



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ**

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

GUILHERME LEAL DANTAS

**HISTOMORFOMETRIA DAS TERMINAÇÕES NERVOSAS DA FARINGE
HUMANA POR IMUNOFLORESCÊNCIA: UM GRUPO CONTROLE PARA O
ESTUDO DA APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO**

**FORTALEZA
2018**

GUILHERME LEAL DANTAS

HISTOMORFOMETRIA DAS TERMINAÇÕES NERVOSAS DA FARINGE HUMANA
POR IMUNOFLUORESCÊNCIA: UM GRUPO CONTROLE PARA O ESTUDO DA
APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO

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

Coorientadora: Dra. Erika Ferreira Gomes

FORTALEZA

2018

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)

- D1h DANTAS, GUILHERME LEAL.
Histomorfometria das terminações nervosas da faringe humana por imunofluorescência : um grupo controle para o estudo da apneia obstrutiva do sono / GUILHERME LEAL DANTAS. – 2019.
91 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Maria Luzete Costa Cavalcante.
Coorientação: Profa. Dra. Erika Ferreira Gomes.
1. Apneia obstrutiva do sono. 2. Faringe. 3. Músculos Faringeos. 4. Terminações Nervosas. 5. Imunofluorescência. I. Título.

CDD 617

GUILHERME LEAL DANTAS

HISTOMORFOMETRIA DAS TERMINAÇÕES NERVOSAS DA FARINGE HUMANA
POR IMUNOFLUORESCÊNCIA: UM GRUPO CONTROLE PARA O ESTUDO DA
APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO

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)

Doutora Erika Ferreira Gomes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Doutor Daniel Chung
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Dedico este trabalho a Deus, que sempre foi o autor da minha vida e do meu destino.

Ao meu pai Fernando Antônio Barreto Dantas,
pelo seu exemplo de vida e por ter me
ensinado os princípios da ética, da integridade
e da dedicação ao trabalho;

à minha mãe Raimunda Lilá Leal Dantas,
símbolo de amor, luz e bondade, por ter sido o
meu porto seguro em todos os momentos da
minha vida;

às minhas irmãs Fernanda Leal Dantas Sales
Pimentel e Patrícia Leal Dantas Lobo, pelo
companheirismo eterno;

à minha amada esposa e alma gêmea Diana
Gondim Leal Dantas, pelo amor incondicional
e pela oportunidade de dividir os meus sonhos
e a minha vida; e

à minha querida filha, a princesinha Larissa
Lilah Gondim Leal Dantas, que deu outra
dimensão à minha existência com seu encanto
e pureza de espírito.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Luzete Costa Cavalcante, pela orientação constante, dedicação irrestrita, doação pessoal e atenção dedicadas a este projeto.

À Doutora Erika Ferreira Gomes, uma de minhas referências acadêmicas, pelo imensurável apoio na idealização do projeto e na realização do trabalho, da orientação, do incentivo e dos 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 e pela ajuda na leitura das lâminas e do processamento das imagens analisadas.

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 a 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 no 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 com o microscópio confocal.

À Sra. Fátima Faria, da Politec Saúde, por ter cedido por empréstimo o equipamento Watch-PAT para a realização de exame de tonometria arterial periférica dos pacientes da pesquisa.

À Doutora Conceição da Silva Martins, integrante do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (NEMPI) da Universidade Federal do Ceará, pela valorosa contribuição na análise da densidade nervosa dos espécimes estudados.

Ao Estatístico da Unidade de Pesquisa Clínica da EBSEH, Antônio Brazil Viana Júnior, pelo auxílio na análise estatística do trabalho.

Ao Coordenador da residência de Otorrinolaringologia do Hospital Universitário Walter Cantídio, Dr. André Alencar Araripe Nunes, por concordar com a metodologia deste trabalho e viabilizar a realização das etapas ambulatoriais e cirúrgicas do projeto com os pacientes envolvidos na pesquisa.

Às residentes de Otorrinolaringologia - Anna Caroline Rodrigues de Souza Matos, Clara Mota Randal Pompeu, Gabriela de Andrade Meireles Bezerra e Monique Barros Brito da Conceição -, pelo apoio na etapa de triagem dos pacientes no Hospital Universitário Walter Cantídio.

Aos acadêmicos de Medicina, Daniel de Castro Silva e Pedro de Castro Neto, e ao acadêmico de farmacologia, Matheus de Souza Santos, pelo auxílio no corte e na coloração das lâminas.

Aos colegas mestres, Dr. Magno Eric Barbosa Peixoto e Dra. Janaína Gonçalves da Silva Leite, pelo auxílio nessa nova linha de pesquisa.

RESUMO

A apneia obstrutiva do sono é um distúrbio caracterizado por colapsos recorrentes da região faríngea durante o sono, resultando em redução da saturação de oxigênio e risco elevado de doenças cardiovasculares. O mecanismo fisiopatológico ainda permanece incerto. Evidências sugerem que alterações na inervação sensorial proprioceptiva da faringe podem contribuir para o aparecimento da doença. O objetivo principal do trabalho é estudar a morfologia das terminações nervosas dos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe, e comparar a densidade nervosa entre esses músculos. Os espécimes foram colhidos in vivo durante procedimento cirúrgico de tonsilectomia das palatinas em pacientes com função sensorial normal e sem apneia obstrutiva do sono. A histomorfometria das terminações nervosas foi avaliada por métodos de imunofluorescência e coloração com hematoxilina-eosina. Foram visualizados fusos musculares no músculo palatoglosso. Identificaram-se terminações nervosas livres e terminações nervosas complexas nos três músculos estudados, incluindo formações tipo Meissner, Golgi e Ruffini, além de estruturas nervosas em *spiral-wharves* nos músculos palatoglosso e constritor superior da faringe. A média da densidade das fibras nervosas do músculo constritor superior da faringe foi maior que no músculo palatofaríngeo que, por sua vez, foi superior à média do músculo palatoglosso. O estudo da inervação proprioceptiva da faringe em um grupo controle é relevante para futuras pesquisas envolvendo a hipótese neurogênica da apneia obstrutiva do sono.

Palavras-chave: Apneia obstrutiva do sono. Faringe. Músculos Faríngeos. Terminações Nervosas. Imunofluorescência.

ABSTRACT

Obstructive sleep apnea is a disorder characterized by recurring collapses of the pharyngeal region during sleep, resulting in reduced oxygen saturation and a high risk of cardiovascular diseases. The physiopathological mechanism remains unclear. Evidence suggests that changes in the proprioceptive sensory innervation of the pharynx may contribute to emergence of the disease. The primary aim of this study is to investigate the nerve ending morphology of palatoglossus, palatopharyngeal and superior pharyngeal constrictor muscles, and compare the nerve density of these muscles. Specimens were collected in vivo during palatine tonsillectomy in patients with normal sensory function and no obstructive sleep apnea. Nerve ending histomorphometry was assessed using immunofluorescence and hematoxylin-eosin staining. Muscle spindles were observed in the palatoglossus muscle. Free and complex nerve endings were identified in the three muscles under study, including Meissner, Golgi and Ruffini formations, in addition to spiral-wharves nerve structures in the palatoglossus and superior pharyngeal constrictor muscles. The average density of pharyngeal superior constrictor muscle nerve fibers was higher than in the palatopharyngeal muscle, which, in turn, was greater than the average of the palatoglossus muscle. The study of proprioceptive innervation of the pharynx in a control group is relevant for future research involving the neurogenic hypothesis pathogenesis of obstructive sleep apnea.

Keywords: Obstructive sleep apnea. Pharynx. Pharyngeal muscles. Nerve endings. Immunofluorescence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Toque do pilar amigdaliano anterior (A) com abaixador de língua durante teste de sensibilidade faríngea; B, pilar amigdaliano posterior; C, parede posterior da orofaringe; T, tonsila palatina.....	29
Figura 2 – Registro de tonometria arterial periférica com Watch-PAT.....	30
Figura 3 – Relatório principal emitido pelo Watch-PAT.....	31
Figura 4 – Fluxograma de triagem dos pacientes.....	32
Figura 5 – Triagem dos pacientes.....	33
Figura 6 – Visão do cirurgião após ressecção da tonsila palatina direita. PG, Palatoglosso; PF, Palatofaríngeo; MCSF, Músculo Constrictor Superior da Faringe; U, úvula; L, língua.....	34
Figura 7 – Obtenção da amostra relativa ao músculo palatoglosso. Local de ressecção da amostra (seta); PG, fragmento do músculo palatoglosso (3mm x 10mm); TP, tonsila palatina.....	35
Figura 8 – Medição da amostra.....	36
Figura 9 – Pesagem da amostra.....	36
Figura 10 – Secção da peça no criostato.....	37
Figura 11 – Etapa de lavagens durante imunofluorescência.....	38
Figura 12 – Imagem em mosaico representativa das amostras dos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constrictor superior da faringe (MCSF).....	39
Figura 13 – Figura representativa do processo de medição da densidade nervosa do músculo palatofaríngeo. Passo 1 - Imagem panorâmica captada com microscópio confocal (Área total). Passo 2 - Delimitação da região a ser calculada a densidade das fibras nervosas (Mensuração da área de imunofluorescência).....	40
Figura 14 – Imagem panorâmica da peça evidenciando epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado (E), tecido conjuntivo denso (TCD) e camada muscular (M).....	43
Figura 15 – Terminações nervosas (setas) dentro do tecido conjuntivo subepitelial relacionadas aos vasos sanguíneos (vs) (A). Filamento nervoso dentro do feixe muscular (B). Filamento nervoso (N) em tecido conjuntivo (C) que penetra entre as fibras musculares (M) e (C).....	43
Figura 16 – Imagem panorâmica da peça evidenciando epitélio estratificado pavimentoso (E), tecido conjuntivo (TC) e feixes musculares (M).....	44

Figura 17 – Vários filetes nervosos entre as fibras musculares (A). Numerosas glândulas acinares mucossecretoras (G) à esquerda e filete nervoso (seta) entre as fibras musculares à direita (B).....	45
Figura 18 – Imagem panorâmica da peça evidenciando epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado (E), tecido conjuntivo (TC) com várias glândulas acinares mucossecretoras e fibras musculares (M).....	46
Figura 19 – Filete nervoso longo no tecido conjuntivo subepitelial (A). Filete nervoso (setas) próximo a vaso sanguíneo (VS) em tecido conjuntivo (B).....	46
Figura 20 – Terminações nervosas livres em diferentes sentidos no tecido conjuntivo subepitelial. E, epitélio (A). Relação das terminações nervosas livres com vasos sanguíneos (B).....	47
Figura 21 – Feixes nervosos entrelaçados e paralelos às fibras musculares (A). Feixes nervosos emitindo ramificações perpendiculares às fibras musculares.....	48
Figura 22 – Formação nervosa tipo <i>network</i>	48
Figura 23 – Formação arborizada não encapsulada <i>Ruffini-like</i>	49
Figura 24 – Formações nervosas com formato cônico <i>Golgi-like</i>	50
Figura 25 – Formação <i>Meissner-like</i> no tecido conjuntivo próximo à musculatura.....	51
Figura 26 – Fusos musculares distribuídos esparsamente pelo tecido muscular.....	52
Figura 27 – Estruturas nervosas alongadas com formato em espiral (<i>spiral-wharves</i>) correndo paralelamente às fibras musculares.....	53
Figura 28 – Terminações nervosas livres (seta) finas e tortuosas no epitélio, caminhando em direção aos vasos sanguíneos. E – epitélio; VS – vaso sanguíneo (A). Terminações nervosas livres paralelas às fibras musculares (B e C).....	54
Figura 29 – Padrão entrelaçado de feixes nervosos cruzando as fibras musculares.....	54
Figura 30 – Formação nervosa tipo <i>network</i>	55
Figura 31 – Formação nervosa complexa <i>Golgi-like</i>	55
Figura 32 – Formação nervosa complexa <i>Ruffini-like</i>	56
Figura 33 – Terminações nervosas livres alongadas e finas partindo do tecido conjuntivo em direção à mucosa e camada muscular.....	57
Figura 34 – Terminações nervosas livres em proximidade a glândulas seromucosas (A) Formação nervosa complexa não classificável ao redor da glândula (B).....	59
Figura 35 – Feixe nervoso.....	58
Figura 36 – Fascículo nervoso (grupo de feixes nervosos) (A). Fibra nervosa deixando o fascículo em direção às fibras musculares (B).....	59

Figura 37 – Formação nervosa complexa <i>Ruffini-like</i> envolvida por fibras musculares.....	59
Figura 38 – Formação nervosa complexa oval.....	60
Figura 39 – Formação nervosa complexa não classificável.....	60
Figura 40 – <i>Spiral-wharves</i>	61
Figura 41 – Porcentagem da área imunomarcada nas fibras nervosas dos músculos constritor superior da faringe, palatoglosso e palatofaríngeo.....	63
Quadro 1 – Trabalhos que também analisaram terminações nervosas em tecidos humanos do trato respiratório superior.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados morfológicos gerais dos espécimes avaliados.....	42
Tabela 2 – Distribuição das terminações nervosas entre os músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe.....	62
Tabela 3 – Média da densidade das fibras nervosas dos músculos constritor superior da faringe, palatoglosso e palatofaríngeo, expressas em termos percentuais.....	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Apneia Obstrutiva do Sono.....	16
1.2	Anatomia e fisiologia da faringe.....	20
1.2.1	<i>Músculo palatoglosso.....</i>	21
1.2.2	<i>Músculo palatofaríngeo.....</i>	21
1.2.3	<i>Músculo constritor superior da faringe.....</i>	22
1.3	Inervação sensorial microscópica proprioceptiva da faringe humana.....	22
1.4	Imunofluorescência e microscopia confocal a laser.....	23
1.5	Mecanorreceptores.....	24
1.6	Relevância e justificativa.....	26
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Geral.....	27
2.2	Específicos.....	27
3	CASUÍSTICA E MÉTODO.....	28
3.1	Triagem dos pacientes.....	28
3.2	Obtenção das amostras.....	33
3.3	Preparo da amostra.....	35
3.4	Preparo dos cortes para imunofluorescência.....	35
3.5	Coloração com Hematoxilina-Eosina.....	37
3.6	Imunofluorescência.....	38
3.7	Análise histomorfométrica.....	39
3.8	Análise estatística.....	41
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Coloração Hematoxilina-Eosina.....	42
4.1.1	<i>Palatoglosso.....</i>	42
4.1.2	<i>Palatofaríngeo.....</i>	44
4.1.3	<i>Músculo constritor superior da faringe.....</i>	45
4.2	Imunofluorescência para Anticorpo Primário Anti-Pgp 9,5.....	47
4.2.1	<i>Palatoglosso.....</i>	47
4.2.2	<i>Palatofaríngeo.....</i>	53
4.2.3	<i>Músculo constritor superior da faringe.....</i>	56

4.3	Densidade nervosa dos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe.....	62
5	DISCUSSÃO.....	64
6	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICE A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	81
	APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	85
	APÊNDICE C – DADOS GERAIS DOS INDIVÍDUOS.....	88
	ANEXO A – ANATOMIA DA OROFARINGE.....	89
	ANEXO B – QUESTIONÁRIO STOP-BANG.....	90
	ANEXO C – QUESTIONÁRIO DE BERLIM.....	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apneia Obstrutiva do Sono

A Apneia Obstrutiva do Sono (AOS) é um distúrbio comum, caracterizado por colapsos recorrentes da região faríngea durante o sono, o que resulta em redução substancial do fluxo aéreo (apneia ou hipopneia), apesar dos esforços respiratórios, evoluindo com hipoxemia e hipercapnia (ECKERT *et al.*, 2008). Estima-se que a prevalência da AOS na população adulta seja de 2 a 4% (YOUNG *et al.*, 1993). Um estudo epidemiológico recente demonstrou uma elevada prevalência de AOS (32,8%) na população adulta de São Paulo (TUFIK *et al.*, 2010). Os distúrbios do sono, incluindo a AOS, cursam com uma série de consequências para o indivíduo e para a sociedade e tornaram-se um problema de saúde pública (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2006). Os sinais e sintomas mais comuns da AOS são ronco, sonolência excessiva diurna, pausas respiratórias durante o sono e alterações cardiovasculares, como hipertensão arterial, doença cardíaca isquêmica, doença cerebrovascular, insuficiência cardíaca, arritmias e morte súbita (KIM *et al.*, 2004). Prejuízos das funções cognitivas, a exemplo da concentração, da atenção e da memória, e da função executiva são frequentemente observados, além de alterações de humor, como irritabilidade, depressão e ansiedade (CHOI *et al.*, 2010). As consequências da AOS incluem alterações no cotidiano de seus portadores e também geram repercussões socioeconômicas, como aumento de acidentes automobilísticos e de gastos públicos e privados, além de prejuízos ocupacionais e sociais (BARBÉ *et al.*, 2008).

Sob esse viés, alguns métodos de baixo custo e fácil aplicação nos ambulatórios são regularizados para aferir o risco de AOS em diferentes populações, como os questionários de Berlim (NETZER *et al.*, 1999) e STOP-BANG (CHUNG *et al.*, 2012), que analisam variáveis como ronco, fadiga, sonolência excessiva diurna, pressão alta e obesidade. O questionário de Berlim, uma das ferramentas mais conhecidas e utilizadas no rastreamento da AOS, é validado na língua portuguesa e apresenta sensibilidade de 86% e especificidade de 77% (SHARMA *et al.*, 2006). O questionário STOP-BANG apresentou sensibilidade de 83,5%, especificidade de 45,5% e acurácia de 75,2%, mostrando-se uma ferramenta eficaz para o diagnóstico do transtorno (DUARTE *et al.*, 2017).

A polissonografia é considerada o padrão ouro no diagnóstico da AOS, que combina a monitorização noturna das fases do sono com o registro contínuo de fluxo aéreo, movimentos ventilatórios torácico e abdominal, ritmo cardíaco, saturação de oxigênio, ronco,

tônus muscular e movimento das pernas. O número de eventos (apneias e hipopneias) por hora de sono é conhecido como Índice de Apneia e Hipopneia (IAH), sendo largamente utilizado para avaliar a gravidade da doença (AYAS *et al.*, 2003). O Índice de Distúrbios Respiratórios (IDR) corresponde ao IAH, mas também inclui os eventos de esforço respiratório relacionado ao despertar (RERA), que ocorrem na síndrome de resistência de vias aéreas superiores. Pelos critérios diagnósticos do *International Classification of Sleep Disorders (ICSD 3, 2014)* para definir a presença de AOS, é necessário pelo menos um dos seguintes critérios: queixas de sonolência, sono não restaurador, fadiga ou insônia; paciente que acorda com apneia, engasgos ou sobressalto; parceiro que relata ronco, apneias ou ambos durante o sono; paciente com diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica, depressão, disfunção cognitiva, doença coronariana, insuficiência cardíaca, fibrilação atrial ou diabetes mellitus tipo 2. Além dos critérios clínicos expostos, é necessário que a polissonografia ou a monitorização cardiorrespiratória demonstre $IDR > 5$ por hora de sono. Outra possibilidade diagnóstica é a evidência polissonográfica de $IDR > 15$ por hora de sono, não sendo necessário, neste caso, nenhum critério adicional. Pelo valor do IDR ou IAH, pode-se classificar os pacientes em: ronco primário: $IAH < 5$ por hora de sono, AOS leve: IAH entre 5 e 15 por hora de sono (se houver presença de sintomas), AOS moderada: IAH entre 15 e 30 por hora de sono, AOS grave: $IAH > 30$ por hora de sono.

A polissonografia demanda um custo elevado, pois exige um laboratório do sono completo e uma equipe especializada. Portanto, métodos diagnósticos alternativos estão sendo desenvolvidos, abrangendo diversos dispositivos portáteis os quais possibilitam a realização do exame no próprio domicílio, com o objetivo de reduzir os custos e manter a mesma eficiência no diagnóstico das patologias. Alguns desses dispositivos, como, a título de ilustração, o Watch-PAT, avaliam a Tonometria Arterial Periférica (TAP), um sinal fisiológico das alterações do sistema nervoso autonômico que ocorrem durante o sono. Além da TAP, esses monitores portáteis avaliam a frequência cardíaca, a saturação do oxigênio e a actigrafia. O algoritmo automático analisa a amplitude do sinal TAP que, associada às variações da frequência cardíaca e da saturação do oxigênio, identifica os eventos respiratórios. O resultado desse algoritmo determina o IAH usando padrões específicos de sinal (BARONE D, 2005). Um estudo de metanálise evidenciou alta correlação do IAH ($r=0,889$; $p < 0,01$) entre os dispositivos portáteis utilizando TAP e a polissonografia (YALAMANHALI *et al.*, 2013). Fortalecido pelo estudo cego da maioria dos trabalhos, essa tecnologia representa uma alternativa viável à polissonografia para confirmar a suspeita clínica de AOS.

O colapso faríngeo é multifatorial, e inclui anormalidades da anatomia da via aérea superior, alteração da resposta neuromuscular e alterações em receptores da via aérea superior (PALOMBINI, 2010). O reflexo da via aérea superior se opõe às forças de colapamento geradas pela pressão negativa durante a inspiração e é acompanhado da ativação dos músculos dilatadores da faringe, que podem aumentar a patência da via aérea. A aferência sensorial para esse reflexo é proveniente dos mecanorreceptores da via aérea superior através dos centros respiratórios centrais. Durante as apneias e hipopneias, receptores distais à obstrução detectam e transmitem informação acerca das mudanças pressóricas resultantes (BRODERICK *et al.*, 2008).

Estudos em humanos demonstraram aumento da resistência ao fluxo aéreo na faringe após aplicação de lidocaína tópica, comprometendo a patência da via aérea superior em indivíduos durante sono normal e vigília (DEWEESE; SULLIVAN, 1988). Dano na aferência sensorial palatal também foi evidenciado em pacientes com AOS (GUILLEMINAULT *et al.*, 2005). Alterações neurogênicas foram observadas em pacientes com AOS como resultado da denervação e da reinervação, estando associadas à severidade da hipóxia intermitente que ocorre durante o sono (SABOISKY *et al.*, 2012). Em AOS, há uma correlação entre inflamação local e denervação da faringe, associada a dano sensorial, que pode reduzir a eficácia dos reflexos protetivos faríngeos, contribuindo para o colapso (BOYD *et al.*, 2004). Nessa perspectiva, Carlos *et al.* (2015) exploraram a hipótese de que alterações na inervação da faringe, especialmente inervação mecanossensorial, podem contribuir para a AOS. Essa hipótese foi testada pela análise da inervação da faringe humana em indivíduos normais e em indivíduos clinicamente diagnosticados com AOS. Usando imuno-histoquímica para axônios e células de Schwann, assim como duas mecanoproteínas (ASIC2 e TRPV4), observou-se uma significativa redução na densidade das fibras nervosas na submucosa de pacientes com AOS, assim como anormalidades morfológicas nos corpúsculos sensoriais. Esses estudos sugerem que um defeito na via aferente dos reflexos protetores para manter a patência da via aérea superior podem contribuir para a patogênese da AOS.

Acredita-se que a AOS está diretamente associada à inabilidade dos músculos faríngeos de responder adequadamente à pressão negativa da via aérea durante a inspiração, o que poderia resultar no colapso das estruturas da via aérea durante o sono. Alguns autores sugeriram que o estresse crônico nos tecidos faríngeos decorrente da vibração anormal das estruturas da faringe evidenciada na respiração durante o sono poderia resultar em alterações musculares secundárias à lesão neural (FRIBERG *et al.*, 1998; EDSTRÖM *et al.*, 1992). Portanto, uma injúria que envolve tanto fibras motoras (músculos dilatadores da faringe)

quanto sensoriais (mecanorreceptores e receptores de mucosa) nessa área poderia potencialmente ocasionar o aparecimento da AOS (GUILLEMINAULT *et al.*, 2009).

