das glândulas e dos vasos sanguíneos, não havendo diferença significativa entre pacientes com ou sem rinite alérgica (LIU et al., 2015). TRPV1 foi detectado, sobretudo, no epitélio e subepitélio de pacientes com rinite, com pouca presença nas porções vasculares mais profundas da lâmina própria, ao contrário do TRPM8. Já as terminações TRPA1 positivas parecem ser mais escassas, sendo observadas em células epiteliais, em algumas poucas finas fibras subepiteliais e em fascículos nervosos mais profundos (BUDAY et al., 2012; KEH et al., 2011).

Os aspectos histomorfométricos das terminações nervosas livres identificadas no presente trabalho, em muito se assemelham às características descritas na publicação de CAUNA e colaboradores (CAUNA; HINDERER; WENTGES, 1969) que, utilizando preparações com prata, avaliaram as margens inferiores de conchas nasais de 06 indivíduos, com idades entre 18 e 39 anos e que se submeteram a procedimentos cirúrgicos nasais. Em relação a esse estudo, o nosso se diferencia pelo fato das conchas nasais inferiores terem sido ressecadas em sua totalidade e não apenas suas margens inferiores, permitindo a avaliação de todas as suas faces e camadas, além disso, foram excluídos indivíduos com histórico pessoal sugestivo de possível rinite/sinusite crônica.

A distribuição das terminações nervosas livres foi mais evidente nas camadas mais superficiais da lâmina própria, regiões que estão mais próximas à superfície do epitélio respiratório e, portanto, mais sujeitas aos estímulos reflexógenos da corrente de fluxo aéreo.

Embora se saiba que a corrente aérea exerce maior influência sobre a face septal, no presente trabalho, não foram observadas diferenças significativas entre a distribuição das terminações nervosas livres, quando comparadas as faces septal e meatal. Contudo, cabe ressaltar o fato de que o PGP 9,5 é um marcador pan-axonal e que, portanto, não faz distinção de receptores específicos. Assim sendo, é possível formular a hipótese de que, talvez, haja uma diferenciação na densidade de marcação das terminações nervosas livres, entre as faces septal e meatal, uma vez que se utilize um anticorpo primário específico para o canal TRPM8, o qual, possivelmente, concentre-se mais na face septal,

tendo em vista sua participação no processo de percepção do fluxo aéreo nasal e sensação de patência nasal.

Os dados obtidos no atual estudo sugerem ainda que o fator sexo também não influencia na distribuição dessas terminações nervosas livres. No entanto, como na literatura pesquisada não foram encontrados trabalhos fazendo essas correlações, fazem-se necessários mais estudos, com um número maior de observações, para a confirmação desses dados, utilizando-se, inclusive, marcadores específicos para receptores como o TRPM8.

Nossos achados apontam para a estreita relação entre as terminações nervosas livres e glândulas seromucosas presentes na lâmina própria assim como com seus ductos excretores e com os vasos sanguíneos, em especial, arteriais mais profundos, refletindo o importante papel da neuromodulação nos fenômenos de secreção glandular e controle vasomotor.

Contudo, especificamente em relação ao padrão de imunorreatividade das paredes dessas arteríolas, os nossos dados evidenciaram uma diferença em relação àqueles de uma outra publicação, que analisou o padrão de inervação dos vasos sanguíneos de conchas nasais médias de 11 crianças, utilizando, dentre outros anticorpos, o PGP 9,5 (FIGUEROA; MANSILLA; SUBURO, 1998): Figueroa e colaboradores descreveram uma maior marcação pelo PGP 9,5 nas camadas musculares mais externas das arteríolas, em contraste com a maior proximidade ao endotélio identificada em nossas lâminas.

Diante do exposto, fica evidente a grande importância dessas terminações nervosas livres no controle do microambiente das conchas nasais inferiores por meio de ações reflexógenas, com repercussões não apenas locais, mas também em outros órgãos, bem como seu papel na percepção do fluxo aéreo nasal, modulando a sensação de patência nasal.

Assim sendo, parece razoável inferir a hipótese de que tratamentos cirúrgicos mais conservadores, com maior preservação da camada superficial da lâmina própria das conchas nasais inferiores, a exemplo das turbinoplastias ou luxações laterais, poderiam talvez resultar em maior preservação das terminações nervosas livres, com menor impacto na neurofisiologia local, possibilitando desfechos pós-operatórios melhores, com maior

resolução da queixa clínica de obstrução nasal e menor índice de complicações como o *Empty Nose*.