Muitos estudos têm sugerido, ainda, que a AOS é provavelmente o estágio final de uma doença progressiva, iniciando com ronco. Um dos mecanismos sugeridos nesse processo é a lesão neurogênica dos músculos palatais (EDSTRÖM *et al.*, 1992; LINDMAN *et al.*, 2002). Como a atividade funcional dos músculos da via aérea superior é importante para a manutenção da estabilidade e patência da via aérea durante a inspiração, uma disfunção muscular pode ser uma das causas da AOS. No estudo de Lindman *et al.* (2002), alterações histopatológicas (denervação e degeneração) foram detectadas no músculo palatofaríngeo de 11 pacientes com AOS submetidos à uvulopalatofaringoplastia. As marcantes anormalidades estruturais e o diferente padrão do tipo de fibras encontrados nos músculos dos pacientes com AOS indicam um componente neuromuscular de instabilidade e colapso da via aérea superior. Um estudo evidenciou que o grau do dano neurogênico do músculo palatofaríngeo em pacientes adultos estava associado ao grau do distúrbio respiratório (FRIBERG *et al.*, 1998), sugerindo-se que uma lesão neurogênica progressiva local causada pelo trauma do ronco pode ser um fator de contribuição potencial para a colapsibilidade da via aérea superior.

O tratamento ideal para a AOS deve objetivar a eliminação dos eventos respiratórios obstrutivos e, com isso, restaurar o padrão de sono normal e a adequada oxigenação arterial (VEASEY *et al.*, 2006; MORGENTHALER *et al.*, 2006). Dentre as modalidades de tratamentos, destacam-se os aparelhos geradores de fluxo de pressão positiva (*Positive Airway Pressure* (PAP)), aparelhos intraorais de reposicionamento mandibular, exercícios orofaríngeos miofuncionais e cirurgias modificadoras de via aérea. Uma terapia inovadora para o tratamento da AOS consiste na neuroestimulação do nervo hipoglosso através de um implante terapêutico, projetado especificamente para restaurar o tônus dos principais músculos da língua, efetivamente controlando o fluxo das vias aéreas superiores e reduzindo significativamente ou eliminando a apneia (SCHWARTZ, 2014). Assim, o sistema se parece e opera de maneira similar a um marcapasso cardíaco, exceto que, em vez de enviar impulsos para o coração, ele envia leves impulsos ao nervo hipoglosso no pescoço. Em média, 75 a 80% dos pacientes apresentam sucesso nessa modalidade de tratamento. Alguns fatores anatômicos e funcionais são considerados desfavoráveis, mas ainda não existem estudos suficientes.

1.2 Anatomia e fisiologia da faringe

A faringe, essencialmente um tubo musculofibroso, se estende da base do crânio à borda inferior da cartilagem cricoide. A parte superior, tanto da parede posterior como da lateral, é quase totalmente formada de músculo. Já a parede anterior tem pouco músculo por causa da abertura para as cavidades nasal e oral. Posteriormente, a faringe se encontra sobre a superfície anterior do arco do atlas e do corpo das cinco vértebras cervicais subsequentes com um tecido conjuntivo formando o espaço retrofaríngeo.

A faringe é dividida em três partes: nasal (nasofaringe), oral (orofaringe) e laríngea (hipofaringe). A mucosa da parte nasal da faringe é revestida por epitélio colunar ciliado similar ao da cavidade nasal. As partes oral e laríngea apresentam epitélio estratificado escamoso. Numerosas glândulas mucosas, principalmente na parte superior, encontram-se na profundidade da membrana mucosa (SAKAE *et al.*, 2011).

A orofaringe está localizada posteriormente à cavidade oral e se estende do palato mole até o nível do osso hioide (C3). Ela é composta por cinco camadas: mucosa, submucosa, fáschia faringobasilar, músculo constritor e fáschia bucofaríngea (DUVVURI; MYERS, 2009). Cada parede lateral contém a tonsila palatina situada entre o arco palatoglosso anteriormente e o arco palatofaríngeo posteriormente; o restante da parede posterior é formado pelo músculo constritor da faringe (ANEXO A). Histologicamente, o palato mole e a parede posterior da orofaringe são delimitados por um epitélio escamoso estratificado não queratinizado, apoiados por uma lâmina própria subjacente e camada muscular (ROSS *et al.*, 2011).

A via aérea da faringe humana compreende uma série de músculos cuja integração funcional é essencial para muitas funções complexas, tais como deglutição, fala e respiração. De acordo com a perspectiva respiratória, o objetivo primário desses músculos é manter a via aérea aberta. Essa atividade é frequentemente diminuída durante o sono, tornando a via aérea mais estreita e aumentando a propensão ao colapso (WORSNOP *et al.*, 1998). Em indivíduos saudáveis, os músculos faríngeos são capazes de compensar adequadamente o aumento da resistência das vias aéreas para manter a via pérvia. Com base em sua função e anatomia, os músculos faríngeos são divididos em quatro grupos primários: músculos extrínsecos da língua, músculos palatais, músculos que controlam a posição do osso hioide e músculos constritores da faringe (superior, médio e inferior). Há cinco músculos palatais: levantador do véu palatino, tensor do véu palatino, palatoglosso, palatofaríngeo e músculos da úvula (EDWARDS; WHITE, 2011). Os músculos palatoglosso e palatofaríngeo aumentam seu disparo em resposta a breves pulsos de pressão negativa ou carga resistiva inspiratória

(MORTIMORE; DOUGLAS, 1997). Um estudo sugeriu que o palatoglosso aumenta sua atividade fásica em resposta à hipercapnia (TANGEL *et al.*, 1995).

1.2.1 Músculo palatoglosso

O palatoglosso é uma faixa delgada de músculo recoberto com túnica mucosa e que forma o arco palatoglosso. Há controvérsia na literatura acerca de sua procedência. Enquanto alguns autores o consideram classicamente um músculo extrínseco da língua (MOORE; DALLEY; AGUR, 2011; WILLIAMS, 1995), outros o têm considerado como pertencente ao palato (MARGARET; HERRING, 1998; MARTINI, 2009). O músculo palatoglosso tem origem na superfície inferior da aponeurose palatina e inserção na região posterolateral da língua (MADEIRA, 1997). Apesar de controvérsias, numerosos estudos concluíram que o músculo palatoglosso é innervado pelo nervo vago, e não pelo nervo hipoglosso ou glossofaríngeo (ROSA; NETO, 2012). Ele eleva a região posterior da língua e puxa o palato mole em direção à língua, fechando o istmo orofaríngeo e auxiliando no início da deglutição.

1.2.2 Músculo palatofaríngeo

O palatofaríngeo é um músculo fino e achatado, também recoberto com túnica mucosa, formando o arco palatofaríngeo, e se estende por todo o comprimento da faringe. Em um estudo de 50 cadáveres, o músculo palatofaríngeo foi subdividido em longitudinal e transversal. O palatofaríngeo longitudinal era composto de quatro fascículos: dois destes emparelhando o músculo elevador do véu palatino imediatamente após a origem na aponeurose palatina; um fascículo originado na úvula e outro no músculo salpingofaríngeo. Os quatro fascículos unidos continuavam através do arco palatofaríngeo e se inseriam na cartilagem tireoidea e abaixo da mucosa da hipofaringe. O palatofaríngeo transversal ocupava uma localização de transição entre o músculo palatofaríngeo e constritor superior da faringe, onde se originava da aponeurose palatina e passava dorsalmente para envolver o istmo faríngeo e alcançar a rafe faríngea (SUMIDA; YAMASHITA; KITAMURA, 2012). O músculo palatofaríngeo estende o palato mole e puxa as paredes da faringe superior, anterior e medialmente durante a deglutição, promovendo o encurtamento da faringe, ação que tem um papel crítico na depuração dos resíduos alimentares retidos nos seios piriformes (DEJAEGER *et al.*, 1997). O músculo palatofaríngeo também atua como esfíncter nasofaríngeo ao fechar o

istmo da faringe e tem papel relevante durante a fala (FRITZELL, 1969; MOON *et al.*, 1994). É inervado pelo plexo faríngeo com contribuições dos nervos glossofaríngeo e vago. Há uma contribuição menos significativa do nervo palatino menor (SHIMOKAWA *et al.*, 2005).

1.2.3 Músculo constritor superior da faringe

O músculo constritor superior da faringe forma a parte principal da parede lateral e posterior da faringe e está intimamente associado ao movimento normal das vias aéreas superiores durante a fala, deglutição e respiração (CARLOS *et al.*, 2013). Emerge do hâmulos do osso pterigoideo medial (parte pterigofaríngea), da rafe pterigomandibular (parte bucofaríngea), da mandíbula (parte milofaríngea) e da raiz da língua (parte glossofaríngea) (SAKAE, 2011). Tem inervação de ramos do plexo faríngeo, derivados dos nervos cranianos glossofaríngeo e vago, e uma pequena contribuição do nervo facial (SHIMOKAWA *et al.*, 2004). Ele está organizado em camadas funcionais de fibras, evidenciado pela inervação motora distinta assim como pela distribuição de fibras nervosas especializadas (MU; SANDERS, 2007).

1.3 Inervação sensorial microscópica proprioceptiva da faringe humana

A inervação motora dos músculos da faringe humana, incluindo as variações regionais na sua densidade, é bem conhecida. Entretanto, os estudos sobre inervação sensorial são muito escassos e centrados nas fibras sensoriais intraepiteliais da mucosa faríngea. Em um trabalho, foi determinado que a maior parte das fibras sensitivas procede do nervo glossofaríngeo (YOSHIDA *et al.*, 2000).

A região orofaríngea participa de múltiplas funções que têm em sua base atividades reflexas: deglutição, sucção, respiração, fala, mastigação, náuseas e vômitos, tosse ou ronco (MILLER, 2002). A maioria desses reflexos protegem a integridade tissular da cavidade oral e da língua e também previnem a aspiração de alimento para a via aérea inferior. Os receptores sensoriais da faringe respondem a alterações táteis, pressóricas e estímulos químicos. Essa informação sensorial da faringe envia permanentemente sinais para o sistema nervoso central, controlando a contração dos músculos constritores da faringe. As respostas reflexas simples incluem: proteção da faringe e vias respiratórias altas (reflexo nauseoso, reflexo apneico e reflexo da aspiração), reflexos respiratórios e reflexos cardiovasculares. As respostas reflexas complexas incluem: respiração oral, manutenção da

permeabilidade faríngea, transporte e proteção da faringe (deglutição e vômito). Algumas dessas atividades têm seu ponto de partida em estiramentos e/ou alargamentos dos próprios músculos faríngeos (sensibilidade proprioceptiva) e, portanto, é esperado que os proprioceptores, receptores que desencadeiam esses estímulos, sejam estruturas nervosas capazes de executar a transdução de estímulos de encurtamento-estiramento muscular e convertidos em impulsos nervosos

Na maioria dos músculos esqueléticos, as estruturas responsáveis pela função proprioceptiva são os fusos musculares. Em 1967, Bossy e Vidic questionaram a existência de fusos musculares na faringe humana, e Seto (1963), em seu livro “Estudos sobre a inervação sensorial (sensibilidade humana)”, não descreve a presença de fusos musculares nos músculos dessa região. Classicamente, admite-se que os músculos faríngeos da maioria dos mamíferos são desprovidos de fusos musculares (KUEHN; TEMPLETON; MAYNARD, 1990), apesar de estes estarem presentes em outros músculos da região, tais como genioglosso, tensor do véu palatino, palatoglosso e alguns músculos da língua. Em 1978, um estudo em macacos (*Macaca irus*) demonstrou, pela primeira vez, a presença de fusos musculares no músculo constritor inferior da faringe (SENGUPTA; SENGUPTA, 1978).

1.4 Imunofluorescência e microscopia confocal a laser

A maioria dos estudos sobre inervação sensorial da faringe se limita a textos de mais de 50 anos (SETO, 1963), em que se utilizavam técnicas de impregnação argêntica ou tetróxido de ósmio-yoduro de zinco para marcar os elementos nervosos. Recentemente, diversas técnicas imuno-histoquímicas têm sido desenvolvidas para realçar especificamente tecidos nervosos e, assim, melhorar o potencial de análise das imagens. O anticorpo primário do produto gênico proteico 9.5 (PGP 9.5) é um marcador pan-axonal que marca nervos e mecanorreceptores, já descrito na literatura em trabalhos com pregas vocais de recém-nascidos (LEITE *et al.*, 2016), mucosa da epiglote e da prega vestibular de humanos (RUOPPOLO *et al.*, 2014), faringe humana (CARLOS *et al.*, 2013), cavidade oral humana (HILLIGES *et al.*, 1996; RAMIERI *et al.*, 1992), ligamentos do punho de humanos (JEW *et al.*, 2003), mucosa laríngea de cavalos (YAMAMOTO *et al.*, 2001) e mucosa do palato duro de ratos (MITSUI *et al.*, 2000).

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 marcação do anticorpo primário PGP 9.5 com fluoróforo

conjugado Alexa flúor 488 permite o uso da microscopia confocal com varredura a laser (MCL). Esta é uma técnica de aquisição de imagens que permite o seccionamento óptico de um espécime através da convergência do feixe de raios luminosos para um plano focal ao longo da direção axial da lente do microscópio. Ela gera um conjunto de dados que representam a distribuição de marcadores fluorescentes depositados ao longo de um objeto em estudo. Dessa forma, detalhes de finas estruturas são facilmente distinguidos e a resolução das imagens obtidas é excelente. As imagens ópticas podem ser remontadas com mínima deterioração, sendo possível reconstruir tridimensionalmente a estrutura interessada. Portanto, esse método é ideal e confiável para a avaliação morfológica e quantitativa de terminações nervosas.

1.5 Mecanorreceptores

Os mecanorreceptores são um grupo de receptores que são estimulados por uma variedade de estímulos externos, tais como toque, alterações de pressão e vibração, e também desempenham uma importante função na manutenção da homeostase intracelular (WU, 2009). Os mecanorreceptores estão presentes na pele e em outras partes do corpo, como articulações e superfícies mucosas, e são formados por terminações das fibras nervosas sensoriais. Algumas dessas fibras terminam em expansões encapsuladas denominadas corpúsculos, que contêm mitocôndria e vesículas (HAMANN, 1995). Os mecanorreceptores são classificados em cinco tipos de acordo com sua morfologia: Merkel, Ruffini, Meissner, corpúsculos de Pacini e terminações nervosas livres (SCOTT, 2000). Os quatro primeiros corpúsculos são terminações nervosas complexas e encapsuladas, enquanto as terminações nervosas livres são estruturas não encapsuladas.

As terminações nervosas livres estão sob o epitélio e enviam projeções através da membrana basal, dentro do epitélio. Acredita-se que sejam receptores de tração rapidamente adaptáveis e receptores da fibra-C e que iniciam reflexos da tosse e da apneia. As terminações nervosas complexas têm sido frequentemente descritas com as mais variadas nomenclaturas e apresentam diversos diâmetros, podendo algumas estruturas lamelares e corpusculares chegarem a medir entre 200 e 350 micrômetros (μm). As suas funções não foram estabelecidas, entretanto, por analogia com a pele, parecem responder a pressão, toque e frio (WIDDICOMBE, 2001).

Carlos *et al.* (2013) demonstraram, em seu estudo em cadáveres sobre inervação sensorial da faringe humana, a ocorrência de numerosos e diferentes mecanorreceptores na

faringe humana, que presumivelmente detectam alterações mecânicas nas vias aéreas superiores e substituem fusos musculares na função de propriocepção, fundamental para a fisiologia das vias aéreas superiores. Entre as estruturas encontradas, é possível mencionar os corpúsculos *Pacini-like*, *Golgi-like* e *Ruffini-like* e uma ampla variedade de formações sensoriais sem classificação morfológica. Em todos os casos, elas foram bem diferenciadas dos tecidos vizinhos e demonstraram imunorreatividade para marcadores neuronais e células de Schwann.

Em seu estudo sobre inervação sensorial proprioceptiva da faringe, Arias Garcia (2012) também encontrou diferentes morfotipos de formações nervosas sensitivas, incluindo um tipo especial de formação denominada espiroidea, que poderia substituir os fusos musculares como receptor proprioceptivo.

As terminações nervosas livres foram descritas por Ruoppolo *et al.* (2014) na mucosa da epiglote e da prega vestibular de adultos humanos. Na cavidade oral humana, já foram identificadas estruturas lamelares similares aos corpúsculos de Meissner (HILLIGES *et al.*, 1996). Na mucosa gengival e palatal humana, foi possível corar o corpúsculo de Merkel (RAMIERI *et al.*, 1992). No estudo de inervação proprioceptiva em pregas vocais de recém-nascidos, observaram-se terminações nervosas livres, feixes nervosos e terminações glomerulares na mucosa da prega vocal. Nos músculos intrínsecos da laringe, foram identificadas terminações complexas glomerulares, corpúsculo tipo-Meissner, fusos musculares e estruturas nervosas tipo *spiral-wharves* (LEITE *et al.*, 2016).

1.6 Relevância e justificativa

Nos últimos anos, tornou-se evidente que a variação morfológica e quantitativa das estruturas nervosas sensitivas é específica a cada órgão e a cada espécie animal, portanto são necessários estudos individualizados para as diferentes regiões do organismo humano. Há uma escassez na literatura de trabalhos sobre a inervação sensorial da faringe humana. Nesse sentido, o estudo descritivo das terminações nervosas da faringe é fundamental, porque respostas sensoriais anormais têm sido encontradas em algumas condições patológicas como na via aérea superior de pacientes com apneia obstrutiva do sono (GUILLEMINAULT, 2005), doença com elevada morbimortalidade cardiovascular e grande impacto para a saúde pública e que ainda apresenta etiopatogenia incerta.

O estudo da inervação proprioceptiva da faringe, em um grupo controle com função sensorial normal presumida, torna-se relevante para futuras pesquisas envolvendo a

provável patogênese neurológica da AOS, colaborando, de forma significativa, para os conhecimentos vigentes acerca de sua complexa fisiopatologia e influenciando o prognóstico da doença, o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas e a seleção da modalidade terapêutica adequada para cada indivíduo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a morfologia e a distribuição das terminações nervosas da faringe de adultos com inervação sensorial normal e sem apneia obstrutiva do sono.

2.2 Específicos:

- Descrever as terminações nervosas dos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe;
- Avaliar a anatomia microscópica da orofaringe através de coloração com hematoxilina-eosina;
- Comparar a densidade nervosa entre os músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe;
- Avaliar a aplicabilidade da técnica de imunofluorescência com uso do PGP 9.5 e microscopia confocal de varredura a laser no estudo da inervação da faringe em humanos.

3 CASUÍSTICA E MÉTODO

A pesquisa foi desenvolvida no 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 1.645.613 (APÊNDICE A).

Trata-se de um estudo do tipo experimental, descritivo e transversal. Foram avaliados os músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe de seis pacientes adultos submetidos à tonsilectomia das palatinas (remoção das amígdalas palatinas), no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), com indicação cirúrgica prévia para tratamento de tonsilite crônica ou tonsilite de repetição, sem Apneia Obstrutiva do Sono (AOS) e com função sensorial normal.

Para a pesquisa, foram analisados cinco indivíduos do sexo feminino e um indivíduo do sexo masculino com idades variando entre 22 e 35 anos.

3.1 Triagem dos pacientes

A triagem foi realizada no ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), dentre os pacientes que já tinham indicação cirúrgica prévia de tonsilectomia das palatinas, durante a consulta pré-operatória, a partir da realização de exame físico para avaliação de sensibilidade faríngea e aplicação dos questionários STOP-BANG e Berlim. A confirmação da ausência de AOS foi realizada por intermédio do exame de Tonometria Arterial Periférica (TAP) durante o sono com o dispositivo portátil WatchPAT-200^R (Itamar Medical Ltd.,Caesarea, Israel) em uma data distinta da consulta.

A presunção de sensibilidade faríngea normal ocorreu durante a orofaringoscopia do exame físico otorrinolaringológico, considerada positiva na presença de contração e/ou reflexo nauseoso ao toque dos pilares amigdalianos anterior e posterior e da parede posterior da orofaringe com abaixador de língua (FIGURA 1).

Figura 1 – Toque do pilar amigdaliano anterior (A) com abaixador de língua durante teste de sensibilidade faríngea; B, pilar amigdaliano posterior; C, parede posterior da orofaringe; T, tonsila palatina



Fonte: elaborada pelo autor.

No questionário STOP-BANG (acrônimo em inglês para *Snoring, Tiredness, Observed apnea, high blood Pressure, Body mass index, Age, Neck circumference, and Gender*), algumas perguntas simples eram feitas sobre o ronco (se era alto a ponto de ser ouvido além de uma porta, por exemplo); se a pessoa ficava cansada ou dormia ao longo do dia; se tinha pressão arterial elevada; sobre índice de massa corpórea acima de 35 kg/m^2 ; se tinha idade acima dos 50 anos; se a circunferência do pescoço estava acima dos 40 cm e se era do sexo masculino. Menos do que três respostas positivas indicavam que a pessoa tinha baixo risco de ser portador de AOS, enquanto três ou mais indicavam alto risco (CHUNG *et al.*, 2012) (ANEXO B).

O risco de AOS também foi avaliado através do Questionário de Berlim (NETZER *et al.*, 1999). Os pacientes foram divididos em alto e baixo risco de AOS, com base nas respostas de perguntas de sintomas agrupadas em três categorias. Um paciente era considerado de alto risco para AOS se dois dos três seguintes critérios fossem observados: 1) ronco com duas das seguintes características: mais alto do que a fala, pelo menos 3 a 4 vezes por semana, reclamações de outros sobre o ronco, pausas respiratórias testemunhadas pelo

menos 3 a 4 vezes por semana; 2) fadiga no início da manhã e durante o dia, mais de 3 a 4 vezes por semana ou adormecer ao volante; e 3) presença de hipertensão ou obesidade (ANEXO C).

Os pacientes com baixo risco de AOS constatados nos questionários STOP-BANG e Berlim foram submetidos ao exame de sono com o equipamento Watch-PAT, que inclui a Tonometria Arterial Periférica (TAP), oximetria de pulso, actigrafia, sensores de ronco e posição, e frequência de pulso. O Watch-PAT consiste em um dispositivo colocado no pulso da mão não dominante do paciente, conectado a um sensor posicionado no dedo indicador do mesmo lado do paciente (*probe*). Os sensores de ronco e posição são fixados com adesivos na fúrcula esternal e no tórax, e o oxímetro é colocado no dedo anelar também da mão não dominante do paciente, de acordo com o modelo apresentado na figura cedida pela Itamar Ltda (FIGURA 2).

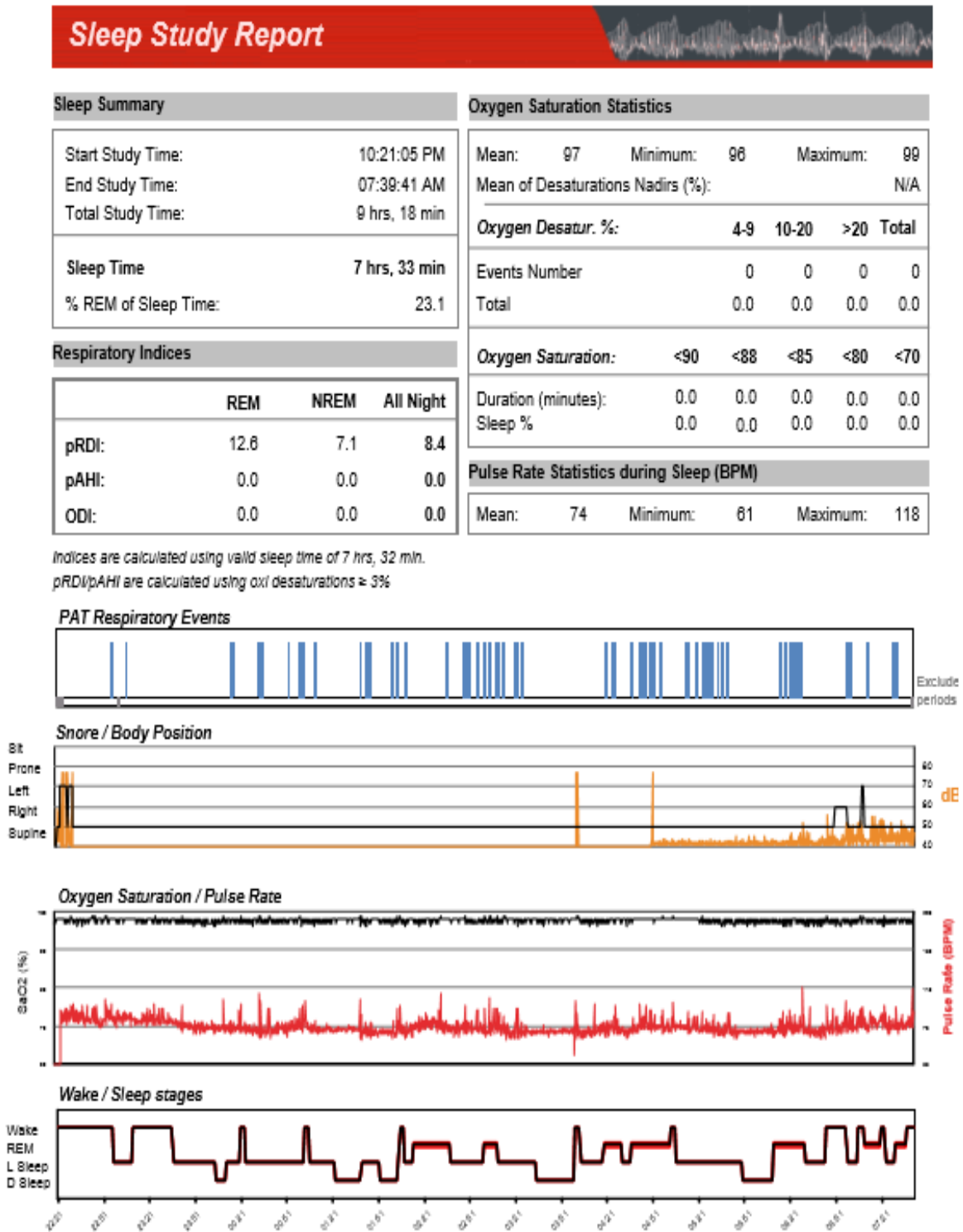
Figura 2 – Registro de Tonometria Arterial Periférica com Watch-PAT



Fonte: Itamar Medical (CORTESIA).

O *software* específico do aparelho (zzzPAT^R) faz a leitura do exame. O algoritmo do zzzPAT é baseado em 14 características extraídas de duas séries da amplitude da Tonometria Arterial Periférica e dos períodos interpulso (PIP). Esses dados, associados à actigrafia, permitem o estadiamento do sono em vigília, sono leve, sono profundo e sono REM (PINTO *et al.*, 2015) (FIGURA 3).

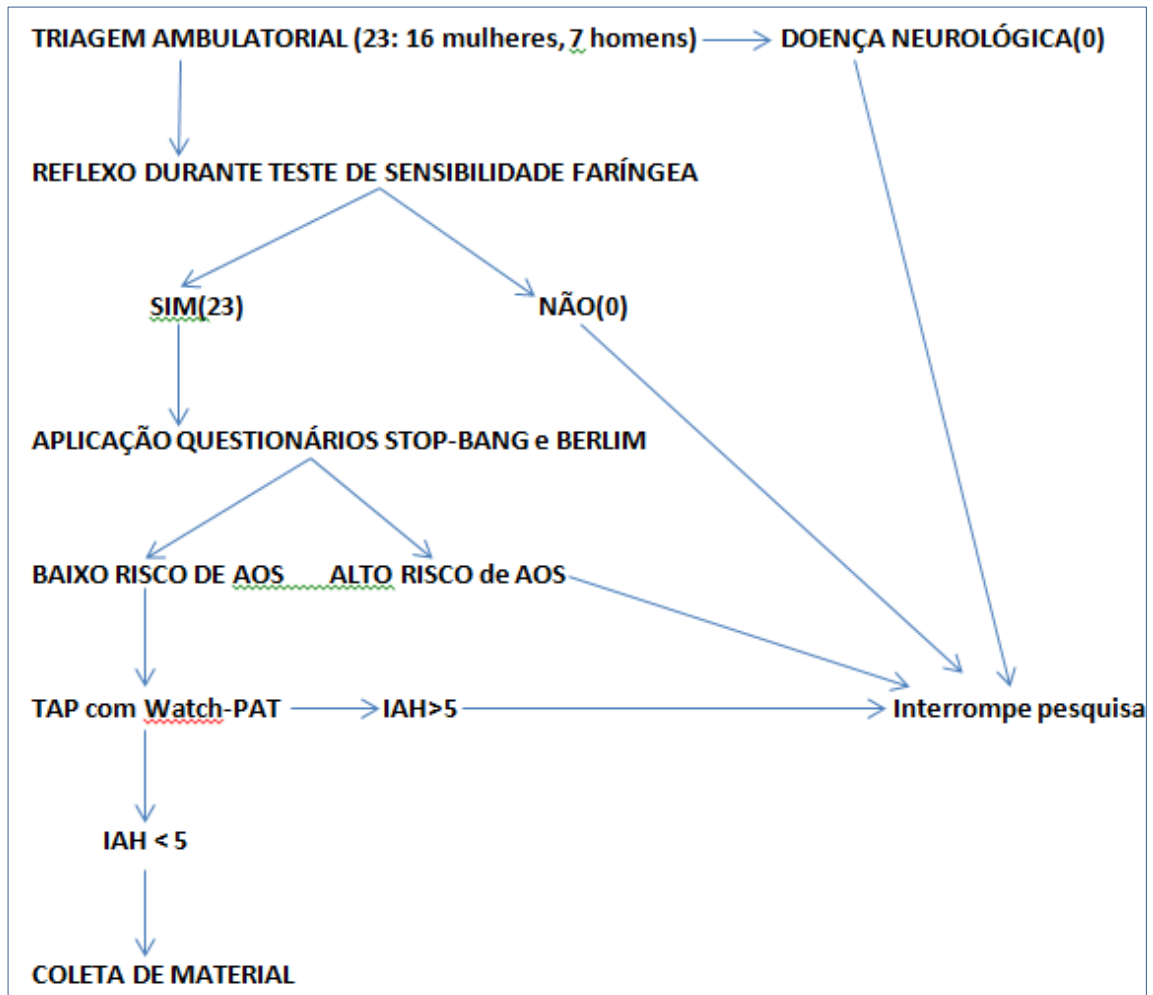
Figura 3 – Relatório principal emitido pelo Watch-PAT



Foram incluídos na pesquisa pacientes entre 18 e 65 anos, presença de reflexo durante o teste de sensibilidade faríngea, questionários STOP-BANG e Berlim indicativos de baixo risco de AOS e $IAH < 5$ no registro da TAP com Watch-PAT. Foram excluídos pacientes com doença neurológica e história de AVC (Figura 4). Ademais, foi devidamente

ênfatisado ao paciente que os procedimentos seriam realizados apenas para fins científicos e esclarecido conforme Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE B).

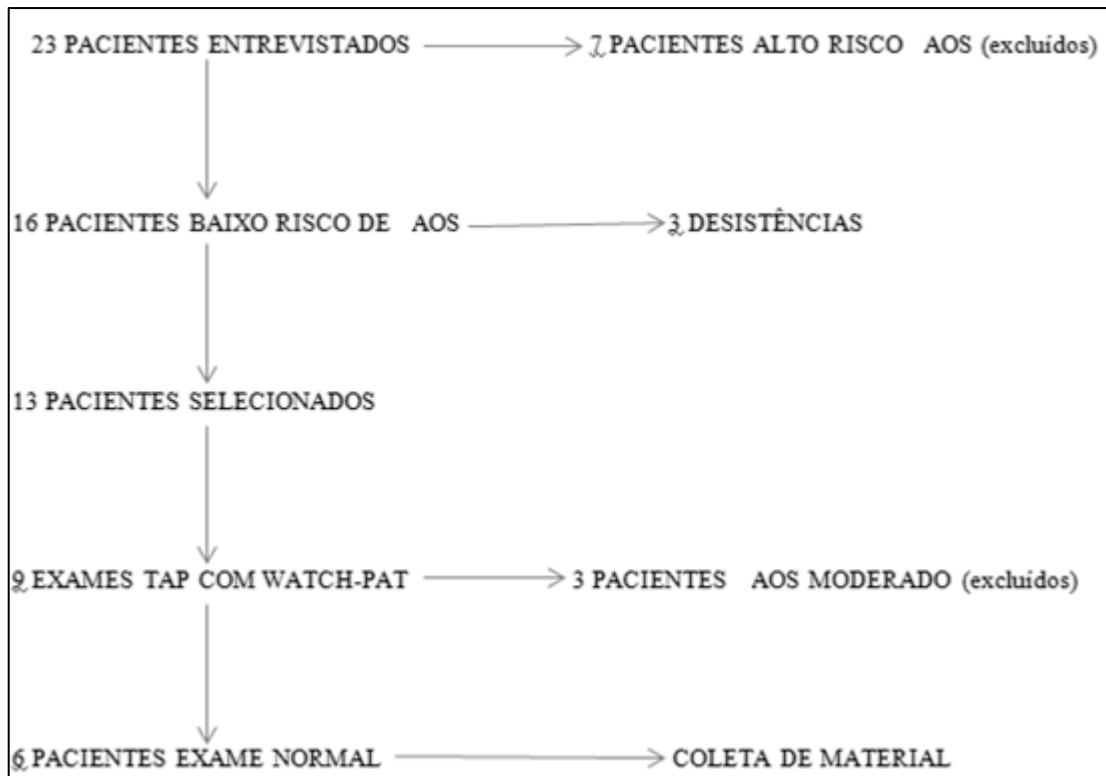
Figura 4 – Fluxograma de triagem dos pacientes



Fonte: elaborada pelo autor.

Os questionários STOP-BANG e Berlim foram aplicados em 23 pacientes durante a consulta pré-operatória. Destes, sete foram excluídos da pesquisa em virtude do alto risco de AOS. Dentre os 16 pacientes restantes, com baixo risco de AOS, três desistiram de participar das etapas seguintes da pesquisa. Treze pacientes foram então selecionados, dentre os quais nove realizaram o exame de TAP com Watch-PAT. Cinco pacientes realizaram o exame no hospital durante o internamento um dia antes da cirurgia, enquanto os outros quatro realizaram-no em seus próprios domicílios. Três pacientes foram excluídos após a constatação de AOS moderado pelo dispositivo (IAH: 16,1; 19,6; 28,5). Finalmente, os seis pacientes que apresentaram ausência de AOS pelo exame (IAH < 5) foram selecionados para a coleta do material (FIGURA 5).

Figura 5 – Triagem dos pacientes



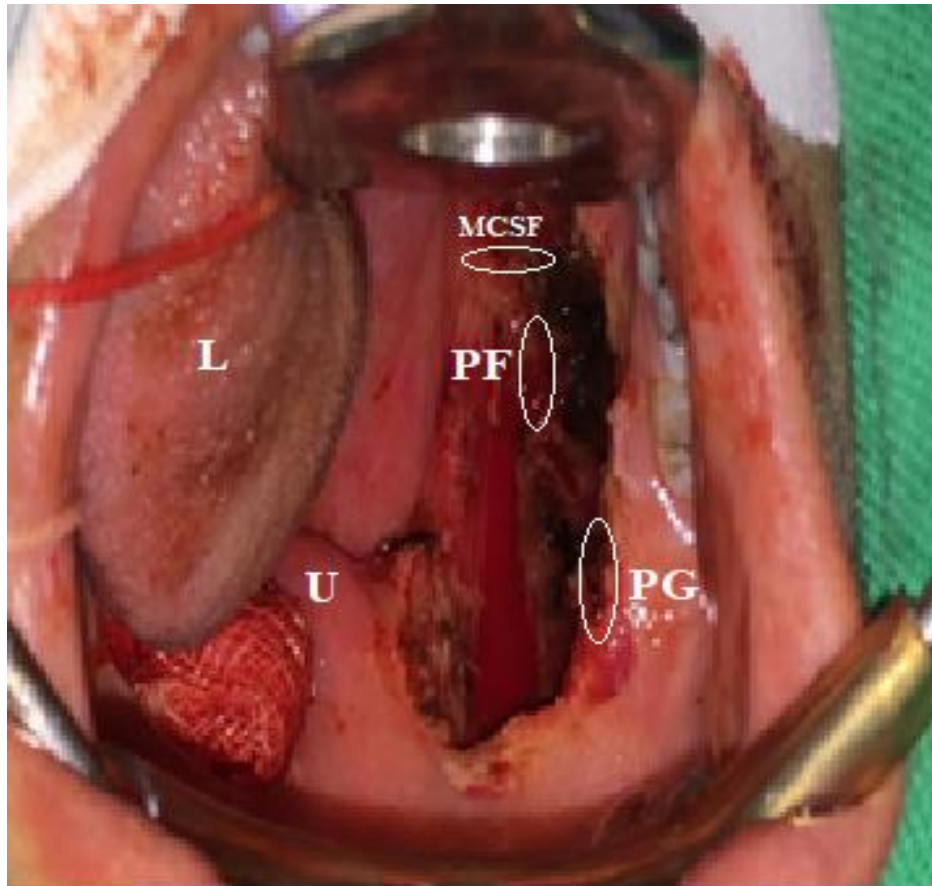
Fonte: elaborada pelo autor.

3.2 Obtenção das amostras

As amostras dos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe foram obtidas durante procedimento de tonsilectomia das palatinas convencional, previamente indicado no serviço de Otorrinolaringologia do HUWC. A retirada das amostras foi um procedimento adicional à cirurgia de tonsilectomia das palatinas.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por dissecação bilateral, com o paciente em decúbito dorsal horizontal com hiperextensão cervical (posição de *Rose*), sob anestesia geral e intubação orotraqueal. Padronizou-se o local da coleta das amostras dos três músculos em todos os indivíduos, optando-se pelo lado direito dos pacientes, em virtude da maior facilidade da técnica para o cirurgião destro. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo cirurgião e não houve intercorrências cirúrgicas (FIGURA 6).

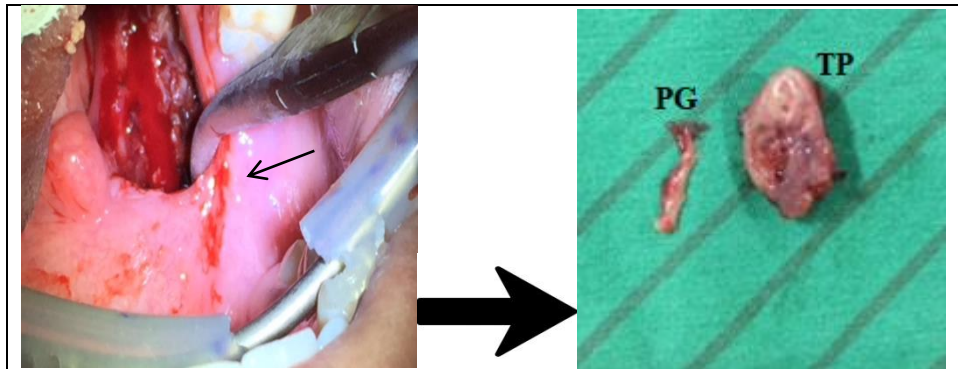
Figura 6 – Visão do cirurgião após ressecção da tonsila palatina direita. PG, Palatoglosso; PF, Palatofaríngeo; MCSF, Músculo Constrictor Superior da Faringe; U, úvula; L, língua



Fonte: elaborada pelo autor.

Após a dissecação da tonsila direita, um pequeno fragmento da porção cranial do músculo palatoglosso era obtido após incisão longitudinal do arco palatoglosso, superiormente (Figura 7), repetindo-se o mesmo procedimento no arco palatofaríngeo, inferiormente, representado pelo músculo palatofaríngeo em sua porção caudal. Próxima a essa incisão, uma terceira amostra era obtida após ressecção transversal da parede posterior da orofaringe, permitindo, assim, a obtenção do músculo constritor superior da faringe. A hemostasia com eletrocautério bipolar era realizada somente após a etapa de coleta para evitar dano estrutural aos músculos.

Figura 7 – Obtenção da amostra relativa ao músculo palatoglosso. Local de ressecção da amostra (seta); PG, fragmento do músculo palatoglosso (3mm x 10mm); TP, tonsila palatina



Fonte: elaborada pelo autor.

Foram, então, obtidas 18 espécimes da faringe, seis oriundas do músculo palatoglosso, seis do músculo palatofaríngeo e seis do músculo constritor superior da faringe. Realizava-se a marcação com fio Nylon® para identificar a parte superior das peças.

3.3 Preparo da amostra

As amostras 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.

3.4 Preparo dos cortes para imunofluorescência

As amostras eram posicionadas com suas porções superiores voltadas para cima e porções mediais voltadas para a direita, sendo, então, tomadas as suas medidas: altura e comprimento relativos a seus maiores eixos (FIGURA 8).

Figura 8 – Medição da amostra



Fonte: elaborada pelo autor.

Em seguida, elas eram pesadas em balança de precisão (FIGURA 9).

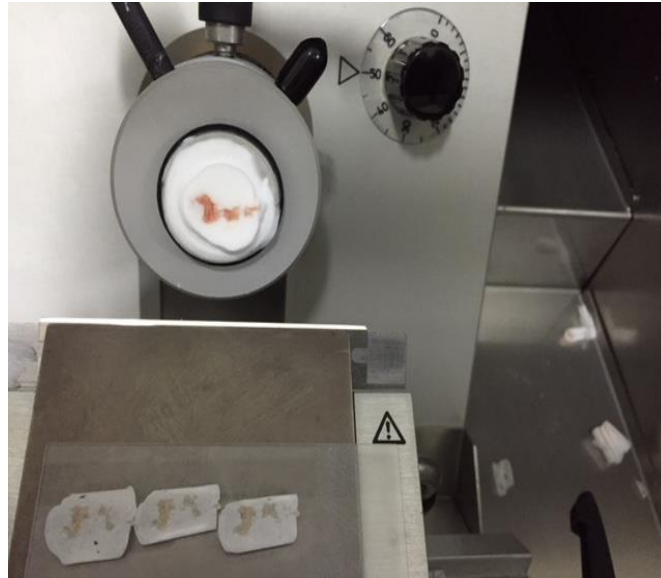
Figura 9 – Pesagem da amostra



Fonte: elaborada pelo autor

A peça era, então, ajustada na base do criostato, com sua face superior alinhada ao marco de referência e fixada com Jung TissueFreezing Medium® (Leica Microsystems, Nussloch, Germany), assegurando-se a correta identificação das regiões da peça na lâmina (FIGURA 10). Realizaram-se cortes longitudinais nas amostras relativas aos músculos palatoglosso e palatofaríngeo e cortes transversais nas amostras do músculo constritor superior da faringe com espessura de 50 μ m, em criostato Leica® modelo CM1850 (LeicaMicrosystems, Nussloch, Germany), à temperatura de -18 a -20°C.

Figura 10 – Secção da peça no criostato



Fonte: elaborada pelo autor

3.5 Coloração com Hematoxilina-Eosina

Os cortes das amostras foram colocados em lâminas Immunoslide® (Easypath®, São Paulo, SP). Foi confeccionada imediatamente após o corte de cada amostra uma lâmina corada com hematoxilina de Harris (Laborclin®, Pinhais, PR) e com eosina amarelada (Inlab®, Diadema, SP) para avaliar a preservação e integridade dos tecidos e para servir de referência nos estudos histomorfométricos. O restante das lâminas foi arquivado em caixa própria, em congelador à temperatura -70°C até o momento da coloração.

3.6 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), seguidas 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 foi realizada 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 (FIGURA 11). As lâminas foram cobertas com lamínulas, colocadas em estojos e estocadas em refrigerador a -70°C .

Figura 11 – Etapa de lavagens durante imunofluorescência



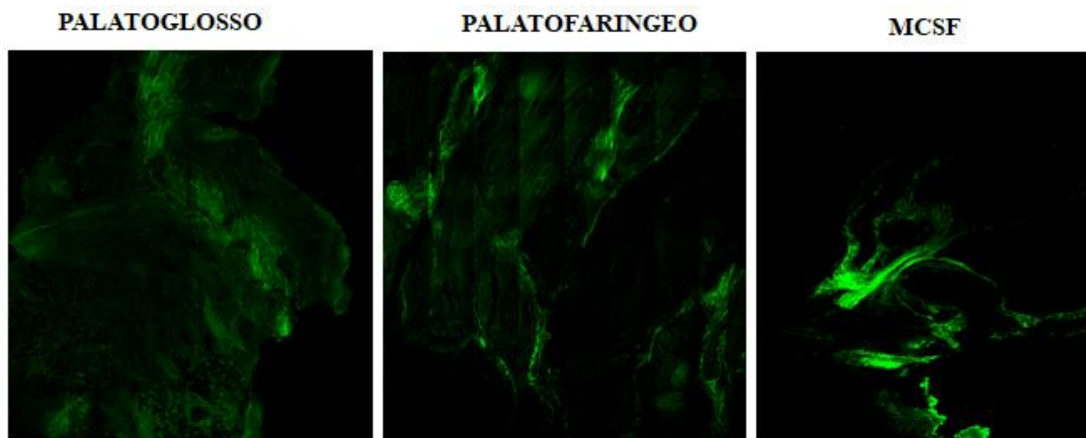
Fonte: elaborada pelo autor.

3.7 Análise histomorfométrica

Avaliaram-se nove cortes de cada peça dos seis indivíduos. As secções preparadas com imunofluorescência foram examinadas com microscópio confocal a laser equipado com epifluorescência (modelo LSM 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) Dualexix – 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.

Com o intuito de se comparar a densidade nervosa entre os três músculos, foram obtidas quatro imagens panorâmicas de secções selecionadas de cada músculo estudado. Escolheram-se os cortes com menor número de artefatos e melhor fluorescência e procedeu-se à aquisição de imagem com o método de mosaico e tridimensional (FIGURA 12).