6 CONCLUSÃO

Terminações nervosas livres foram identificadas em todas as porções da lâmina própria da concha nasal inferior, com uma maior concentração em suas camadas mais superficiais, onde se agrupam em delicados fascículos de conformação alongada e aspecto ondulado, em um trajeto paralelo ao epitélio respiratório, algumas delas com direcionamento mais próximo à membrana basal do epitélio.

As terminações nervosas também mantêm relação íntima com glândulas seromucosas e seus ductos, bem como com vasos sanguíneos, sobretudo arteriais.

Os dados obtidos não demonstram diferenças na distribuição dessas terminações quando comparadas as faces septal e meatal ou mesmo em função do sexo dos indivíduos avaliados, contudo, outros estudos e um número maior de observações, fazem-se necessários para a confirmação desses achados.

Não foram identificadas terminações nervosas corpusculares complexas.

O uso de microscopia confocal de varredura a laser e técnica de imunofluorescência com o anticorpo primário PGP 9,5 possui boa aplicabilidade no estudo histomorfométrico das terminações nervosas das conchas nasais inferiores de humanos.

REFERÊNCIAS

ADRIAN, D. Physiology of nose and paranasal sinuses. In: GLEESON, M. (Ed.). **Scott-Brown's Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery**. 7. ed., v.2, 2008. p.1364.

ASSANASEN, P. et al. Warming of feet elevates nasal mucosal surface temperature and reduces the early response to nasal challenge with allergen. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 104, n. 2, p. 285-293, 1999. ISSN 0091-6749.

AUGUSTO, A. G. L. B. et al. Histologia e fisiologia da mucosa nasossinusal e olfação. In: SILVIO; NETO, C. (Ed.). **Tratado de otorrinolaringologia e cirurgia cervicofacial**. 2. ed. São Paulo: rocha v.1, 2011. cap. 33, p.641-661.

BABATOLA, F. Reciprocal changes in nasal resistance in response to changes in posture. **Rhinology**, v. 36, n. 2, p. 69-72, 1998. ISSN 0300-0729.

BAMFORD, O.; ECCLES, R. The central reciprocal control of nasal vasomotor oscillations. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 394, n. 2, p. 139-143, 1982. ISSN 0031-6768.

BARANIUK, J. N.; MERCK, S. J. New concepts of neural regulation in human nasal mucosa. **Acta Clinica Croatica**, v. 48, n. 1, p. 65, 2009.

BERGER, G.; BALUM-AZIM, M.; OPHIR, D. The normal inferior turbinate: histomorphometric analysis and clinical implications. **The Laryngoscope**, v. 113, n. 7, p. 1192-1198, 2003. ISSN 1531-4995.

BLOM, H. et al. Intranasal capsaicin is efficacious in non-allergic, non-infectious perennial rhinitis. A placebo-controlled study. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 27, n. 7, p. 796-801, 1997. ISSN 1365-2222.

BRAAT, J. P. et al. Intranasal cold dry air is superior to histamine challenge in determining the presence and degree of nasal hyperreactivity in nonallergic noninfectious perennial rhinitis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 157, n. 6, p. 1748-1755, 1998. ISSN 1535-4970.

BUDAY, T. et al. Modulation of cough response by sensory inputs from the nose-role of trigeminal TRPA1 versus TRPM8 channels. **Cough**, v. 8, n. 1, p. 1, 2012. ISSN 1745-9974.

BUSH, R. K. Etiopathogenesis and management of perennial allergic rhinitis. **Treatments in respiratory medicine**, v. 3, n. 1, p. 45-57, 2004. ISSN 1176-3450.

CAUNA, N.; HINDERER, K. H.; WENTGES, R. T. Sensory receptor organs of the human nasal respiratory mucosa. **American Journal of Anatomy**, v. 124, n. 2, p. 187-209, 1969. ISSN 1553-0795.

CHHABRA, N.; HOUSER, S. M. The diagnosis and management of empty nose syndrome. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 42, n. 2, p. 311-330, 2009. ISSN 0030-6665.

CHIKENJI, T. et al. Distribution of nerve endings in human distal interphalangeal joint and surrounding structures. **The Journal of hand surgery**, v. 36, n. 3, p. 406-412, 2011. ISSN 0363-5023.