Figura 12 – Imagem em mosaico representativa das amostras dos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe (MCSF)



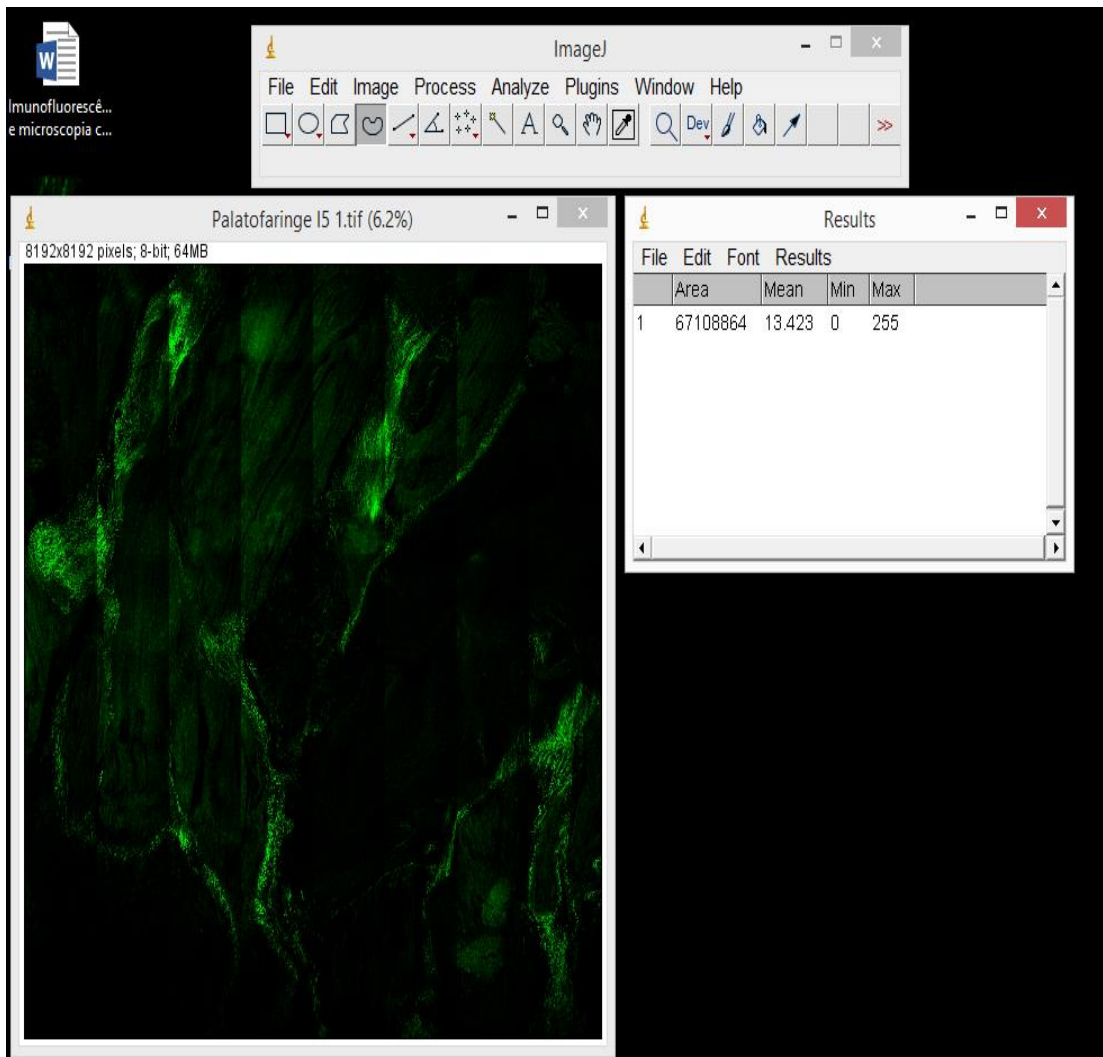
Objetiva com aumento de 40x.

Fonte: elaborada pelo autor.

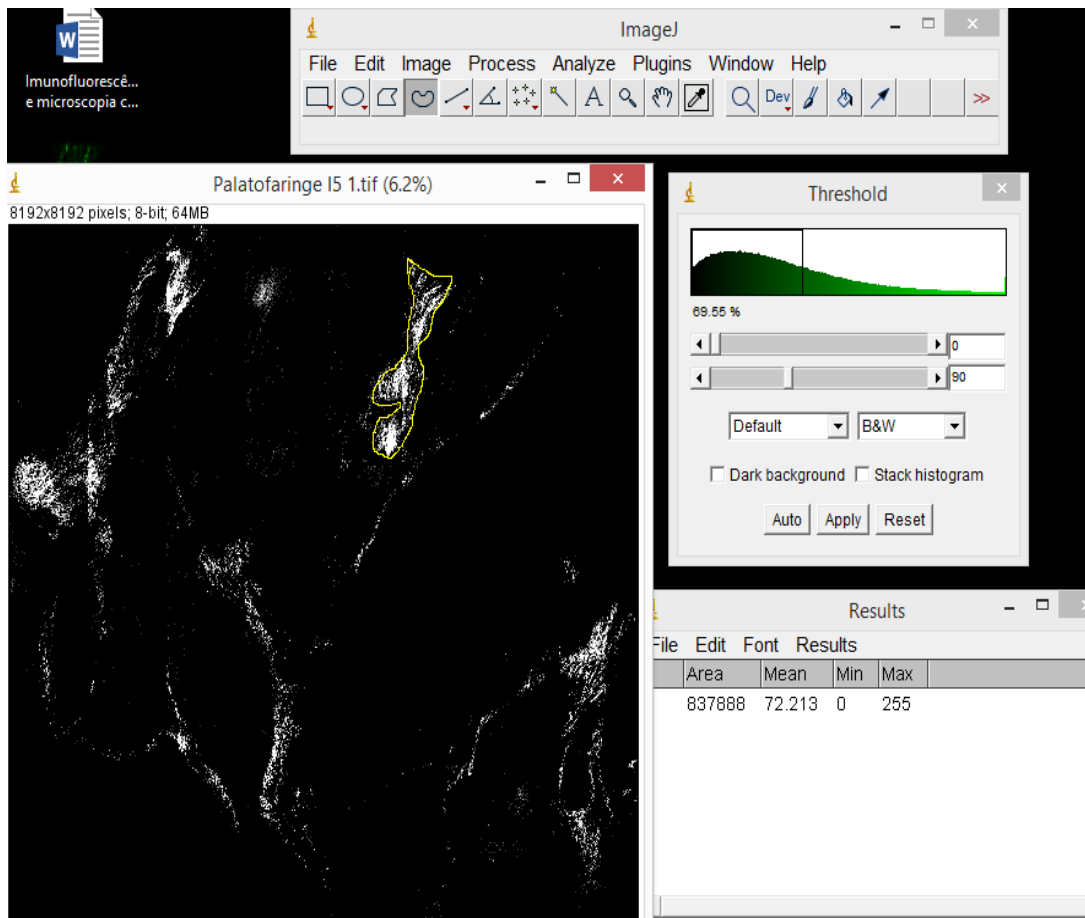
A imunofluorescência foi realizada também com a finalidade de obter dados quantitativos da marcação de anticorpo PGP 9.5 nas amostras (AHMED *et al.*, 2007). Para análise qualitativa, as micrografias foram feitas delimitando as áreas de interesse. A quantificação da marcação nas fotomicrografias foi analisada pela obtenção de densidade e marcação de histogramas (pixels) em razão da área total, sendo expressa em termos percentuais (FIGURA 13). A intensidade de imunofluorescência para PGP 9.5 nos espécimes foi mensurada por meio do ImageJ (NIH, Bethesda, EUA). Dessa forma, calculou-se a média da densidade através da porcentagem da área imunomarcada das fibras nervosas dos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe dentre as imagens panorâmicas selecionadas previamente.

Figura 13 – Figura representativa do processo de medição da densidade nervosa do músculo palatofaríngeo. Passo 1 - Imagem panorâmica captada com microscópio confocal (Área total). Passo 2 - Delimitação da região a ser calculada a densidade das fibras nervosas (Mensuração da área de imunofluorescência)

Passo 1: Área total



Passo 2: Mensuração da área de imunofluorescência



Fonte: elaborada pelo autor.

3.8 Análise estatística

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

Com o intuito de comparar as médias das densidades nervosas entre os três músculos estudados, foi realizado teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade, observando se os resultados obedeciam a uma distribuição normal. Em seguida, foi realizado o teste T seguido do teste de Wilcoxon para os dados não paramétricos. Utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn's para comparações múltiplas.

O software GraphPad Prism® versão 6.0 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2015) foi utilizado para a realização dos procedimentos estatísticos. Para todas as análises, foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Seis indivíduos foram selecionados para o estudo após os procedimentos de exclusão, compondo a amostra da seguinte forma: cinco indivíduos do sexo feminino e um do sexo masculino com idades variando entre 22 e 35 anos. O exame de Tonometria Arterial Periférica (TAP) por Watch-PAT dos seis indivíduos que participaram da pesquisa registrou valores de Índice de Apneia e Hipopneia (IAH) que oscilaram entre 0 e 2,1/hora (APÊNDICE C). Os dados morfológicos gerais das peças anatômicas estudadas foram descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados morfológicos gerais dos espécimes avaliados

DADOS	Ind 1	Ind 2*	Ind 3	Ind 4	Ind 5	Ind 6	Média ± DP
Peso PTG	0,21g	0,70g	0,56g	0,57g	0,74g	0,77g	0,59 ± 0,19
Largura PTG	1,3cm	1,2cm	0,9cm	1,0cm	0,8cm	0,9cm	1,02 ± 0,18
Comprimento PTG	0,8cm	0,6cm	0,8cm	0,7cm	0,7cm	0,6cm	0,7 ± 0,08
Peso PTF	0,20g		0,79g	0,75g	0,72g	0,77g	0,65 ± 0,22
Largura PTF	1,3cm		1,2cm	1,0cm	0,9cm	0,6cm	1 ± 0,24
Comprimento PTF	0,7cm		0,6cm	0,7cm	0,9cm	0,6cm	0,7 ± 0,11
Peso MCSF	0,23g	0,10g	0,79g	0,56g	0,64g	0,63g	0,49 ± 0,24
Largura MCSF	1,0cm	1,0cm	0,6cm	0,8cm	1,0cm	1,0cm	0,9 ± 0,15
Comprimento MCSF	0,5cm	0,5cm	0,4cm	0,7cm	0,3cm	0,5cm	0,48 ± 0,12

Ind, indivíduo; PTG, palatoglosso; PTF, palatofaríngeo; MCSF, músculo constritor superior da faringe; DP, desvio padrão.

Ind 2*: a peça relativa ao músculo palatofaríngeo do indivíduo 2 foi considerada inviável.

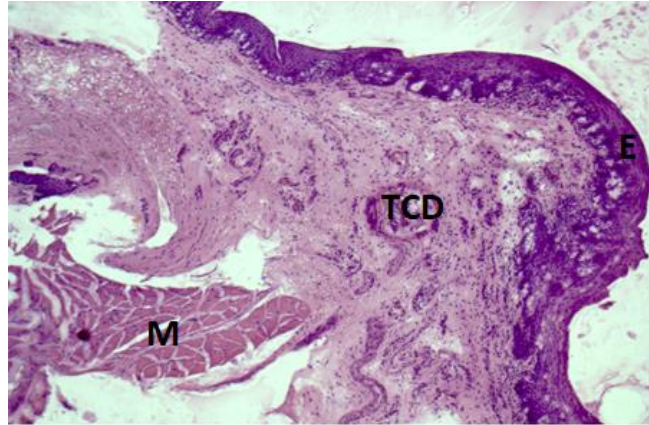
Fonte: elaborada pelo autor.

4.1 Coloração Hematoxilina-Eosina

4.1.1 Palatoglosso

Delimitado por um epitélio estratificado pavimentoso, visualizou-se tecido conjuntivo com vascularização intensa e feixes musculares (FIGURA 14).

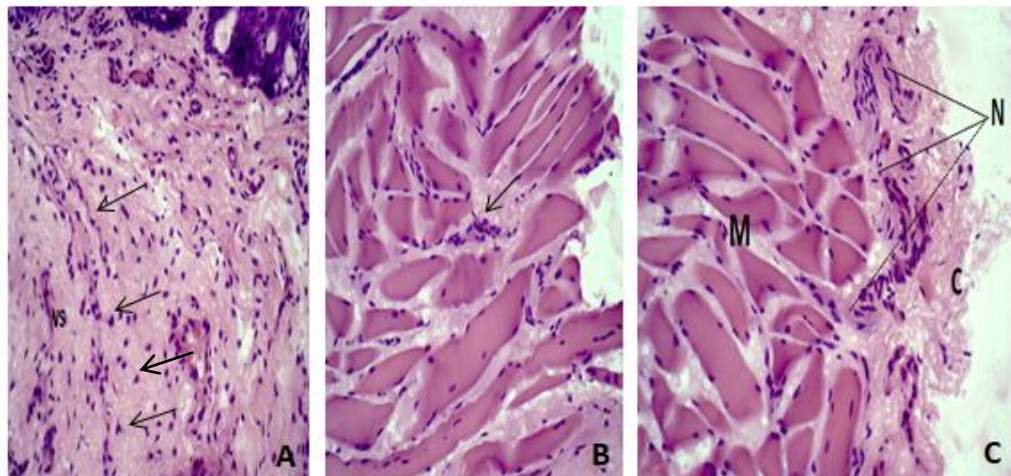
Figura 14 – Imagem panorâmica da peça evidenciando epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado (E), tecido conjuntivo denso (TCD) e camada muscular (M)



Objetiva com aumento de 50x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Foram visualizados filamentos nervosos em tecido conjuntivo subepitelial relacionados aos vasos sanguíneos, e entre as fibras musculares (FIGURA 15).

Figura 15 – Terminações nervosas (setas) dentro do tecido conjuntivo subepitelial relacionadas aos vasos sanguíneos (vs) (A). Filamento nervoso dentro do feixe muscular (B). Filamento nervoso (N) em tecido conjuntivo (C) que penetra entre as fibras musculares (M) (C)

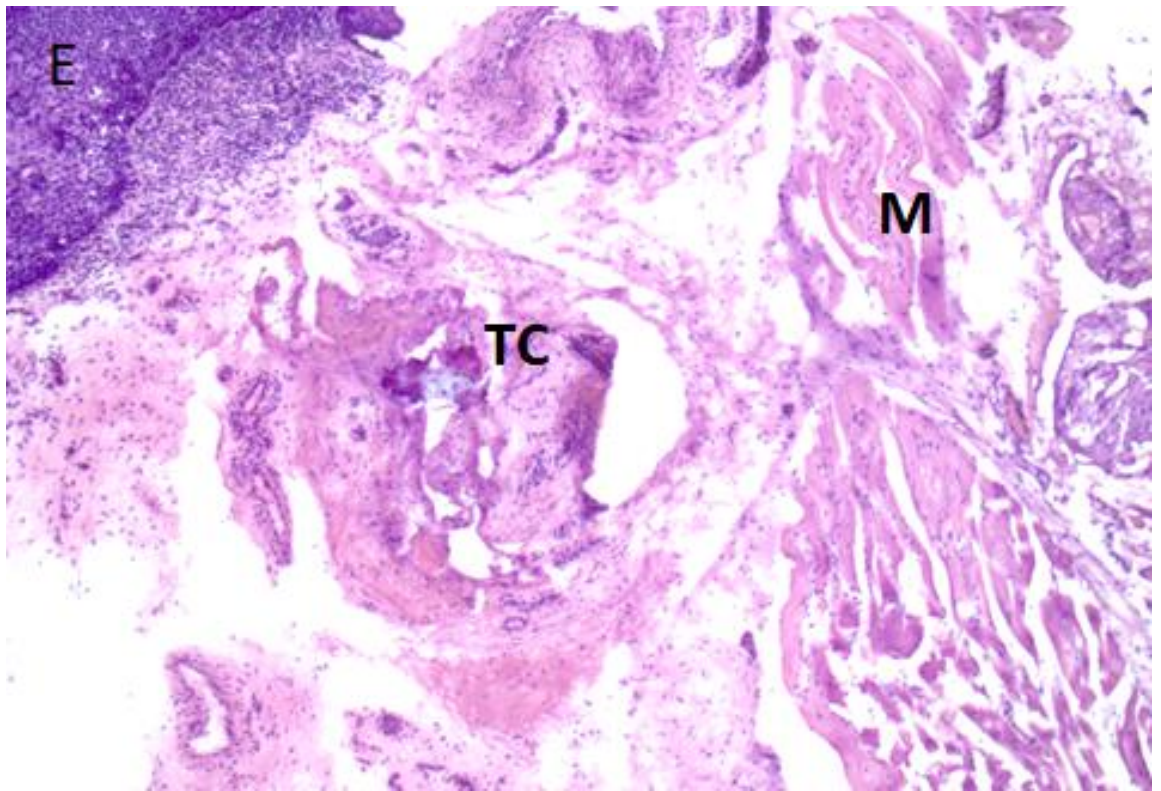


Objetiva com aumento de 200x.
Fonte: elaborada pelo autor.

4.1.2 Palatofaríngeo

A análise das lâminas demonstrou epitélio estratificado pavimentoso, tecido conjuntivo com intensa vascularização nas camadas mais profundas e muitas glândulas acinares mucossecretoras e camada muscular com fibras musculares desconectadas (FIGURA 16).

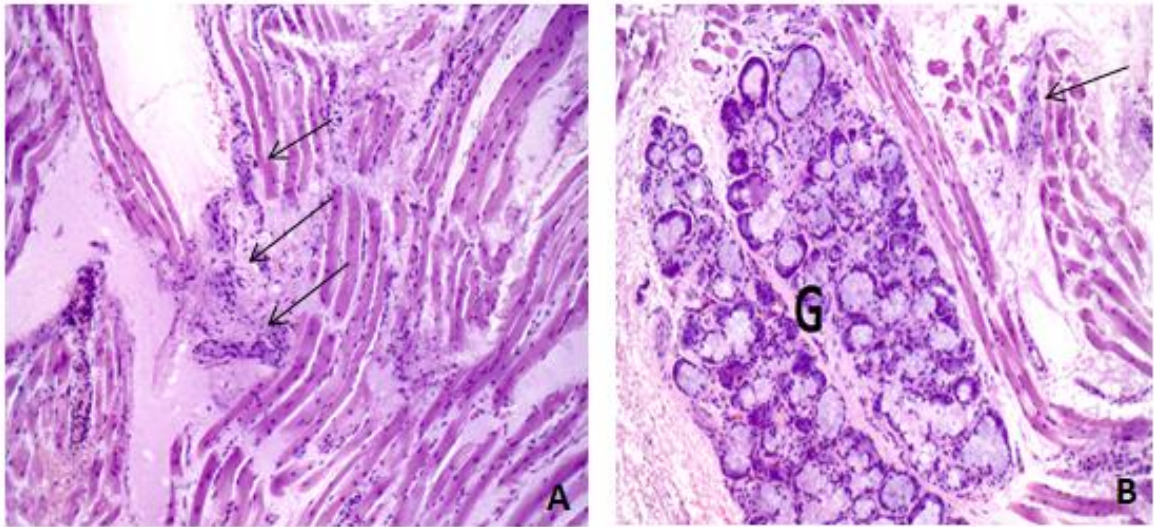
Figura 16 – Imagem panorâmica da peça evidenciando epitélio estratificado pavimentoso (E), tecido conjuntivo (TC) e feixes musculares (M)



Objetiva com aumento de 50x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Foram visualizados vários filetes nervosos entre os feixes musculares (FIGURA 17).

Figura 17 – Vários filetes nervosos entre as fibras musculares (A). Numerosas glândulas acinares mucossecretoras (G) à esquerda e filete nervoso (seta) entre as fibras musculares à direita (B)

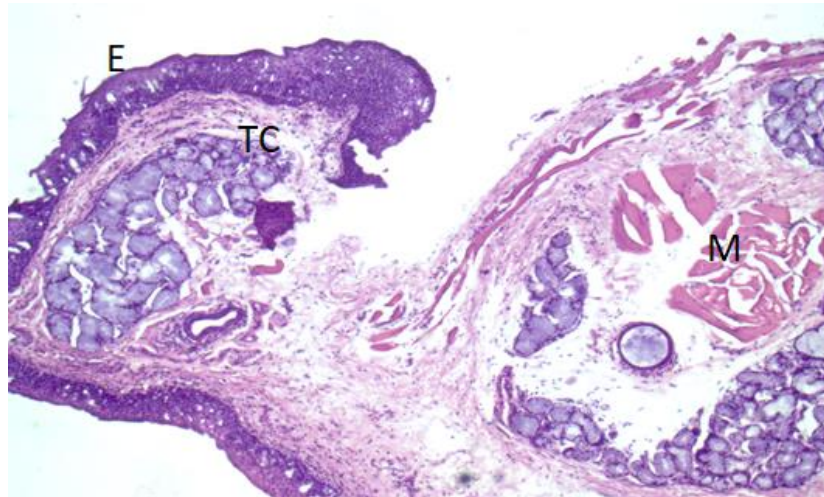


Objetiva com aumento de 100x.
Fonte: elaborada pelo autor.

4.1.3 Músculo constritor superior da faringe

Na amostra relativa ao músculo constritor superior da faringe, visualizou-se epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado, tecido conjuntivo com vasos e terminações nervosas e um aglomerado de glândulas acinares mucossecretoras (FIGURA 18).

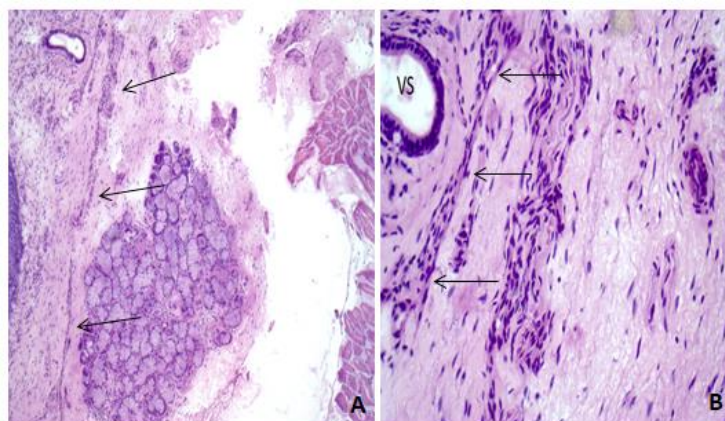
Figura 18 – Imagem panorâmica da peça evidenciando epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado (E), tecido conjuntivo (TC) com várias glândulas acinares mucossecretoras e fibras musculares (M)



Objetiva com aumento de 50x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Foram visualizados longos filetes nervosos no tecido conjuntivo subepitelial (FIGURA 19).

Figura 19 – Filete nervoso longo no tecido conjuntivo subepitelial (A). Filete nervoso (setas) próximo a vaso sanguíneo (VS) em tecido conjuntivo (B)



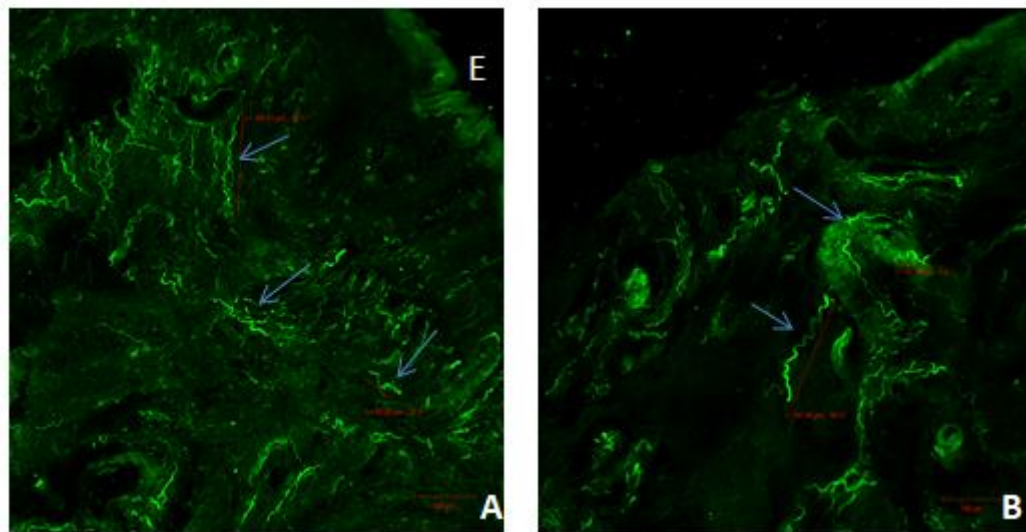
Objetiva com aumento de 50x (A) e aumento de 200x (B).
Fonte: elaborada pelo autor.

4.2 Imunofluorescência para anticorpo primário Anti-Pgp 9.5

4.2.1 Palatoglosso

A análise das lâminas preparadas com imunofluorescência sob microscopia confocal de varredura a laser (MCL) referente ao músculo palatoglosso revelou a presença de terminações nervosas livres finas em diferentes sentidos em meio ao tecido conjuntivo subepitelial, que mediam em comprimento entre 60 e 167 μm , e na camada muscular, paralelas às fibras musculares. A relação das terminações nervosas com os vasos sanguíneos também foi constatada na análise por MCL (FIGURA 20).

Figura 20 – Terminações nervosas livres em diferentes sentidos no tecido conjuntivo subepitelial. E, epitélio (A). Relação das terminações nervosas livres com vasos sanguíneos (B)

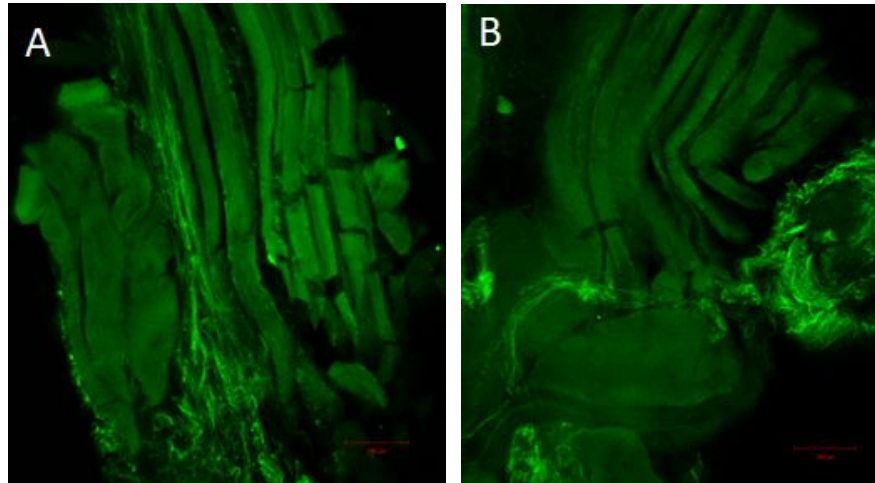


Barra = 100 μm e objetiva com aumento de 10x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Observaram-se feixes nervosos de diferentes calibres, alguns entrelaçados e paralelos às fibras musculares; outros feixes volumosos emitiam ramificações perpendiculares às fibras musculares (FIGURA 21).

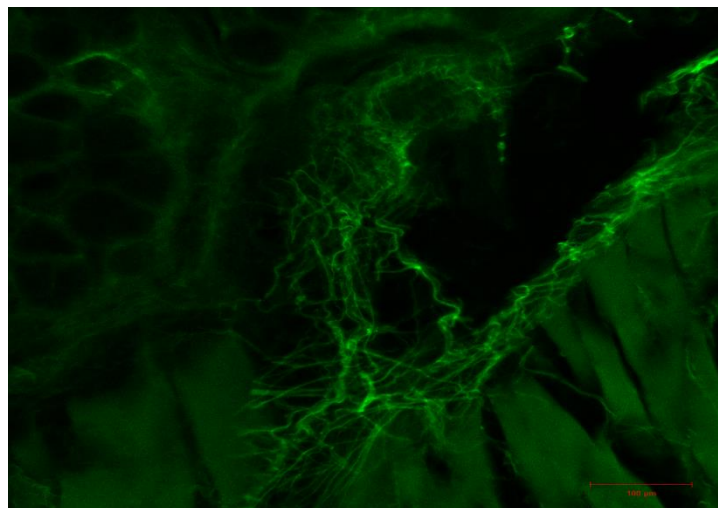
Figura 21 – Feixes nervosos entrelaçados e paralelos às fibras musculares (A). Feixes nervosos emitindo ramificações perpendiculares às fibras musculares (B)



Barra = 100 μ m e objetiva com aumento de 20x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Foram visualizadas ainda formações nervosas em rede (*network*) (FIGURA 22).

Figura 22 – Formação nervosa tipo *network*

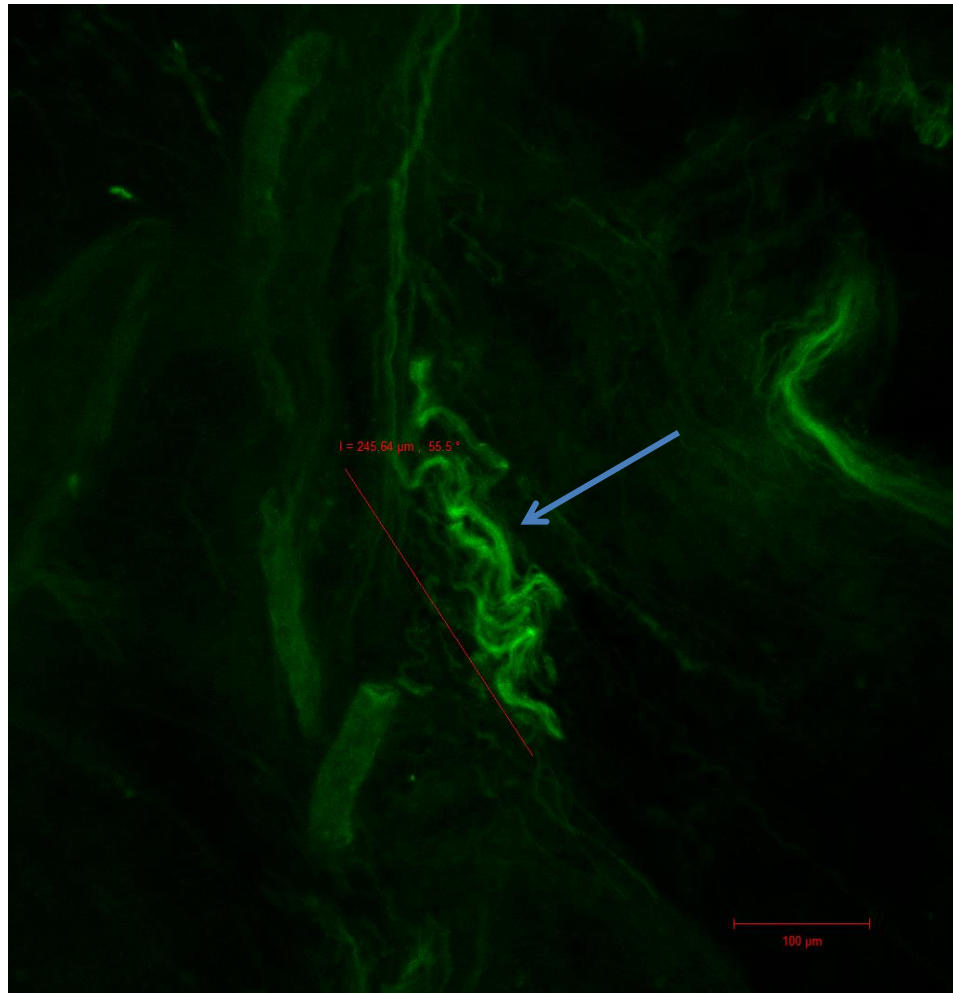


Barra = 100 μ m e objetiva com aumento de 20x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Dentro da camada muscular, também foram identificadas terminações nervosas complexas de diferentes tamanhos e formatos. Entre essas estruturas, visualizou-se uma

formação arborizada não encapsulada *Ruffini-like*, de 245 μm em seu maior diâmetro (FIGURA 23).

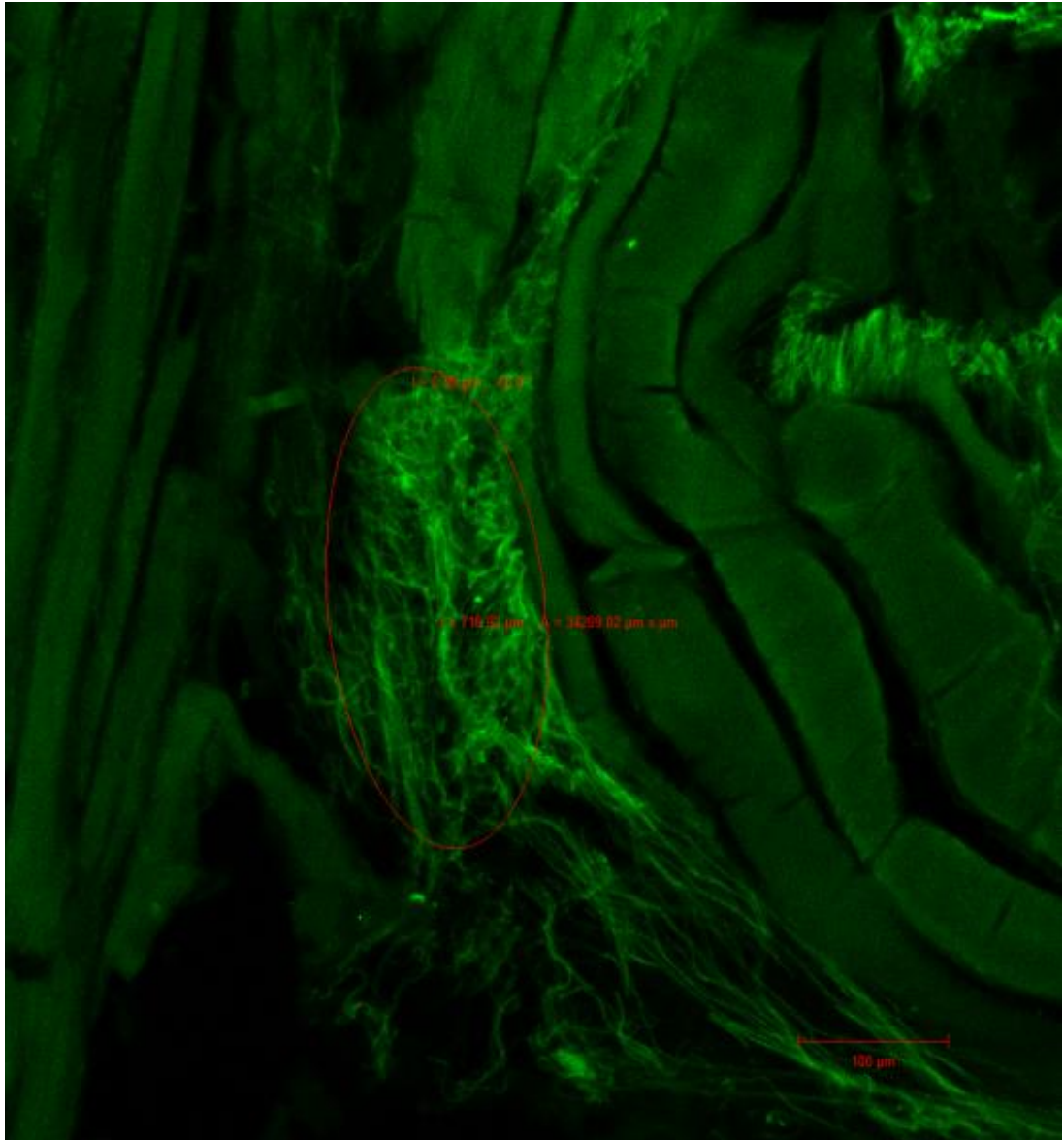
Figura 23 – Formação arborizada não encapsulada *Ruffini-like*



Barra = 100 μm e objetiva com aumento de 20x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Ainda na camada muscular, foi visualizado um emaranhado de fibras nervosas com formato cônico *Golgi-like* de aproximadamente 716 μm em seu maior diâmetro (FIGURA 24).

Figura 24 – Formações nervosas com formato cônico *Golgi-like*

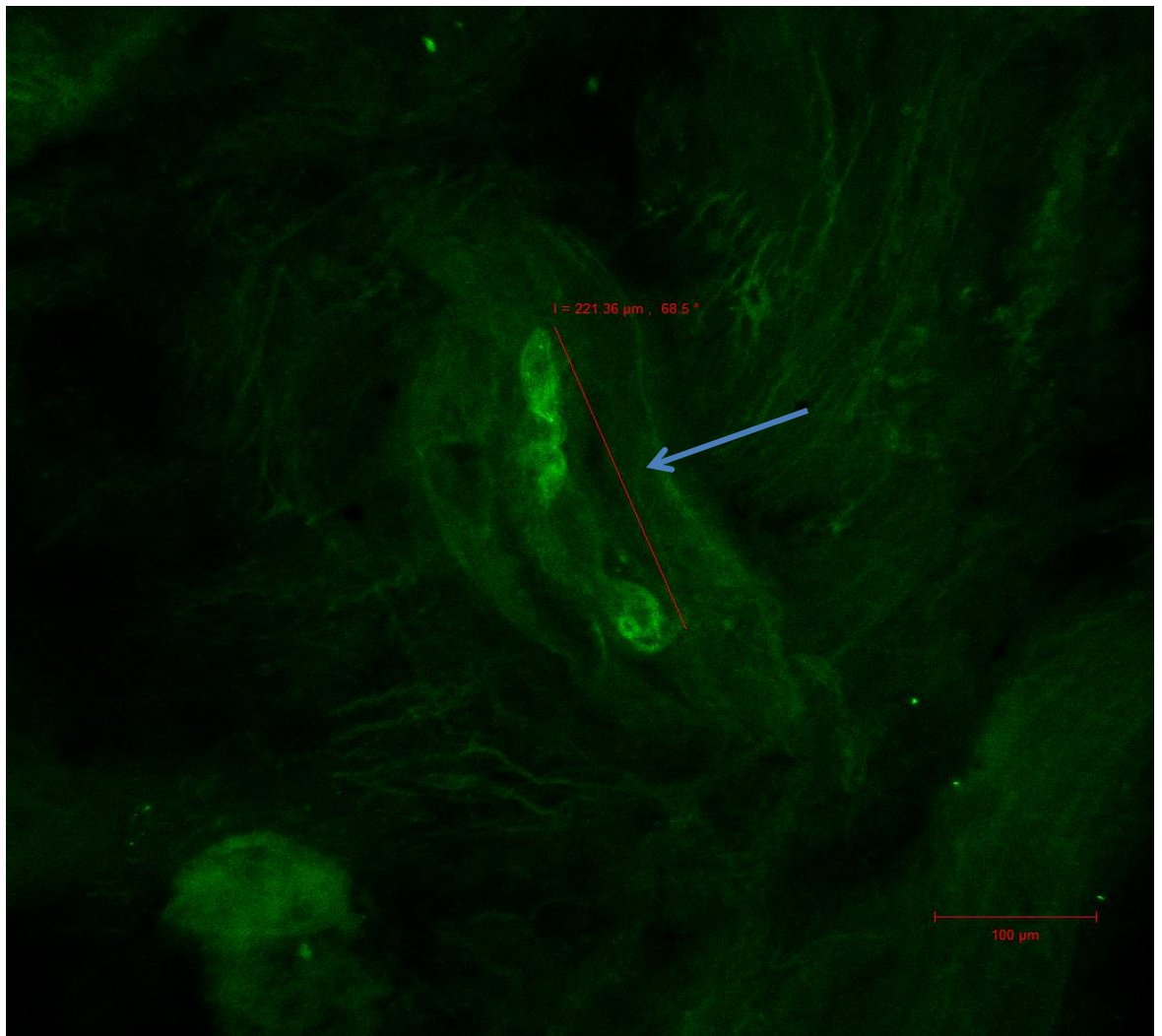


Barra = 100 μm e objetiva com aumento de 20x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Observaram-se, ainda, estruturas cilíndricas *Meissner-like* no tecido conjuntivo próximo à musculatura, medindo 221 μm em seu maior diâmetro (FIGURA 25).

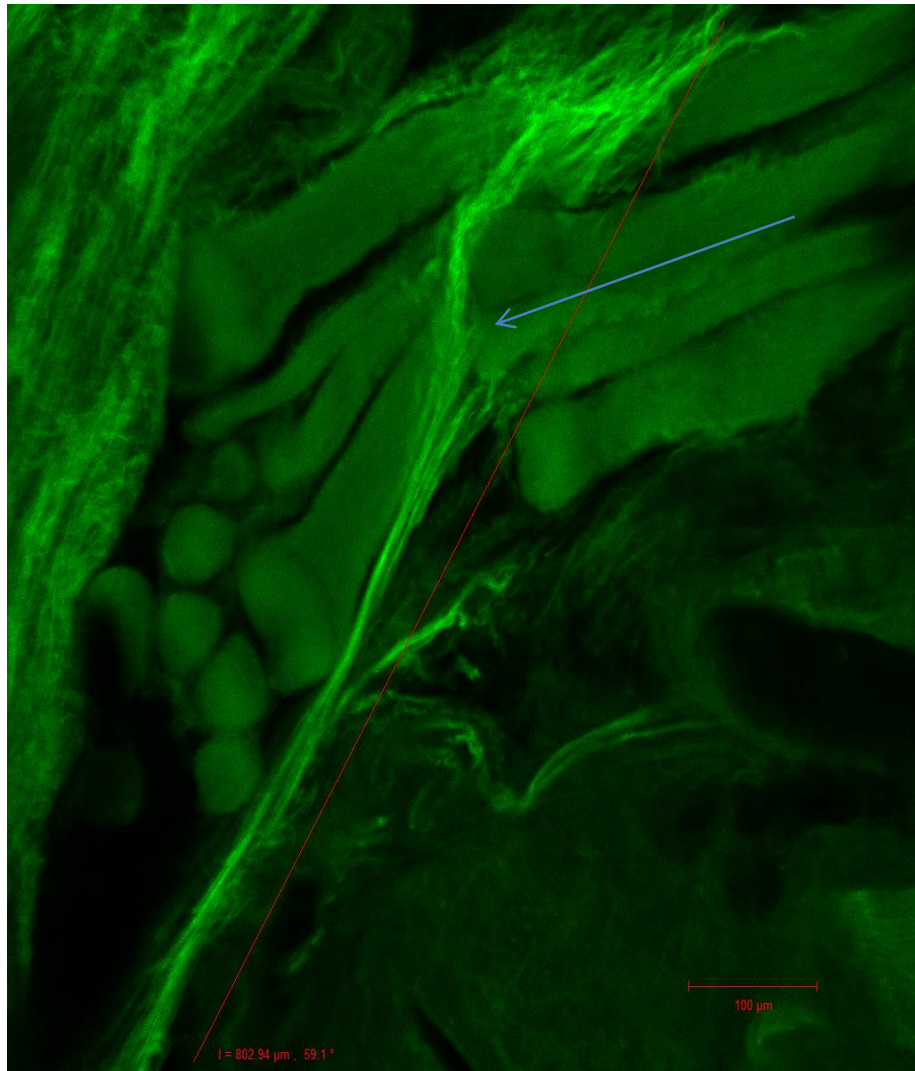
Figura 25 – Formação nervosa *Meissner-like* no tecido conjuntivo próximo à musculatura



Barra = $100 \mu\text{m}$ e objetiva com aumento de 20x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Identificaram-se fusos musculares, distribuídos esparsamente pelo tecido muscular, medindo $802 \mu\text{m}$ de comprimento (FIGURA 26).

Figura 26 – Fusos musculares distribuídos esparsamente pelo tecido muscular

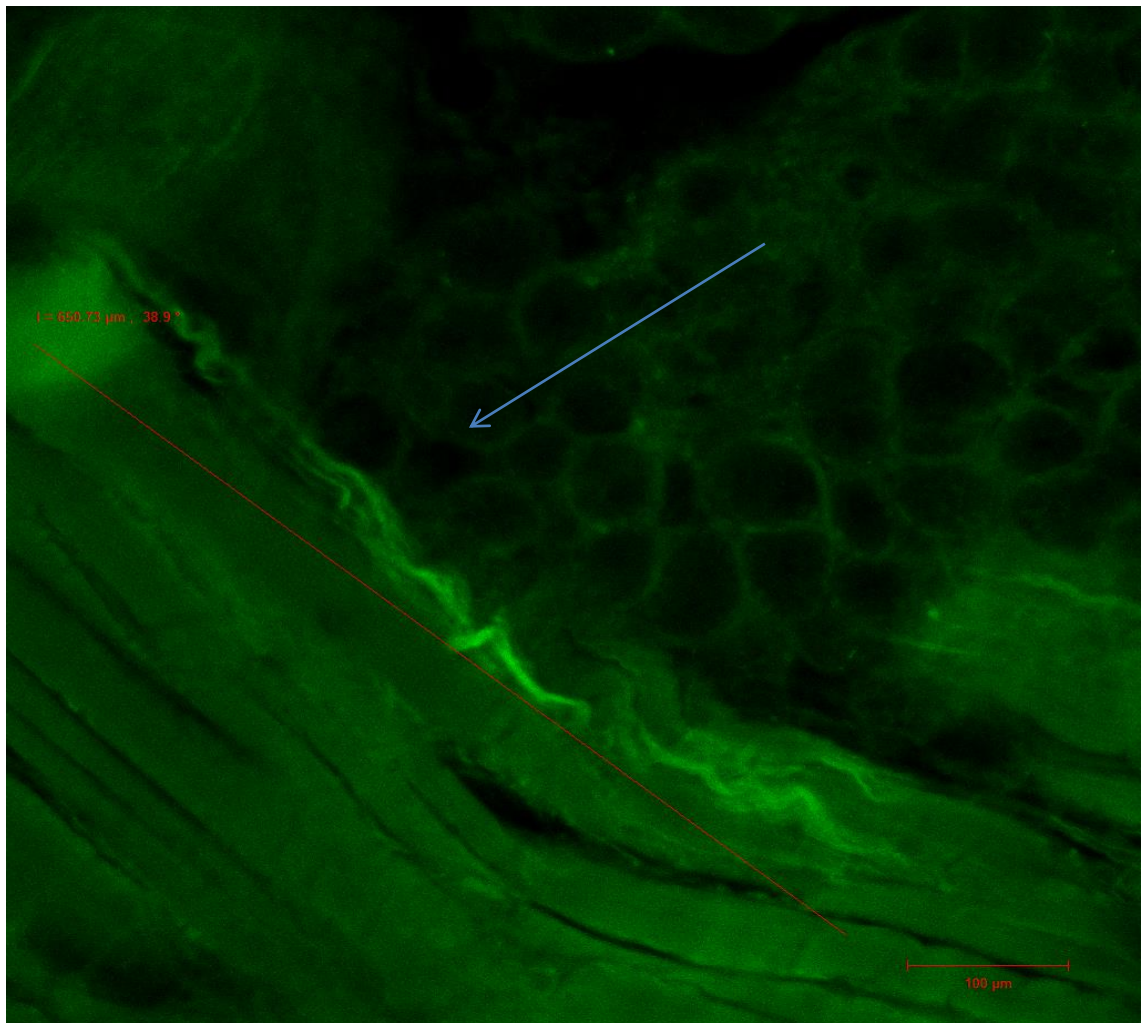


Barra = 100 μm e objetiva com aumento de 20x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Foram encontradas estruturas nervosas alongadas com formato em espiral (*spiral-wharves*), de 650 μm de comprimento, que corriam paralelamente às fibras musculares (FIGURA 27).

Figura 27 – Estruturas nervosas alongadas com formato em espiral (*spiral-wharves*) correndo paralelamente às fibras musculares

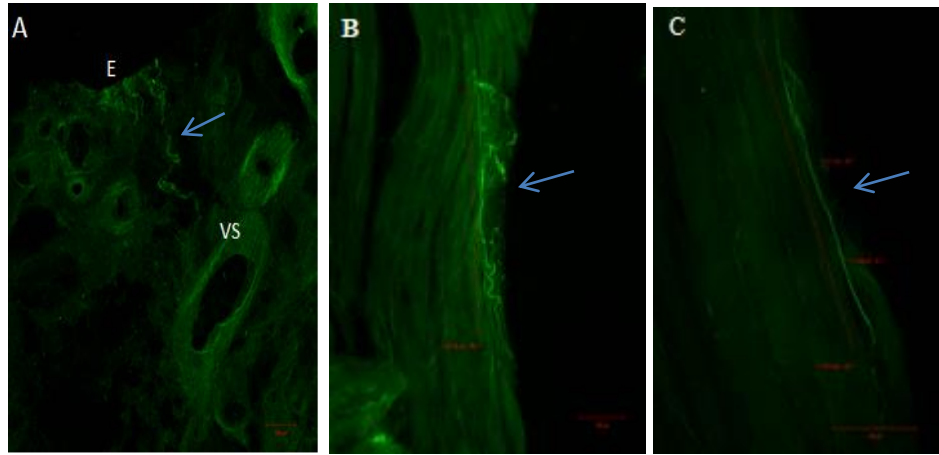


Barra = 100 μm e objetiva com aumento de 20x.
Fonte: elaborada pelo autor.