CHIKENJI, T. et al. Distribution of nerve endings in the human proximal interphalangeal joint and surrounding structures. **The Journal of hand surgery**, v. 35, n. 8, p. 1286-1293, 2010. ISSN 0363-5023.

COURTISS, E. H.; GOLDWYN, R. M. Resection of obstructing inferior nasal turbinates: a 10-year follow-up. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 86, n. 1, p. 152-154, 1990. ISSN 0032-1052.

DOLCI, J. E. L. Modelo estrutural e ultra-estrutural do epitélio da mucosa da concha nasal inferior em pacientes com rinite alérgica Modelo estrutural e ultra-estrutural do epitélio da mucosa da concha nasal inferior em pacientes com rinite alérgica. 1994.

ECCLES, R. Menthol: effects on nasal sensation of airflow and the drive to breathe. **Current allergy and asthma reports**, v. 3, n. 3, p. 210-214, 2003. ISSN 1529-7322.

ECCLES, R.; MORRIS, S.; TOLLEY, N. The effects of nasal anaesthesia upon nasal sensation of airflow. **Acta oto-laryngologica**, v. 106, n. 1-2, p. 152-155, 1988. ISSN 0001-6489.

FEDCHENKO, N.; REIFENRATH, J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue—a review. **Diagnostic pathology**, v. 9, n. 1, p. 221, 2014. ISSN 1746-1596.

FIGUEROA, J. M.; MANSILLA, E.; SUBURO, A. M. Innervation of nasal turbinate blood vessels in rhinitic and nonrhinitic children. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 157, n. 6, p. 1959-1966, 1998. ISSN 1535-4970.

FONTANARI, P. et al. Changes in airway resistance induced by nasal inhalation of cold dry, dry, or moist air in normal individuals. **Journal of Applied physiology**, v. 81, n. 4, p. 1739-1743, 1996. ISSN 8750-7587.

FONTANARI, P. et al. Nasal eupnoeic inhalation of cold, dry air increases airway resistance in asthmatic patients. **European Respiratory Journal**, v. 10, n. 10, p. 2250-2254, 1997. ISSN 0903-1936.

GIBSON-CORLEY, K. N.; OLIVIER, A. K.; MEYERHOLZ, D. K. Principles for valid histopathologic scoring in research. **Veterinary pathology**, v. 50, n. 6, p. 1007-1015, 2013. ISSN 0300-9858.

GLEBOVSKIĬ, V.; BAEV, A. [Stimulation of trigeminal receptors of the nasal mucosa by respiratory airflow]. **Fiziologicheskii zhurnal SSSR imeni IM Sechenova**, v. 70, n. 11, p. 1534-1541, 1984. ISSN 0015-329X.

GOODEN, B. A. Mechanism of the human diving response. **Integrative physiological and behavioral science**, v. 29, n. 1, p. 6-16, 1994. ISSN 1053-881X.

HILLIGES, M. et al. Protein gene product 9.5-immunoreactive nerves and cells in human oral mucosa. **Anatomical Record**, v. 245, n. 4, p. 621-632, 1996. ISSN 0003-276X.

ISHIZUKA, Y.; USUI, N. Temporal change in the airway resistance following stimulation of the nasal mucosa. **Auris Nasus Larynx**, v. 7, n. 3, p. 141-149, 1980. ISSN 0385-8146.

JACKSON, L. E.; KOCH, J. R. Controversies in the management of inferior turbinate hypertrophy: a comprehensive review. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 103, n. 1, p. 300-312, 1999. ISSN 0032-1052.

JEW, J. et al. Fluorescence immunohistochemistry and confocal scanning laser microscopy A protocol for studies of joint innervation. **Acta Orthopaedica**, v. 74, n. 6, p. 689-696, 2003. ISSN 1745-3674.

JOHNSON, E. W. Immunocytochemical characteristics of cells and fibers in the nasal mucosa of young and adult macaques. **The Anatomical Record**, v. 259, n. 2, p. 215-228, 2000. ISSN 1097-0185.

JOHNSON, E. W.; ELLER, P. M.; JAFEK, B. W. Protein gene product 9.5-like and calbindin-like immunoreactivity in the nasal respiratory mucosa of perinatal humans. **The Anatomical Record**, v. 247, n. 1, p. 38-45, 1997. ISSN 1097-0185.