4.2.2 Palatofaríngeo

A análise das lâminas referentes ao músculo palatofaríngeo mostrou a presença de terminações nervosas livres bem finas e tortuosas no epitélio, caminhando em direção aos vasos sanguíneos, que mediam em comprimento 390 μm , e na camada muscular, paralelas às fibras musculares, medindo em comprimento entre 278 e 407 μm (FIGURA 28).

Figura 28 – Terminações nervosas livres (seta) finas e tortuosas no epitélio, caminhando em direção aos vasos sanguíneos. E – epitélio; VS – vaso sanguíneo (A). Terminações nervosas livres paralelas às fibras musculares (B e C)



Barra = 100 μm

Aumento de 10x

Barra = 100 μm

Aumento de 20x

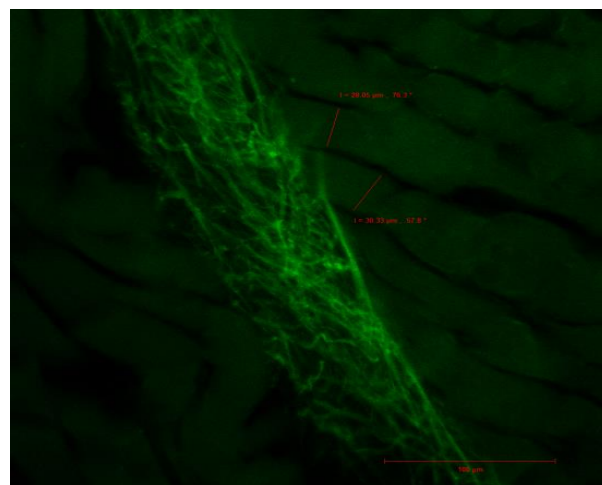
Barra = 100 μm

Aumento de 40x

Fonte: elaborada pelo autor.

Na camada muscular, foi visualizado um padrão entrelaçado de feixes nervosos cruzando as fibras musculares que mediam em comprimento entre 30 e 75 μm (FIGURA 29).

Figura 29 – Padrão entrelaçado de feixes nervosos cruzando as fibras musculares

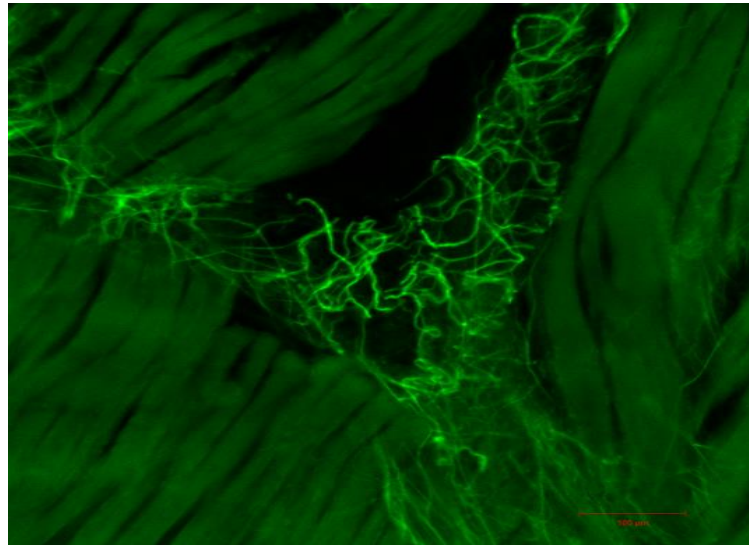


Barra = 100 μm e objetiva com aumento de 20x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Foram encontradas, ainda, formações nervosas tipo *network* (FIGURA 30).

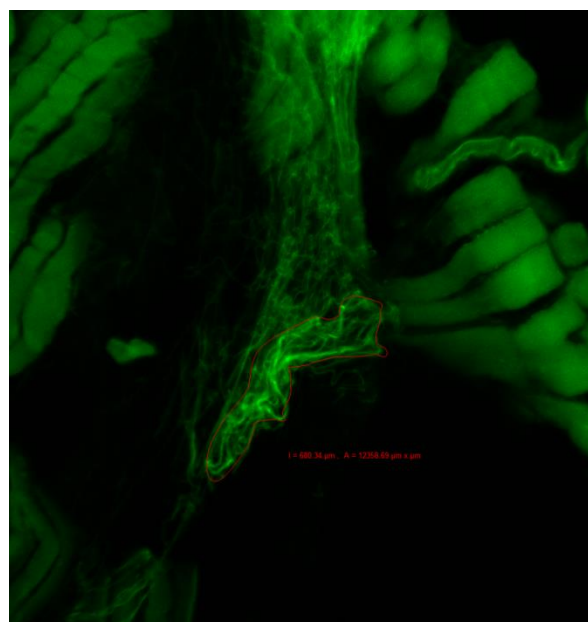
Figura 30 – Formação nervosa tipo *network*



Barra = 100 μm e objetiva com aumento de 20x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Identificaram-se formações nervosas complexas *Golgi-like* dentro da camada muscular com comprimento de cerca de 680 μm em seu maior diâmetro e área de 12.000 μm^2 (FIGURA 31).

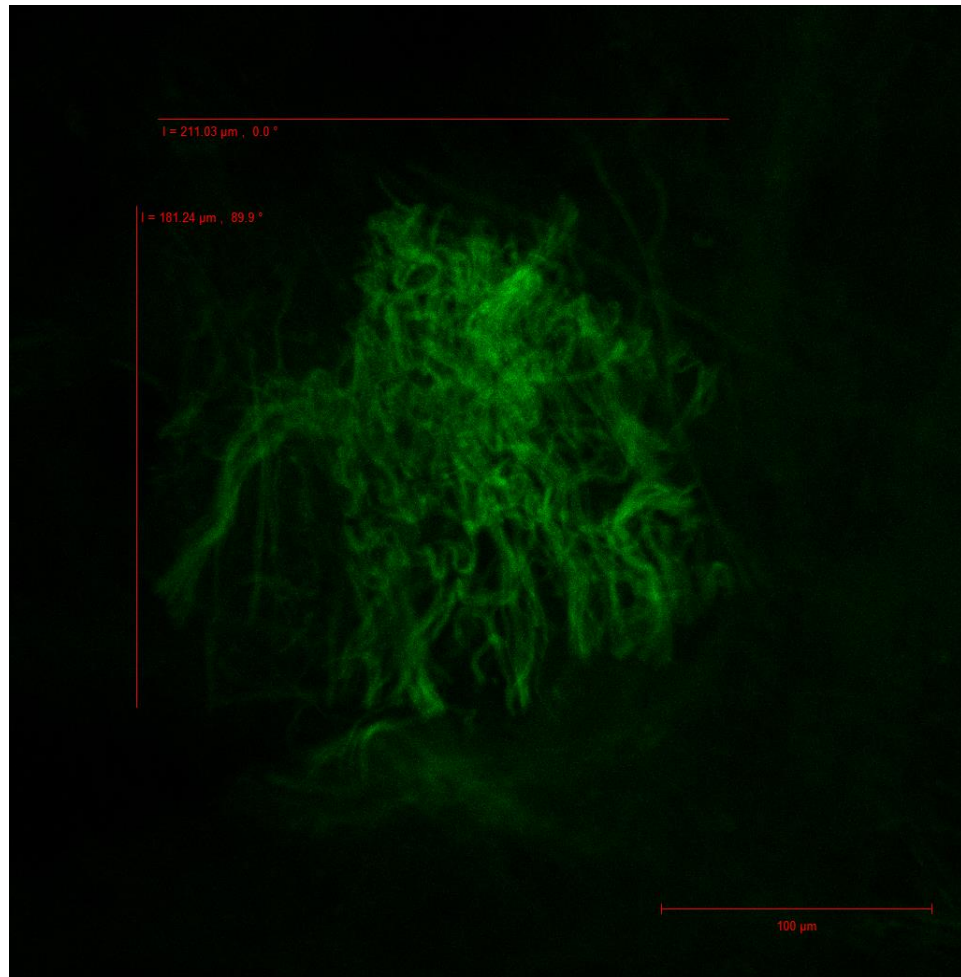
Figura 31 – Formação nervosa complexa *Golgi-like*



Barra = 100 μm e objetiva com aumento de 20x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Observaram-se formações complexas com padrão *Ruffini-like*, de 211 μm em seu maior diâmetro (FIGURA 32).

Figura 32 – Formação nervosa complexa *Ruffini-like*

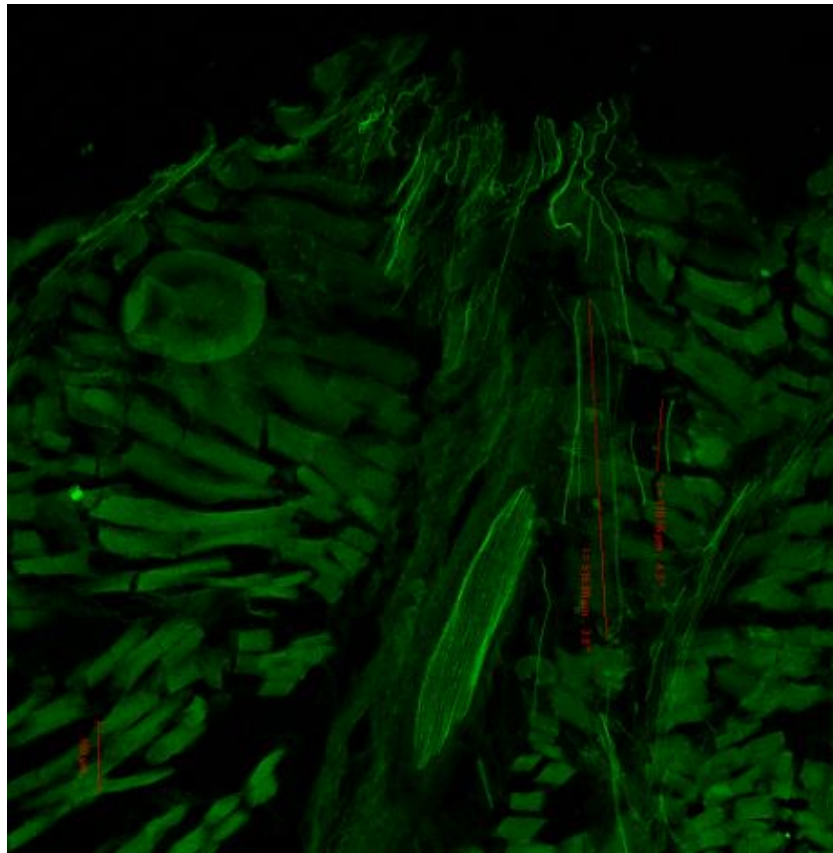


Barra = 100 μm e objetiva com aumento de 40x.
Fonte: elaborada pelo autor.

4.2.3 *Músculo constritor superior da faringe*

A análise das lâminas relativa ao músculo constritor superior da faringe evidenciou um padrão bastante inervado. Foram visualizadas várias terminações nervosas livres alongadas e finas partindo do tecido conjuntivo em direção à mucosa e à camada muscular, que mediam em comprimento entre 110 e 516 μm (FIGURA 33).

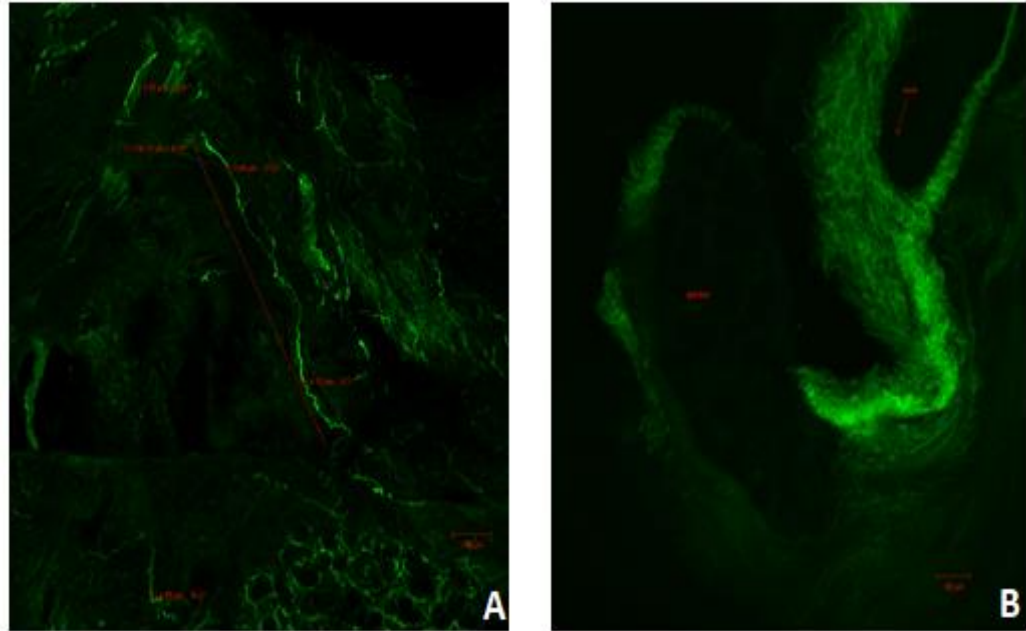
Figura 33 – Terminações nervosas livres alongadas e finas partindo do tecido conjuntivo em direção à mucosa e camada muscular



Barra = 100 μm e objetiva com aumento de 10x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Observaram-se terminações nervosas livres e complexas mantendo íntima relação com glândulas seromucosas (FIGURA 34).

Figura 34 – Terminações nervosas livres em proximidade a glândulas seromucosas (A). Formação nervosa complexa não classificável ao redor da glândula (B)

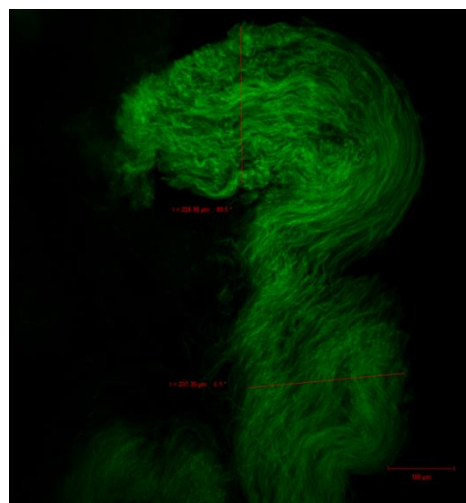


Barra = 100 μm e aumento de 20x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Barra = 100 μm e aumento de 10x.

Nas camadas mais profundas da lâmina própria, foram identificados feixes nervosos calibrosos, medindo mais de 200 μm de espessura (FIGURA 35).

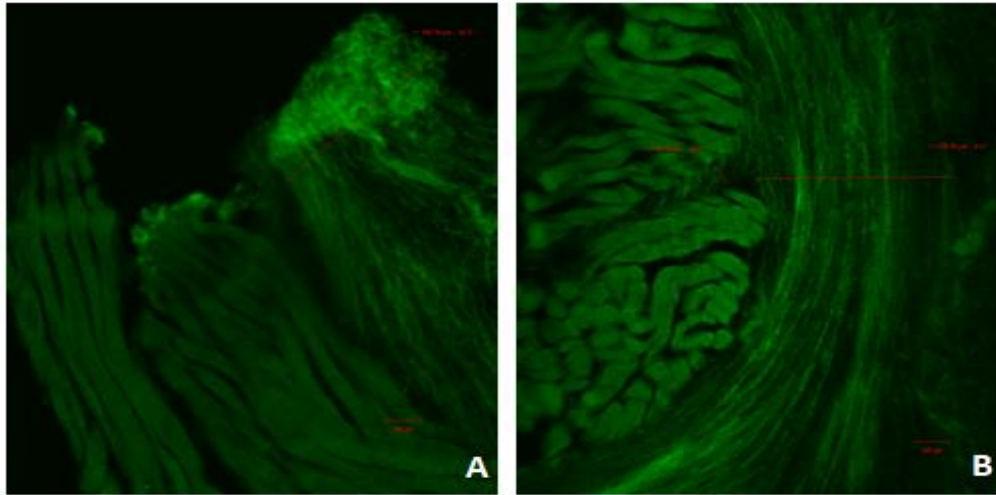
Figura 35 – Feixe nervoso



Barra = 100 μm e objetiva com aumento de 20x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Foram também observados fascículos nervosos medindo mais de 500 μ m, que tendiam a se ramificar entre as fibras musculares, com redução progressiva de seu calibre (FIGURA 36).

Figura 36 – Fascículo nervoso (grupo de feixes nervosos) (A). Fibra nervosa deixando o fascículo em direção às fibras musculares (B)



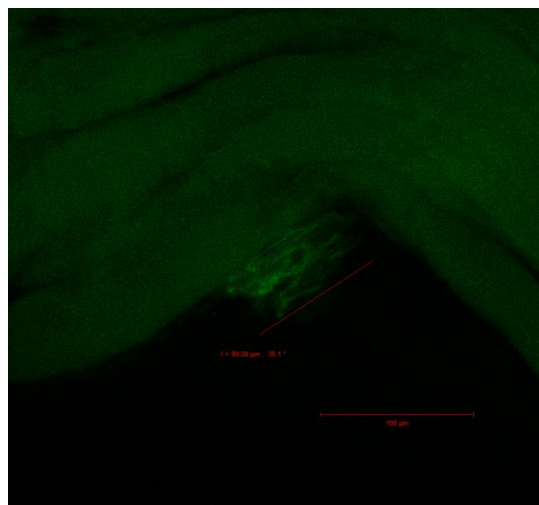
Barra = 100 μ m e aumento de 10x.

Barra = 100 μ m e aumento de 10x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Dentre as terminações nervosas complexas, observaram-se na camada muscular formações *Ruffini-like*, de 90 μ m em seu maior diâmetro, envolvidas por fibras musculares (FIGURA 37).

Figura 37 – Formação nervosa complexa *Ruffini-like* envolvida por fibras musculares

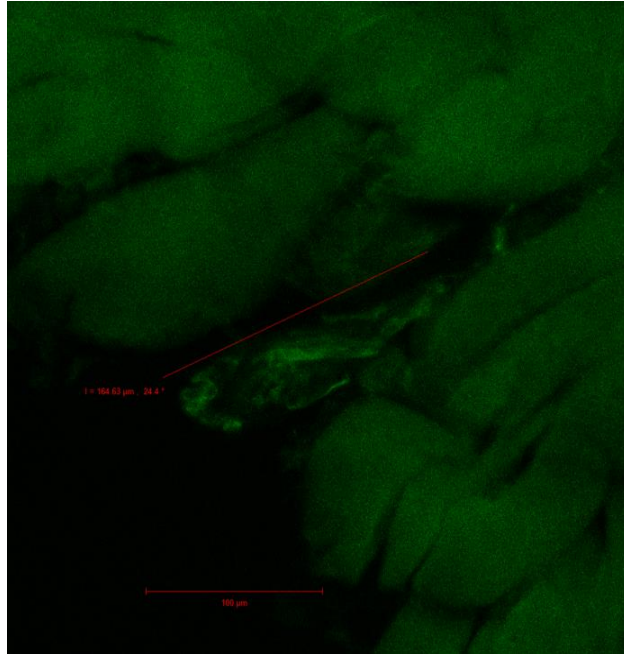


Barra = 100 μ m e objetiva com aumento de 40x.

Fonte: elaborada pelo autor

Identificaram-se, também, na camada muscular, formações ovais, de 164 μ m em seu maior diâmetro (FIGURA 38).

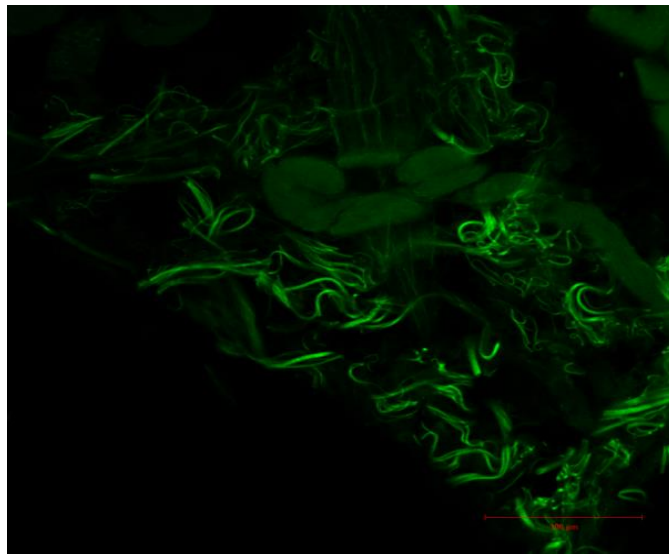
Figura 38 – Formação nervosa complexa oval



Barra = 100 μ m e objetiva com aumento de 40x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Ainda na camada muscular, foram encontradas formações não classificáveis (FIGURA 39).

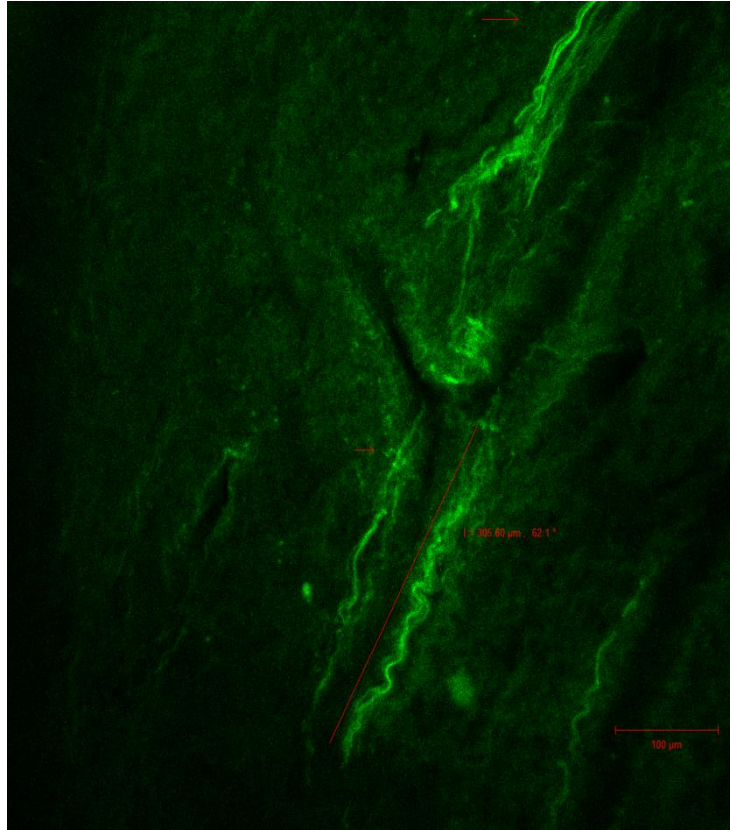
Figura 39 – Formação nervosa complexa não classificável



Barra = 100 μ m e objetiva com aumento de 20x.
Fonte: elaborada pelo autor.

Foram visualizadas formações espiroideas (*spiral-wharves*), que mediam em comprimento até 305 μ m, com intensa ramificação (Figura 40).

Figura 40 – *Spiral-wharves*



Barra = 100 μ m e objetiva com aumento de 20x.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os diversos tipos de terminações nervosas encontradas nas amostras relativas aos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe podem ser visualizadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição das terminações nervosas entre os músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe

TERMINAÇÕES NERVOSAS	PALATOGLOSSO	PALATOFARÍNCEO	MÚSCULO CONSTRITOR SUPERIOR DA FARINGE
Terminações Nervosas Livres	X	X	X
Formação Ruffini-like	X	X	X
Formação Golgi-like	X	X	
Formação Meissner-like	X		
Formação complexa oval			X
Spiral-wharves	X		X
Formação Network	X	X	
Formação complexa não classificável			X
Feixes Nervosos	X	X	X
Fascículos Nervosos			X
Fusos Musculares	X		

Fonte: elaborada pelo autor.

4.3 Densidade nervosa dos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe

Os resultados foram expressos de acordo com o percentual de área imunomarcada pelo anticorpo PGP 9.5 das fibras nervosas conforme Figura 41. A média da densidade das fibras nervosas aferida foi 0,06% no músculo palatoglosso, 0,12% no músculo palatofaríngeo e 0,21% no músculo constritor superior da faringe. Quando foram comparadas as médias da densidade das fibras nervosas das amostras selecionadas, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da densidade das fibras nervosas na região de palatoglosso quando comparada ao grupo do músculo constritor superior da faringe (TABELA 3).

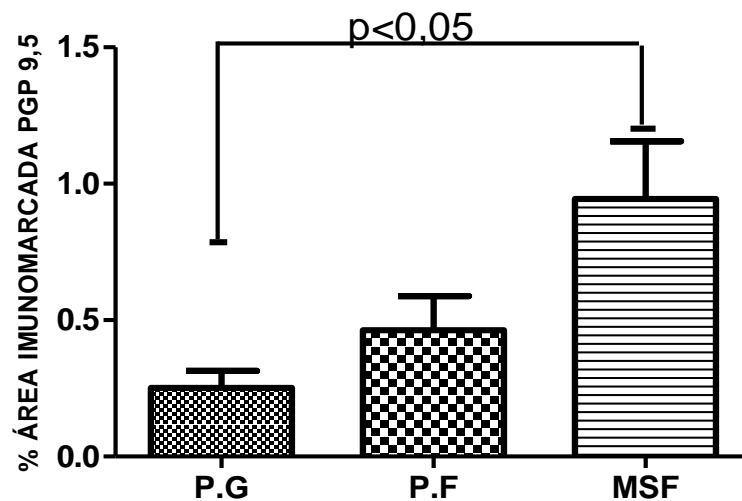
Tabela 3 – Média da densidade das fibras nervosas dos músculos constritor superior da faringe, palatoglosso e palatofaríngeo, expressas em termos percentuais

MCSF	Palatoglosso	Palatofaríngeo
0,21(0,54±1,32)	0,06(0,09±0,54)*	0,12 (0,16±1,25)

Os dados representam média±EPM (erro padrão de média) e foram analisados por meio do teste de Kruskal–Wallis (dados não paramétricos) e pós-teste de Dunn's, onde * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo MCSF.

MCSF= Músculo Constritor Superior da Faringe

Figura 41 – Porcentagem da área imunomarcada nas fibras nervosas dos músculos constritor superior da faringe, palatoglosso e palatofaríngeo



Os dados representam média±EPM (erro padrão de média) da área imunomarcada, analisados por meio do teste de Kruskal–Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's.

PG = Palatoglosso; PF = Palatofaríngeo; MSF = Músculo Constritor Superior da Faringe.

5 DISCUSSÃO

A regulação neuronal coordenada dos músculos da faringe é fundamental para o controle adequado do tamanho e da resistência das vias aéreas superiores. O mecanismo fisiopatológico para o colapso das vias aéreas superiores em pacientes com Apneia Obstrutiva do Sono (AOS) ainda não está completamente elucidado. Vários trabalhos evidenciaram a ocorrência de neuropatia faríngea em pacientes portadores de AOS. Sob esse viés, o presente estudo procura investigar a inervação sensorial microscópica proprioceptiva da faringe humana em um grupo controle com função sensorial normal presumida, com ênfase nos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe, com o fito de que possa ser utilizado como referência para futuros estudos envolvendo a patogênese neurológica da AOS.

Nessa perspectiva, duas teorias têm sido propostas para explicar a fisiopatologia da AOS: a teoria obstrutiva, que postula que a hipertrofia muscular ocasiona um estreitamento da via aérea superior, e a teoria neurogênica, a qual postula que a degeneração nervosa periférica decorrente do trauma do estiramento dos tecidos faríngeos ou de doenças sistêmicas ocasiona atrofia muscular e colapso (SABOISKY *et al.*, 2012; TSAI *et al.*, 2013). Em pacientes com AOS, há alterações na sensibilidade, propriedades musculares e tônus neural da via aérea superior.

A atividade funcional dos músculos faríngeos que compõem a parede lateral da orofaringe, representada pelos músculos palatoglosso e palatofaríngeo, e a parede posterior, composta pelo músculo constritor superior da faringe, é de vital importância para a manutenção da estabilidade e patência da via aérea superior durante a inspiração. Dentre as variáveis identificadas na condição fisiopatológica da apneia, destaca-se a habilidade desses músculos de responder a alterações respiratórias, como hipoxemia e hipercapnia, e locais (pressão negativa) e a capacidade de trabalhar de forma conjunta altamente coordenada para proteger a via aérea superior do colapso (JORDAN *et al.*, 2007). Nesse contexto, buscou-se estabelecer padrões histomorfométricos das terminações nervosas presentes na faringe que fossem representativas de um estado de normalidade histológica.

Os principais estudos de inervação sensorial proprioceptiva da faringe focaram no músculo constritor superior da faringe em virtude do importante papel proprioceptivo desse músculo para a fisiologia da via aérea superior, incluindo a fala, deglutição e respiração (CARLOS *et al.*, 2013; ARIAS GARCIA *et al.*, 2012). O músculo palatoglosso também apresenta relevância proprioceptiva, já que foram encontrados fusos musculares em estudos

prévios com coloração de Gomori (LISS *et al.*, 1990). Muitos estudos demonstraram alterações histológicas do músculo palatofaríngeo em pacientes com AOS (VUONO *et al.*, 2007; FRIBERG *et al.*, 1998; EDSTRÖM *et al.*, 1992; LINDMAN *et al.*, 2002), mas há uma escassez na literatura abordando inervação proprioceptiva. Não obstante, as novas técnicas cirúrgicas para o tratamento de AOS (faringoplastia lateral e faringoplastia expansora) atuam sobre os músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe.

A AOS é uma condição muito prevalente na população, com diversas repercussões clínicas, sendo considerada uma doença de saúde pública. A triagem dos pacientes com ausência de AOS para o grupo controle foi baseada na aplicação de questionários ambulatoriais e no exame de Tonometria Arterial Periférica (TAP). O questionário STOP-BANG foi aplicado por ser considerado ideal para triagem de AOS, especialmente por sua grande sensibilidade e pelo alto valor preditivo negativo (ONG TH *et al.*, 2010). O questionário de Berlim também foi utilizado como questionário de triagem. Chung *et al.* (2008) realizaram um estudo para predizer o risco de AOS e validar o questionário de Berlim como uma ferramenta de triagem. Assim, eles concluíram que a maior parte dos diagnosticados (80%) tinha alto risco para AOS e que o instrumento em estudo serve para diagnóstico. Todavia, ele pode ser complementado com questionários associados a dados da história dos pacientes, a fim de uma diagnóstico completo. Apesar de a polissonografia ser considerada o exame padrão ouro para o diagnóstico de AOS, optou-se pelo exame de TAP para este propósito, por se tratar de um dispositivo portátil de fácil manuseio e maior comodidade para o paciente, já que dispensa a sua realização em um laboratório de sono, cujos resultados são prontamente disponibilizados e interpretados. Há vários estudos de validação da TAP como método diagnóstico de AOS. Schnell *et al.* (1999) relataram uma alta correlação entre os valores de IAH na polissonografia laboratorial e da TAP ($r=0,92$, $p < 0,0001$). Já Pang *et al.* (2007) encontraram uma boa correlação do IAH ($r = 0,9288$, $p < 0,0001$) e da saturação mínima de oxigênio ($r = 0,9891$, $p < 0,0001$) entre a polissonografia e o monitor portátil que avalia a TAP. Outros autores também encontraram alta correlação entre os valores de IAH da TAP e da polissonografia laboratorial (BAR *et al.*, 2003; AYAS *et al.*, 2003; BRESLER *et al.*, 2008; CHOI *et al.*, 2010; HEDNER *et al.*, 2011). A grande diferença entre esse monitor portátil e os demais existentes é que a identificação dos eventos respiratórios, tais como apneia e hipopneia, é realizada por meio de variação do sinal do tônus arterial periférico, sem necessidade de medidas convencionais de fluxo aéreo e esforço respiratório (HEDNER *et al.*, 2004).

Dentre os 23 indivíduos de ambos os sexos avaliados durante a triagem inicial, 16 foram do sexo feminino. Considerando a elevada prevalência de AOS em homens, houve uma limitação na inclusão de indivíduos do sexo masculino, sem apneia, neste grupo controle. Extenso estudo realizado na comunidade por Young *et al.*, em 1993, demonstrou prevalência de AOS de 9% em mulheres e 24% em homens, usando como critério o Índice de Apneia e Hipopneia (IAH) > 5, em indivíduos de 30 a 60 anos. Houve ainda uma proporção de homens para mulheres de 3:1. O grupo avaliado no estudo de inervação sensorial proprioceptiva da faringe em cadáveres, nos trabalhos de Carlos *et al.* (2013) e Arias Garcia *et al.* (2012), constava de sete indivíduos, sendo quatro do sexo masculino no primeiro estudo e cinco no segundo estudo. Não foi evidenciada distinção morfológica das formações nervosas entre os sexos.

Em um período de sete meses, destinado à coleta das peças, constituiu-se 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 Neuronais
07 indivíduos	Carlos <i>et al.</i> , 2013	The sensory innervation of the human pharynx: searching for mechanoreceptors	NSE PGP 9.5 RT-97 S-100
07 indivíduos	Arias Garcia; Cristina, 2012	Inervación propioceptiva de la faringe	S-100 PGP 9.5 Enolase neuronal específica
03 indivíduos	Leite <i>et al.</i> , 2016	Morphology of nerve endings in vocal fold of human newborn	PGP 9.5
06 indivíduos	Peixoto <i>et al.</i> , 2017	Histomorfometria das terminações nervosas das conchas nasais inferiores de humanos por imunofluorescência e microscopia confocal a laser	PGP 9.5

Fonte: elaborada pelo autor.

Foi necessária uma criteriosa triagem dos pacientes da pesquisa, com a exclusão de 17 pacientes da amostra inicial, para que as variáveis e os vieses fossem controlados, permitindo, desse modo, que o grupo controle do presente trabalho pudesse ser utilizado como uma relevante referência para ulteriores estudos englobando pacientes portadores de AOS. Em um estudo dos efeitos neurogênicos do músculo palatofaríngeo em pacientes com AOS, o grupo controle incluía sete indivíduos do sexo masculino e era baseado apenas na história clínica de roncos ou outros sintomas sugestivos de AOS, sem a realização de exames complementares de maior acurácia diagnóstica (EDSTRÖM *et al.*, 1992). O trabalho de Carlos *et al.* (2015) acerca da inervação sensorial da faringe em pacientes com AOS também não incluiu esses exames complementares na metodologia para elaboração do grupo controle. Por outro lado, um estudo histológico do músculo palatofaríngeo em crianças com ronco e AOS (VUONO *et al.*, 2007) utilizou critérios polissonográficos para dividir os pacientes em três grupos: grupo I (exame normal), grupo II (ronco primário) e grupo III (AOS). Outro estudo que buscou avaliar a relação entre as alterações estruturais do músculo palatofaríngeo e AOS também utilizou a polissonografia no grupo controle de 17 pacientes com tonsilite crônica para descartar AOS (SHI *et al.*, 2013).

A avaliação da faringe através da coloração com hematoxilina-eosina demonstrou que as diversas camadas não haviam sofrido alterações histológicas importantes, garantindo a integridade dos tecidos analisados. Não foi constatada a presença de processos inflamatórios nas amostras estudadas, assegurando-se, assim, que a inflamação crônica das tonsilas não interferiu na análise das terminações nervosas sensitivas dos tecidos analisados. Outros trabalhos também tiveram a preocupação de estudar a histologia com hematoxilina-eosina para verificar a integridade da amostra (LEITE *et al.*, 2016; PEIXOTO *et al.*, 2017). Em um estudo histológico do músculo palatofaríngeo que buscava avaliar a hipótese de progressão da doença em pacientes roncadores, foram obtidas biópsias de 21 pacientes com ronco habitual e AOS e 10 indivíduos não roncadores do grupo controle. Neste, foram visualizadas, através da coloração com hematoxilina-eosina, variações ligeiramente maiores no tamanho das fibras, com ocorrência de fibras atróficas arredondadas, um aumento na incidência de núcleos localizados centralmente e coloração irregular das fibras (FRIBERG *et al.*, 1998). No presente estudo, observaram-se fibras musculares desconectadas, mas que mantinham um padrão regular de coloração com hematoxilina-eosina.

Para esse estudo, foi selecionado o anticorpo primário marcador pan-axonal antiproduto gênico proteico PGP 9.5 em virtude de sua característica de ser um marcador neural mais geral, não restrito a subpopulações de células nervosas, resultando em uma visão

mais ampla da inervação do tecido analisado, verificado 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). O fluoróforo Alexia Fúor 488 foi conjugado ao PGP 9.5.

O uso da imunofluorescência para avaliar estruturas nervosas e suas terminações foi inicialmente proposto em modelo experimental com ligamentos do punho (JEW *et al.*, 2003), sendo aplicado posteriormente no ligamento dorsal radiocarpal (TOMITA *et al.*, 2007), na articulação interfalangeana proximal (CHIKENJI *et al.*, 2010) e na articulação interfalangeana distal (CHIKENJI *et al.*, 2011). A maior vantagem desse método é a possibilidade de ser utilizada a microscopia confocal com varredura a laser (MCL). Na microscopia convencional, é necessário o uso de cortes finos, haja vista que cortes mais espessos, maiores que três a cinco micrômetros, após a magnificação, produzem imagens ruins com menor contraste e resolução, em virtude da dissipação da luz por regiões não focadas, resultando em imagens que correspondem a planos de foco combinados.

A microscopia confocal a laser possui a propriedade de focar a imagem adquirida com grande resolução e mínima perda do contraste no plano desejado, possibilitando a análise detalhada de estruturas nervosas em sua quase totalidade, sendo, pois, o método ideal para descrever e quantificar receptores sensitivos. No presente trabalho, a técnica de imunofluorescência foi a mesma utilizada por Jew e colaboradores (2003), diferenciando-se pela diluição do anticorpo primário, que foi alterada de 1:400 para 1:200, já que essa concentração se mostrou mais adequada para a marcação das estruturas nervosas de interesse. A metodologia proposta se mostrou eficiente para avaliar com detalhes a morfologia das terminações nervosas da faringe.

Consistentemente, os músculos faríngeos foram considerados livres de fusos musculares (KUEHN *et al.*, 1990; LISS, 1990). No presente estudo, não foram encontradas evidências morfológicas e imuno-histoquímicas para a presença de fusos musculares nos músculos palatofaríngeo e constritor superior da faringe, corroborando a análise de Carlos *et al.* (2013) e Arias Garcia *et al.* (2012), que focaram principalmente no músculo constritor superior da faringe. Entretanto, foram visualizados fusos musculares no músculo palatoglosso, o que está de acordo com dados da literatura (BOSSY; VIDIC, 1967; SENGUPTA; SENGUPTA, 1978). Isso poderia ser explicado pela procedência controversa do músculo palatoglosso, considerado por vários autores como um músculo extrínseco da língua (MOORE; DALLEY; AGUR, 2011; WILLIAMS, 1995), e não como um músculo da faringe. Lazarov (2007) afirma que o nervo trigêmeo é responsável pela inervação sensorial

proprioceptiva em todos os músculos cefálicos. Como a faringe não tem inervação do nervo trigêmeo, foi considerada a possibilidade de existir um sistema proprioceptivo atípico capaz de substituir os fusos musculares nessa função.

Na presente pesquisa, foram identificadas terminações nervosas complexas nos três músculos estudados, incluindo formações tipo Meissner, no músculo palatoglosso; tipo Golgi, nos músculos palatoglosso e palatofaríngeo; e tipo Ruffini, nos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e músculo constritor superior da faringe. Com base apenas em sua morfologia, essas estruturas nervosas sensoriais podem ser identificadas como mecanorreceptores, entretanto não podem ser assimiladas funcionalmente àquelas presentes em outras localizações do corpo, especialmente na pele. Carlos *et al.* (2013) analisaram amostras da faringe humana utilizando os marcadores como anticorpo contra PGP 9.5, anticorpo contra enolase neuronal específica, anticorpo contra neurofilamento 200kDa e anticorpo contra proteína S100. Foram visualizadas diferentes formas de receptores sensitivos nas paredes da faringe, incluindo formações corpusculares complexas tipo Pacini, tipo Ruffini e tipo Meissner. Em trabalho semelhante de Arias Garcia *et al.* (2012), observaram-se, na camada muscular da faringe humana, diferentes morfotipos de formações nervosas sensitivas, com muitos casos tipo Ruffini. 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; VILLAVERDE *et al.*, 1994; LEITE *et al.*, 2016).

No presente estudo, foram encontradas longas estruturas nervosas que corriam paralelas às fibras musculares dos músculos palatoglosso e constritor superior da faringe e podem corresponder à estrutura nervosa *spiral-wharves*. Pela sua disposição, é possível hipotetizar que essas formações nervosas são passíveis de encurtamento ou alongamento, dependendo das atividades dos músculos da faringe, para desencadear reflexos que adaptam o tônus da musculatura faríngea a uma situação específica. Carlos *et al.* (2013) também descreveram um tipo especial de estrutura nervosa com formato em *spiral-wharves*, paralela às fibras musculares do músculo constritor superior da faringe, que eram longas, formadas por axônios recobertos por células de Schwann e isoladas por uma cápsula. Esses axônios eram imunorreativos ao anticorpo contra neurofilamento 200kDa, indicando sua origem em neurônios mecanossensitivos e proprioceptivos (LAWSON; WADDELL, 1991). Formações nervosas espiroideas imunorreativas à enolase neuronal específica também foram descritas por Arias Garcia (2012). Leite *et al.* (2016) também observaram longos feixes nervosos entrelaçados, que corriam paralelamente aos feixes musculares, entre os tecidos cartilagosos da laringe de recém-nascidos, semelhantes à formação tipo *spiral-wharves*.

Além disso, foram evidenciadas terminações nervosas livres em todas as camadas histológicas das amostras estudadas do presente trabalho, sendo a formação nervosa mais prevalente do estudo. Os aspectos histomorfométricos das terminações nervosas livres identificadas são muito semelhantes às características descritas nas publicações de Carlos *et al.* (2013) e Leite *et al.* (2016). Ruoppolo *et al.* (2014) analisaram amostras da epiglote e prega vestibular de adultos corados com PGP 9.5 e foram visualizadas terminações nervosas livres no epitélio das regiões avaliadas. O estudo também evidenciou que a densidade das fibras nervosas era maior na prega vestibular que na epiglote.

Outrossim, os achados do presente trabalho indicam uma estreita relação entre as terminações nervosas livres e glândulas seromucosas presentes na lâmina própria e com os vasos sanguíneos, refletindo o importante papel da neuromodulação nos fenômenos de secreção glandular e controle vasomotor. Também foram visualizados feixes nervosos, fascículos e terminações nervosas tipo *network*. A grande variedade e complexidade das formações nervosas encontradas na presente pesquisa podem ser explicadas pela metodologia aplicada e pelo fato de o estudo ter englobado, também, os músculos palatoglosso e palatofaríngeo, enquanto os principais trabalhos que abordaram inervação sensorial proprioceptiva da faringe (CARLOS *et al.*, 2013; ARIAS GARCIA, 2012) focaram especificamente no músculo constritor superior da faringe.

A média da densidade das fibras nervosas do músculo constritor superior da faringe foi maior que no músculo palatofaríngeo, o qual, por sua vez, foi superior à média do músculo palatoglosso. A média da densidade nervosa se mostrou quase três vezes maior no músculo constritor superior da faringe que no músculo palatoglosso, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Isso poderia ser justificado pela relevância fisiológica do músculo constritor superior da faringe, que forma a parte principal da parede lateral e posterior da faringe e está intimamente associado ao movimento normal das vias aéreas superiores durante a fala, a deglutição e a respiração. Os dados percentuais relativos à densidade nervosa desses músculos no grupo controle poderão ser utilizados como referência em pesquisas posteriores envolvendo indivíduos com AOS. Carlos *et al.* (2015) determinaram a densidade das fibras nervosas da parede lateral da faringe (submucosa e camada muscular) de indivíduos do grupo controle e com AOS através da avaliação da área imunorreativa para S100P, NSE, ASIC2 e TRPV4 e constataram uma redução significativa da densidade das fibras nervosas da submucosa e da camada muscular de indivíduos com AOS quando comparados ao grupo controle. Ruoppolo *et al.* (2014) avaliaram a densidade de terminações nervosas aferentes na mucosa da epiglote e da prega vestibular de adultos humanos por

microscopia imunoeletrônica utilizando técnicas de imuno-histoquímica coradas pelo PGP 9.5. Com o intuito de avaliar a densidade nervosa da lâmina própria de pregas vocais de recém-nascidos, Leite *et al.* (2016), que também seguiram o método de imunofluorescência com anticorpo primário PGP 9.5, avaliaram as estruturas de interesse através da sua cor e calcularam a densidade em termos percentuais, definida pelo quociente entre a área ocupada pela estrutura de interesse e a área total do campo estudado.

Dessa maneira, a metodologia aplicada no presente estudo se mostrou bastante eficaz na determinação da porcentagem da área imunomarcada das fibras nervosas pelo PGP 9.5 nos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe. Todos os resultados desse trabalho demonstram que os músculos faríngeos estudados são dotados de diferentes tipos de mecanorreceptores, que presumivelmente trabalham como proprioceptores e participam do controle neuronal da via aérea superior.

A tonsilectomia das palatinas é uma das mais tradicionais cirurgias realizadas, indicadas, por exemplo, para o tratamento de AOS em crianças, tonsilite recorrente, abscessos peritonsilares de repetição e tonsilite crônica caseosa. A técnica de dissecação extracapsular é atualmente a mais difundida, na qual é realizada a incisão de acesso à loja tonsilar no bordo marginal mediano do pilar amigdaliano anterior, em toda a sua extensão. Como foram visualizados fusos musculares, importantes proprioceptores, no músculo palatoglosso do presente estudo, parece razoável inferir a hipótese de que tratamentos cirúrgicos mais conservadores, com a preservação do pilar amigdaliano anterior, poderia talvez resultar em maior preservação dessas formações nervosas, com menor impacto da função proprioceptiva.

O estudo apresenta, entretanto, algumas limitações que precisam ser esclarecidas para ulteriores trabalhos envolvendo o tema. A pesquisa foi realizada *in vivo* para assegurar a ausência de AOS e sensibilidade faríngea normal, o que não seria possível em cadáveres, limitando, dessa forma, a realização de dissecações mais extensas. Além disso, o número de amostras avaliadas foi limitado, com amplo predomínio de mulheres, e apenas um anticorpo neuronal foi utilizado. Portanto, torna-se necessário um estudo mais abrangente, com mais indivíduos e maior homogeneidade entre os sexos, além de uma maior variedade de anticorpos neuronais e materiais de diferentes regiões da faringe, claramente identificadas e bem dissecadas. Outrossim, a detecção imuno-histoquímica de mecanoproteínas nos músculos faríngeos em futuros estudos poderia ampliar os conhecimentos vigentes das bases moleculares envolvidas na mecanotransdução.

O estudo da inervação sensorial proprioceptiva da faringe humana pode ajudar a prever os pacientes com risco de ter maior gravidade da AOS, influenciando o prognóstico

da doença, ou ainda ajudar na melhor compreensão da fisiopatogenia e, conseqüentemente, no desenvolvimento de terapias farmacológicas ou na seleção de pacientes que se beneficiariam de neuroestimulação. Existem pacientes que respondem, de forma diferenciada, à determinada modalidade terapêutica, sendo postulada uma influência dos mecanorreceptores para justificar essa diferente responsividade. O estudo descritivo das terminações nervosas da faringe em pacientes com AOS poderia ainda contribuir significativamente para a seleção do tratamento considerado ideal para cada indivíduo, evitando a realização de procedimentos desnecessários e aumentando a chance de sucesso terapêutico.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou detalhadamente as diferentes morfologias das terminações nervosas da faringe em humanos.