JONES, T. C. Turbinectomy. **Lancet**, v. 2, n. 879, p. 496, 1895.

KEH, S. M. et al. The menthol and cold sensation receptor TRPM8 in normal human nasal mucosa and rhinitis. **Rhinology**, v. 49, n. 4, p. 453-457, 2011. ISSN 0300-0729.

KIMBELL, J. S. et al. Changes in nasal airflow and heat transfer correlate with symptom improvement after surgery for nasal obstruction. **Journal of biomechanics**, v. 46, n. 15, p. 2634-2643, 2013. ISSN 0021-9290.

LACROIX, J. et al. Improvement of symptoms of non-allergic chronic rhinitis by local treatment with capsaicin. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 21, n. 5, p. 595-600, 1991. ISSN 1365-2222.

LAI, V. W.; COREY, J. The objective assessment of nasal patency. **Ear, nose & throat journal**, v. 72, n. 6, p. 395-400, 1993. ISSN 0145-5613.

LEITE, J. G. S. et al. Morphology of nerve endings in vocal fold of human newborn. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 89, p. 55-59, 2016. ISSN 0165-5876.

LINDEMANN, J. et al. Impact of menthol inhalation on nasal mucosal temperature and nasal patency. **American journal of rhinology**, v. 22, n. 4, p. 402-405, 2008. ISSN 1050-6586.

LIU, S.-C. et al. Identification of the cold receptor TRPM8 in the nasal mucosa. **American journal of rhinology & allergy**, v. 29, n. 4, p. e112-e116, 2015. ISSN 1945-8924.

LUCIER, G. E.; EGIZII, R. Characterization of cat nasal afferents and brain stem neurones receiving ethmoidal input. **Experimental neurology**, v. 103, n. 1, p. 83-89, 1989. ISSN 0014-4886.

MCKEEGAN, D. E. Mechano-chemical nociceptors in the avian trigeminal mucosa. **Brain research reviews**, v. 46, n. 2, p. 146-154, 2004. ISSN 0165-0173.

MION, O.; MELLO JÚNIOR, J. F. Rinites Não Alérgicas. In: NETO, S. C. (Ed.). **Tratado de otorrinolaringologia e cirurgia cervicofacial**. 2.ed. São Paulo: Roca, v.3, 2011. cap. 5, p.47-64

NACLERIO, R. M.; BACHERT, C.; BARANIUK, J. N. Pathophysiology of nasal congestion. 2010.

OPHIR, Dov et al. Long-term follow-up of the effectiveness and safety of inferior turbinectomy. **Plastic and reconstructive Surgery**, v. 90, n. 6, p. 980-984, 1992.

PASSÀLI, D. et al. Treatment of inferior turbinate hypertrophy: a randomized clinical trial. **Annals of Otology, Rhinology & Laryngology**, v. 112, n. 8, p. 683-688, 2003. ISSN 0003-4894.

RAZAQ, A. S. A.; MOHAMAD, I.; SALIM, R. Mechanoreceptors in the nose. **Egyptian Journal of Ear, Nose, Throat and Allied Sciences**, v. 16, n. 1, p. 9-12, 2015. ISSN 2090-0740.

SARIN, S. et al. The role of the nervous system in rhinitis. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 118, n. 5, p. 999-1014, 2006. ISSN 0091-6749.

SCHEITHAUER, M. O. Surgery of the turbinates and “empty nose” syndrome. **GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery**, v. 9, 2010.

SKONER, D. P. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 108, n. 1, p. S2-S8, 2001. ISSN 0091-6749.

STEWART, M.; FERGUSON, B.; FROMER, L. Epidemiology and burden of nasal congestion. **International journal of general medicine**, v. 3, p. 37-45, 2010. ISSN 1178-7074.

SULLIVAN, C. D. et al. Perception of better nasal patency correlates with increases in mucosal cooling after surgery for nasal obstruction. **Otolaryngology--head and neck surgery**, v. 150, n. 1, p. 139-147, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3917722/> >.

TOMITA, K. et al. Distribution of nerve endings in the human dorsal radiocarpal ligament. **The Journal of hand surgery**, v. 32, n. 4, p. 466-473, 2007. ISSN 0363-5023.

TSUBONE, H. Nasal ‘pressure’ receptors. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 52, n. 2, p. 225-232, 1990.

VAN RIJSWIJK, J. et al. Inflammatory cells seem not to be involved in idiopathic rhinitis. **Rhinology**, v. 41, n. 1, p. 25-30, 2003. ISSN 0300-0729.

VAN RIJSWIJK, J. et al. Intranasal capsaicin reduces nasal hyperreactivity in idiopathic rhinitis: a double-blind randomized application regimen study. **Allergy**, v. 58, n. 8, p. 754-761, 2003. ISSN 1398-9995.

VILLAVERDE, R. et al. Nerve endings in the epithelium and submucosa of human epiglottis. **Acta oto-laryngologica**, v. 114, n. 4, p. 453-457, 1994. ISSN 0001-6489.

WALLOIS, F. et al. Trigeminal nasal receptors related to respiration and to various stimuli in cats. **Respiration physiology**, v. 85, n. 1, p. 111-125, 1991. ISSN 0034-5687.

WARWICK-BROWN, N.; MARKS, N. Turbinate Surgery: How Effective Is It? **Orl**, v. 49, n. 6, p. 314-320, 1987. ISSN 1423-0275.

WILLATT, D.; JONES, A. The role of the temperature of the nasal lining in the sensation of nasal patency. **Clinical Otolaryngology & Allied Sciences**, v. 21, n. 6, p. 519-523, 1996. ISSN 1365-2273.

YAMAMOTO, Y. et al. Morphology of intraepithelial corpuscular nerve endings in the nasal respiratory mucosa of the dog. **Journal of anatomy**, v. 193, n. 04, p. 581-586, 1998. ISSN 1469-7580.

YANIV, E. et al. Objective and subjective nasal airflow. **American journal of otolaryngology**, v. 18, n. 1, p. 29-32, 1997. ISSN 0196-0709.

YEPES-NUNEZ, J. et al. Assessment of nasal obstruction: correlation between subjective and objective techniques. **allergologia et immunopathologia**, v. 41, n. 6, p. 397-401, 2013. issn 0301-0546.

ZHAO, K. et al. Perceiving nasal patency through mucosal cooling rather than air temperature or nasal resistance. **Plos One**, v. 6, n. 10, p. e24618, 2011. ISSN 1932-6203.

ZHAO, K. et al. Regional peak mucosal cooling predicts the perception of nasal patency. **The Laryngoscope**, v. 124, n. 3, p. 589-595, 2014. ISSN 1531-4995

APÊNDICES

APÊNDICE A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: HISTOMORFOMETRIA DAS TERMINAÇÕES NERVOSAS LIVRES DAS CAVIDADES NASAIS

Pesquisador: MAGNO ERIC BARBOSA PEIXOTO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 19797513.2.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Cirurgia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 470.149

Data da Relatoria: 21/11/2013

Apresentação do Projeto:

Serão retirados três fragmentos das cavidades nasais de 15 cadáveres, dos quais, cinco com idade acima de 60 anos (idosos), cinco entre 25 e 59 anos (adultos) e cinco entre 20 e 24 anos (adultos jovens). Após aplicação do TCLE, serão ressecados, por via endoscópica, três fragmentos da cavidade nasal esquerda de cada cadáver, de aproximadamente 1cm² e 0,3 cm de profundidade das seguintes regiões: porção superior do septo nasal, terço anterior da concha média e terço anterior da concha inferior. Análises quantitativas e qualitativas das terminações nervosas livres das cavidades nasais, a partir de lâminas preparadas com imunofluorescência, examinadas com microscópio confocal a laser e histomorfometria para a presença de terminações nervosas livres, dando ênfase na identificação dos tipos de terminações nervosas, bem como em sua distribuição. Os seguintes dados serão evidenciados: densidade, diâmetros e características morfológicas dos axônios terminais. O número de secções contendo terminações livres será calculado de acordo com o percentual total de secções. A densidade de cada terminação nervosa livre nas secções dos fragmentos será avaliada através de um sistema de análise de imagem (KONTRON KS-400) baseado nos princípios histomorfométricos. Posteriormente serão relacionados com a quantidade de terminações nervosas livres presentes em cada área das cavidades nasais por testes estatísticos paramétrico e não paramétrico e correlacionando com as diferentes faixas etárias dos indivíduos

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-270
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 Fax: (85)3223-2903 E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 470.149

estudados.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal deste estudo é avaliar a distribuição das terminações nervosas livres nas cavidades nasais.

Objetivos específicos: 1. Comparar de forma quantitativa e qualitativa a distribuição das terminações nervosas nas regiões: septal, conchas nasais médias e conchas nasais inferiores. 2. Comparar de forma quantitativa e qualitativa a distribuição das terminações nervosas das cavidades nasais de idosos, adultos e adultos jovens.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: Por se tratar de estudo realizado a partir de amostras retiradas de cadáveres, não há risco significativo evidente.

BENEFÍCIOS: Aprofundar o conhecimento médico-científico acerca das terminações nervosas livres das cavidades nasais, contribuindo, assim, para o entendimento da fisiologia nasal, bem como dos processos patológicos relacionadas ao funcionamento e integridade dessas terminações.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram todos apresentados. O TCLE foi refeito.

Recomendações:

Sem Recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127
 Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-270
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3366-8344 Fax: (85)3223-2903 E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 470.149

FORTALEZA, 27 de Novembro de 2013

Assinador por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-270
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 Fax: (85)3223-2903 E-mail: comepe@ufc.br

APÊNDICE B – DADOS GERAIS DOS INDIVÍDUOS.

Dados	Indivíduo 1	Indivíduo 2	Indivíduo 3	Indivíduo 4	Indivíduo 5	Indivíduo 6	Média ± DP
Sexo	Masc	Masc	Fem	Fem	Masc	Fem	
Idade	24,7 anos	25,9 anos	76,1 anos	16,0 anos	70,0 anos	41,0 anos	42,3 (±25,2)
Cor	Pardo	Pardo	Branca	Parda	Pardo	Parda	
Causa Mortis	Hemorragia interna por trauma abdominal	Hemorragia interna por perfuração por arma de fogo em tórax	Não determinada	Hemorragia interna abdominal por trauma fechado	Insuficiência respiratória por edema agudo de pulmão por insuficiência cardíaca	Não determinada	

DP: desvio padrão.

Fonte: Elaborada pelo autor.

APENDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido		
Histomorfometria das Terminações Nervosas Livres das Cavidades Nasais		
<p>Você está sendo convidado pelo Dr Magno Eric Barbosa Peixoto a autorizar, voluntariamente, a participação de seu familiar falecido em uma pesquisa. Você não deve autorizar contra a sua vontade.</p> <p>Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.</p> <p>Durante a autópsia de seu familiar, será retirada, através de endoscopia, uma pequena amostra do interior do nariz para estudos científicos. Isso não vai gerar qualquer defeito no corpo. Estamos fazendo uma pesquisa para estudar e entender como funciona a sensibilidade do nariz. Os resultados ajudarão a compreender melhor doenças como as rinites. O nome de seu familiar ficará em segredo. A sua autorização deverá ser voluntária e consciente. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação nesse estudo. A qualquer momento, você terá o direito de desistir da pesquisa sem necessidade de dar explicações e isso não vai lhe prejudicar em nada.</p> <p>Nome do pesquisador responsável: Magno Eric Barbosa Peixoto Instituição: Universidade Federal do Ceará, Departamento de Cirurgia. Rua Prof. Costa Mendes, 1608 - 3º Andar - Rodolfo Teófilo Bloco Didático da Faculdade de Medicina / UFC CEP: 60.430-140 - Fortaleza - CE Telefone: (85) 3366-8062 Fax: (85) 3366.8065 E-mail: cirurgia@ufc.br</p>		
<p>ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a sua participação na pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC – Rua Coronel Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo. Fone: 3366-8344.</p>		
<p>O abaixo assinado _____, _____ anos, RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está autorizando a participação de seu familiar na pesquisa.</p> <p>Eu declaro que li cuidadosamente esse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro ainda estar recebendo uma cópia assinada desse termo.</p>		

LOCAL E DATA		
_____	_____	_____
NOME DO VOLUNTÁRIO	DATA	ASSINATURA
_____	_____	_____
NOME DO PESQUISADOR	DATA	ASSINATURA
_____	_____	_____
NOME DA TESTEMUNHA (SE O VOLUNTÁRIO NÃO SOUBER LER)	DATA	ASSINATURA
_____	_____	_____
NOME DO PROFISSIONAL QUE APLICOU O TCLE	DATA	ASSINATURA