Foram visualizados fusos musculares no músculo palatoglosso e terminações nervosas livres e complexas nos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe.

Foram identificadas formações nervosas tipo Meissner, no músculo palatoglosso; tipo Golgi, nos músculos palatoglosso e palatofaríngeo; e tipo Ruffini, nos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe. Foram encontradas longas estruturas nervosas que corriam paralelamente às fibras musculares dos músculos palatoglosso e constritor superior da faringe, que podem corresponder à estrutura nervosa *spiral-wharves*. Foram evidenciadas terminações nervosas livres em todas as camadas histológicas dos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e constritor superior da faringe, sendo a formação nervosa mais prevalente do estudo.

Foi possível avaliar a integridade das estruturas anatômicas microscópicas da orofaringe através da coloração com hematoxilina-eosina.

A média da densidade das fibras nervosas do músculo constritor superior da faringe foi maior que no músculo palatofaríngeo, que, por sua vez, foi superior à média do músculo palatoglosso. A média da densidade nervosa se mostrou quase três vezes maior no músculo constritor superior da faringe que no músculo palatoglosso, sendo essa diferença estatisticamente significativa.

O uso da 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 da faringe de humanos.

REFERÊNCIAS

- AHMED, Z. *et al.* Actin-binding proteins Coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 55, n. 7, p. 687–700, mar. 2007.
- ARIAS GARCIA, C. 2012. 43f. **Inervación propioceptiva de la faringe**. Dissertação (Mestrado em Ortodontia e Ortopedia Facial Facial) – Universidade de Oviedo, Asturias, 2012.
- AYAS, N. T., *et al.* Assessment of a wrist-worn device in the detection of obstructive sleep apnea. **Sleep Med**, v. 4, n. 4, p. 435-442, set. 2003.
- BAR, A. *et al.* Evaluation of a portable device based on peripheral arterial tone for unattended home sleep studies. **Chest**, v. 123, n. 3, p. 695-703, mar. 2003.
- BARBÉ, F. *et al.* Automobile accidents in patients with sleep apnea syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 158, n. 1, p. 18-22, jul. 1998.
- BARONE, D. **The Watch-Pat in the sleep laboratory**. Itamar Medical Ltda., 2005.
- BOSSY, J.; VIDIC, B. Does proprioceptive innervation of the muscles of the pharynx exist in man?. **Arch Anat Histol Embryol**, v. 50, n. 5, p. 273–284, 1967.
- BOYD, J. H. *et al.* Upper airway muscle inflammation and denervation changes in obstructive sleep apnea. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 170, n. 5, p. 541–546, set. 2004.
- BRESLER, M. *et al.* Differentiating between light and deep sleep stages using an ambulatory device based on peripheral arterial tonometry. **Physiol Meas**, v. 29, n. 5, p. 571-84, mai. 2008.
- BRODERICK, M.; GUILLEMINAULT, C. Neurological aspects of obstructive sleep apnea. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1142, p. 44-57, out. 2008.
- CARLOS, F. *et al.* The sensory innervation of the human pharynx: searching for mechanoreceptors. **The anatomical record**, v. 296, n. 11, p. 1735-1746, nov. 2013.
- CHIKENJI, Takako. *et al.* Distribution of nerve endings in human distal interphalangeal joint and surrounding structures. **The Journal of Hand Surgery**, v. 35, n. 8, p. 1286–1293, ago. 2010.
- CHOI, J. H. *et al.* Validation study of portable device for the diagnosis of obstructive sleep apnea according to the new AASM scoring criteria: watch- PAT 100. **Acta Otolaryngol**, v. 130, n. 7, p. 838-43, jul. 2010.
- Chung, F. *et al.* Validation of the Berlin questionnaire and American Society of Anesthesiologists checklist as screening tools for obstructive sleep apnea in surgical patients. **Anesthesiology**, v. 108, n. 5, p. 822-830, 2008.

CHUNG, F. *et al.* High STOP-Bang score indicates a high probability of obstructive sleep apnoea. **Br J Anaesth**, v. 8, n. 5, p. 768-775, mai. 2012.

DE CARLOS, F. *et al.* Reduced innervation in the human pharynx in patients with obstructive sleep apnea. **Histology and Histopathology**, v. 30, n. 8, p. 865-874, jul. 2015.

DEJAEGER, E. *et al.* Mechanisms involved in post deglutition retention in the elderly. **Dysphagia**, v. 12, n. 2, p. 63–67, Primavera 1997.

DEWEESE, E. L.; SULLIVAN, T. Y. Effects of upper airway anesthesia on pharyngeal patency during sleep. **J Appl Physiol**, v. 64, n. 4, p. 1346–1353, abr. 1988.

DUARTE, R.L.M *et al.* Validação do questionário STOP-Bang para a identificação de apneia obstrutiva do sono em adultos no Brasil. **J Bras Pneumol**, v. 43, n. 6, p. 456-63, 2017.

DUVVURI, U.; MYERS, J. N. Contemporary management of oropharyngeal cancer: anatomy and physiology of the oropharynx. **Curr Probl Surg**, v. 46, n. 2, p. 119–184, fev. 2009.

ECKERT, D. J.; MALHORTA, A. Pathophysiology of adult obstructive sleep apnea. **Proc AM Thorac Soc**, v. 5, n. 2, p. 144-153, fev. 2008.

EDSTRÖM, H.; LARSSON, L.; LARSSON, H. Neurogenic effects of the palatopharyngeal muscle in patients with obstructive sleep apnea: a muscle biopsy study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 55, n. 10. P. 916-920, out. 1992.

EDWARDS, B. A.; WHITE, D. P. Control of the pharyngeal musculature during wakefulness and sleep: implications in normal controls and sleep apnea. **Head & neck**, v. 33, n. 1, p. 37-45, out. 2011.

FRIBERG, D. *et al.* Histological indications of a progressive snorers disease in a upper airway muscle. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 157, n. 2, p. 586-593, fev. 1998.

FRITZELL, B. The velopharyngeal muscles in speech. An electromyographic and cineradiographic study. **Acta Otolaryngol**, v. 5, 1969. Supplement 250.

GUILLEMINAULT, C. *et al.* Is obstructive sleep apnea syndrome a neurological disorder? A continuous positive airway pressure follow-up study. **Ann Neurol**, v. 58, n. 6, p. 880–887, dez. 2005.

GUILLEMINAULT, C.; RAMAR, K. Neurologic aspects of sleep apnea: is obstructive sleep apnea a neurologic disorder?. **Semin Neurol**, v. 29, n. 4, p. 68–71, set. 2009.

HAMANN, W. Mammalian cutaneous mechanoreceptors. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 64, n. 1, p. 81-104, 1995.

HEDNER, J. *et al.* A novel adaptive wrist actigraphy algorithm for sleep-wake assessment in sleep apnea patients. **Sleep**, v. 27, n. 8, p. 1560-1566, dez. 2004.

HEDNER, J. *et al.* Sleep staging based on autonomic signals: a multi-center validation study. **J Clin Sleep Med**, v. 7, n. 3, p. 301-306, jun. 2011.

HILLIGES, Marita. *et al.* Protein gene product 9.5-immunoreactive nerves and cells in human oral mucosa. **The Anatomical Record**, v. 245, n. 4, p. 621-632, ago. 1996.

JEW, J. Y. *et al.* Fluorescence immunohistochemistry and confocal scanning laser microscopy: a protocol for studies of joint innervation. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 74, n. 6, p. 689-696, dez. 2003.

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, jun. 2000.

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, jan. 1997.

JORDAN, A. S. *et al.* Mechanisms used to restore ventilation after partial upper airway collapse during sleep in humans. **Thorax**, v. 62, n. 10, p. 861-867, out. 2007.

KIM, J. *et al.* Prevalence of sleep-disordered breathing in middle-aged Korean men and women. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 170, n. 10, p. 1108-13, set. 2004.

KUEHN, D. P.; TEMPLETON, P. J.; MAYNARD, J. A. Muscle spindles in the velopharyngeal musculature of humans. **J Speech Hear Res**, v. 33, n. 3, p. 488-493, set. 1990.

LAWSON, S. N.; WADDELL, P. J. Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. **J Physiol**, v. 435, p. 41-63, abr. 1991.

LAZAROV, N. E. Neurobiology of orofacial proprioception. **Brain Res Rew**, v. 56, n. 2, p. 362-383, set. 2007.

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

LINDMAN, R.; STAL, O. S. Abnormal palatopharyngeal muscle morphology in sleep-disordered breathing. **J Neurol Sci**, v. 195, n. 1, p.11-23, mar. 2002.

LISS, J. M. Muscle spindles in the human levator veli palatini and palatoglossus muscles. **Journal of Speech and Hearing Research**, v. 33, n. 4, p. 736-746, dez. 1990.

MADEIRA, M. C. **Anatomia da face**: bases anátomo-funcionais para a prática odontológica. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1997.

MARGARET, J.F; HERRING, S. W. **Anatomia ilustrada da cabeça e do pescoço**. São Paulo: Manole, 1998.

MARTINI, F. H. **Anatomia humana**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

- MILLER, A. J. Oral and pharyngeal reflexes in the mammalian nervous system: their diverse range in complexity and the pivotal role of the tongue. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n. 5, p. 409–425, 2002.
- MITSUI, Chihiro. *et al.* Immunohistochemical demonstration of nerve terminals in the whole hard palate of rats by use of an antiserum against Protein Gene Product 9.5. **Archives of Histology and Cytology**, v. 63, n. 5, p. 401-410, 2000.
- MOON, J. B. *et al.* Coordination of velopharyngeal muscle activity during positioning of the soft palate. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 31, n. 1, p.45–55, jan. 1994.
- MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R. **Anatomia orientada para a clínica**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- MORGENTHALER, T. I. *et al.* Practice parameters for the medical therapy of obstructive sleep apnea. **Sleep**, v. 29, n.8, p. 1031-1035, ago. 2006.
- MORTIMORE, I. L.; DOUGLAS, N. J. Palatal muscle EMG response to negative pressure in awake sleep apneic and control subjects. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 156, n. 3, p867–873, set. 1997.
- MU, L.; SANDERS, I. Neuromuscular specializations within human pharyngeal constrictor muscles. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 116, n. 8, p. 604–617, ago. 2007.
- NETZER, N. C. *et al.* Using the Berlin Questionnaire to identify patients at risk for the sleep apnea syndrome. **Ann Intern Med**, v. 131, n. 7, p. 485-491, out. 1999.
- ONG, T. H. *et al.* Simplifying STOP-BANG: use of a simple questionnaire to screen for OSA in an Asian population. **Sleep Breath**, v. 14, n. 4, p. 371-6, dez. 2010.
- PALOMBINI, L. O. 2010. Fisiopatologia dos distúrbios respiratórios do sono. **J Bras Pneumol**, v. 36, supl. 2, , p. 4-9, 2010.
- PANDI-PERUMAL, S. R. *et al.* Sleep disorders, sleepiness and traffic safety: a public health menace. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 7, p.863-871, jul. 2006.
- PANG, K. P.; GOURIN, C. G.; TERRIS, D. J. A comparison of polysomnography and the WatchPAT in the diagnosis of obstructive sleep apnea. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 137, n. 4, p. 665-668, out. 2007.
- PEIXOTO, M. E. B. **Histomorfometria das terminações nervosas das conchas nasais inferiores de humanos por imunofluorescência e microscopia confocal a laser**. 2016. 64f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- PINTO, J. A. *et al.* Accuracy of peripheral arterial tonometry in the diagnosis of obstructive sleep apnea. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 81, n. 5, p. 473-478, set./out. 2015.
- RAMIERI, G. *et al.* Non-innervated Merkel cells and Merkel - neurite complexes in human oral mucosa revealed using antiserum to protein gene product 9.5. **Archives of Oral Biology**, v. 37, n. 4, p. 263-269, abr. 1992.

- ROSA, C.; NETO, K. Palatoglossus muscle neuroanatomy - a review. **Journal of Morphological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 123–124, jan. 2012.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histology**: a text and atlas with correlated cell and molecular biology. Baltimore: Lippincott Williams e Wilkins, 2011.
- RUOPPOLO, Giovanni. *et al.* Afferent nerve ending density in the human laryngeal mucosa: potential implications on endoscopic evaluation of laryngeal sensitivity. **Dysphagia**, v. 30, n. 2, p. 1-6, dez. 2014.
- SABOISKY, J. P. *et al.* Neurogenic changes in the upper airway of obstructive sleep apnea patients. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 185, n. 4, p. 322–329, abr. 2015.
- SABOISKY, J. P. *et al.* Functional role of neural injury in obstructive sleep apnea. **Front Neurol**, v. 3, n. 95, jun. 2012.
- SAKAE, F. A. Anatomia da boca e faringe. In: CALDAS NETO, S. *et al.* (edit.). **Tratado de otorrinolaringologia**. Volume I. 2ed. São Paulo: Roca, 2011. p. 705-709.
- SATEIA, M. J. International classification of sleep disorders-third edition: highlights and modifications. **Chest**, v. 146, n. 5, p. 1387-1394, nov. 2014.
- SCHNALL, R. P. *et al.* Periodic, pro- found peripheral vasoconstriction - a new marker of obstructive sleep apnea. **Sleep**, v. 22, n. 7, p. 939-946, nov. 1999.
- SCHWARTZ, A. R. Hypoglossal nerve stimulation-optimizing its therapeutic potential in obstructive sleep apnea. **J Neurol Sci**, v. 346, n. 1-2, p. 1-3, nov. 2014.
- SCOTT, D. **Small Animal Dermatology**. 6 ed. China: Saunders, 2000.
- SENGUPTA, B. N.; SENGUPTA, S. Muscle spindles in the inferior constrictor pharyngis muscle of the crab-eating monkey (*Macaca irus*). **Acta Anat (Basel)**, v. 100, n. 1, p. 132–135, 1978.
- SETO, H. Sensibility of the digestive organs (Chaper 8). In: **Studies on the sensory innervation (Human sensibility)**. Tokyo: Igaku Shoin Ltd., 1963. p 104–217.
- SHARMA, S. K. *et al.* Validation of the Berlin Questionnaire to identify patients at risk for obstructive sleep apnea syndrome. **Indian J Med Res**, v. 124, n. 3, p.281-290, 2006.
- SHI, S. *et al.* The relationship between structural/MHC changes in upper airway palatopharyngeal muscle morphology and obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 271, n. 1, p. 109-116, jan. 2014.
- SHIMOKAWA, T. *et al.* An anatomical study of the levator veli palatini and superior constrictor with special reference to their nerve supply. **Surg Radiol Anat**, v. 26, n. 2, p. 100–105, out. 2004.
- SHIMOKAWA, T.; YI, S.; TANAKA, S. Nerve supply to the soft palate muscles with special reference to the distribution of the lesser palatine nerve. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 42, n. 5,

p.495– 500, set. 2005.

SUMIDA, K.; YAMASHITA, K.; KITAMURA, S. Gross anatomical study of the human palatopharyngeus muscle throughout its entire course from origin to insertion. **Clin Anat**, v. 25, n. 3, p. 314–323, abr. 2012.

TANGEL, D. J.; MEZZANOTTE, W. S.; WHITE, D. P. Respiratory-related control of palatoglossus and levator palatini muscle activity. **J Appl Physiol**, v. 78, n. 2, p. 680–688, fev. 1995.

TOMITA, Kazunari. *et al.* Distribution of nerve endings in the human dorsal radiocarpal ligament. **The Journal of Hand Surgery**, v. 32, n. 4, p. 466-473, abr. 2007.

TSAI, Y. J. *et al.* Peripheral neuropathology of the upper airway in obstructive sleep apnea syndrome. **Sleep Med Rev**, v. 17, n. 2, p.161-168, abr. 2013.

TUFIK, S. *et al.* Obstructive sleep apnea syndrome in the São Paulo epidemiologic sleep study. **Sleep Med**, v. 11, n. 5, p.441-446, mai. 2010.

VEASEY, S. C. *et al.* Medical therapy for obstructive sleep apnea: a review by the medical therapy for obstructive sleep apnea task force of the standards of practice committee of the american academy of sleep medicine. **Sleep**, v. 29, n. 8, p. 1036-1044, ago. 2006.

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

VUONO, I. M. *et al.* Histological analysis of palatopharyngeal muscle from children with snoring and obstructive sleep apnea syndrome. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 71, n. 2, p. 283-290, fev. 2007.

WIDDICOMBE, John. Airway receptors. **Respiration Physiology**, v. 125, n. 1, p. 3-15, mar. 2001.

WILLIAMS, P. L. **Gray anatomia**. 37ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

WORSNOP, C. *et al.* Activity of respiratory pump and upper airway muscles during sleep onset. **J Appl Physiol**, v. 85, n. 3, p. 908–920, set. 1998.

WU, M. *et al.* Effect of aging on cellular mechanotransduction. **Ageing Res Rev**, v. 10, n. 1, p. 1-15, nov. 2009.

YALAMANHALI, S. *et al.* Diagnosis of obstructive sleep apnea by peripheral arterial tonometry: meta-analysis. **JAMA Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 139, n. 12, p. 1343-1350, out. 2013.

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, nov. 1998.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Morphology of the nerve endings in laryngeal mucosa of the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 2, p. 150-158, mar. 2001.

YOSHIDA, Y. *et al.* Sensory innervation of the pharynx and larynx. **Am J Med**, v. 108, p. 51S– 61S, mar. 2000. Supplement 4a.

YOUNG, T. *et al.* The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. **N Engl J Med**, v. 328, n. 17, p. 1230-1235, abr. 1993.

APÊNDICES

APÊNDICE A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO - HUWC /
UFC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: HISTOMORFOMETRIA DAS TERMINAÇÕES NERVOSAS LIVRES E MECANORRECEPTORES DO MÚSCULO CONSTRITOR SUPERIOR DA FARINGE EM HUMANOS

Pesquisador: GUILHERME LEAL DANTAS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 54607516.7.0000.5045

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/HOSPITAL UNIVERSITARIO WALTER

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.545.613

Apresentação do Projeto:

Este é um projeto de pesquisa para Mestrado em cirurgia de Guilherme Leal Dantas, médico Otorrinolaringologista, com orientação da Dra. Maria Luzete Costa Cavalcante, professora da Unichristus e a participação de uma equipe composta por, Érika Ferreira Gomes (médica) e dois alunos de graduação (Pedro de Castro Neto e Matheus de Souza Santos). Referido projeto foi submetido ao CNPQ no Edital – MCT/CNPQ No 01/2016. O estudo busca compreender a fisiopatologia da síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) que é um distúrbio comum, caracterizado por colapsos recorrentes da região faríngea durante o sono, que resulta na redução do fluxo aéreo (apneia ou hipopneia). Está associada a diversos sintomas e comorbidades, que incluem sonolência excessiva diurna, problemas cognitivos, redução da qualidade de vida, elevação significativa do risco de acidentes laborais e de trânsito, sendo um fator independente de risco para doenças cardiovasculares. A inervação motora dos músculos da faringe humana, incluindo as variações regionais na densidade das inervações, é bem conectada, mas há uma escassez, na literatura, de trabalhos sobre a inervação sensorial. A regulação neuronal coordenada dos músculos das vias aéreas superiores é básica para o controle do tamanho e resistência das vias aéreas. O músculo constritor superior da faringe forma a parte principal da parede lateral e posterior da faringe, e tipicamente é desprovido dos fusos musculares, principal

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-370

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3388-8813

Fax: (85)3381-4861

E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO - HUWC /
UFC



Continuação do Protocolo: 1.045.013

tipo de proprioceptor. Como a propriocepção do músculo constritor superior da faringe é potencialmente importante

para a fisiologia das vias aéreas superiores, faz-se necessário um estudo mais abrangente da inervação sensorial da faringe. A análise morfológica dos receptores sensitivos do músculo constritor superior da faringe é de fundamental importância para o estudo de afecções da via aérea superior com hipótese de patogênese neurológica, como a apneia obstrutiva do sono. O objetivo principal da pesquisa é avaliar a morfologia e distribuição dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres do músculo constritor superior da faringe em 10 pacientes adultos com função sensorial presumivelmente normal, triados na durante a consulta pré-operatória de tonsilectomia, a partir da avaliação da sensibilidade faríngea, durante o exame físico, no ambulatório de otorrino do HUWC. Caso o paciente aceite, serão aplicados dois questionários e confirmada a ausência de SAOS através de exame de polissonografia. Caso aceite participar, será retirado um fragmento do músculo constritor superior da faringe (1-2 cm²), durante a remoção das amígdalas palatinas. O cronograma é de dois anos de estudo e o orçamento é de R\$ 47.022,00

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL: Avaliar a morfologia e distribuição dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres do músculo constritor superior da faringe em adultos com inervação sensorial presumivelmente normal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Descrever os diferentes mecanorreceptores do músculo constritor superior da faringe em adultos;
- Fazer a contagem das terminações nervosas livres em diferentes regiões do músculo constritor superior da faringe

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O autor assim descreve:

- Os riscos são mínimos inerentes ao procedimento cirúrgico de amigdalectomia, o mais comum seria um discreto sangramento. Não há benefício direto para o participante. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para a ciência. No caso, esperamos que o estudo da inervação do músculo da garganta possa ajudar a entender melhor a doença da apneia do sono.

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-370
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-6613 Fax: (85)3281-4961 E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO - HUWC /
UFC



Continuação do Parecer: 1.645.613

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa interessante para compreensão da morfologia e da distribuição dos mecanorreceptores e das terminações nervosas livres do músculo constritor superior da faringe, no entanto, carece de muita atenção e cuidado na abordagem dos participantes tendo em vista que, nenhum benefício poderá ser oferecido aos participante. A estes caberá apenas, os risco, mesmo que mínimos, e a satisfação de colaborar para o desenvolvimento das ciências.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador apresentou:

- folha de rosto
- projeto
- carta de anuência
- orçamento
- TCLE
- Carta de apresentação ao Comitê de Ética
- Currículo dos pesquisadores

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo atendido as pendências postas por este CEP, o projeto se encontra apto para ser iniciado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deverá apresentar a este CEP, relatório ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_676644.pdf	01/07/2016 12:20:13		Acelto
Outros	CV_Erika_Ferreira_Gomes.pdf	01/07/2016 12:16:06	GUILHERME LEAL DANTAS	Acelto
Outros	Instrumento_de_coleta_de_dados.docx	01/07/2016 12:13:29	GUILHERME LEAL DANTAS	Acelto
Outros	metodologia_novo.docx	01/07/2016 12:10:39	GUILHERME LEAL DANTAS	Acelto
Outros	declaracaopolissono_sergio.jpeg	01/07/2016 12:09:17	GUILHERME LEAL DANTAS	Acelto

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290

Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-370

UF: CE Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-6613 Fax: (85)3361-6961 E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO - HUWC /
UFC



Continuação do Parecer: 1.045/03

Outros	declaracao_medeiros.jpeg	01/07/2016 12:08:19	GUILHERME LEAL DANTAS	Aceito
Outros	carta_corrigida.jpeg	01/07/2016 12:07:38	GUILHERME LEAL DANTAS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	apresentacao_projeto_novo.doc	01/07/2016 12:06:54	GUILHERME LEAL DANTAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	03_TCLE_NOVO.doc	01/07/2016 12:06:31	GUILHERME LEAL DANTAS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Guilherme_Leal.PDF	16/03/2016 09:28:16	GUILHERME LEAL DANTAS	Aceito
Cronograma	08_CRONOGRAMA.docx	10/03/2016 09:06:52	GUILHERME LEAL DANTAS	Aceito
Outros	07_Declaracao_concordancia.jpeg	10/03/2016 09:06:38	GUILHERME LEAL DANTAS	Aceito
Outros	06_CV_DraLuzete.pdf	10/03/2016 09:05:59	GUILHERME LEAL DANTAS	Aceito
Outros	06_CV_Guilherme.pdf	10/03/2016 09:05:41	GUILHERME LEAL DANTAS	Aceito
Outros	05_termo_ciencia_local_pesquisa.jpeg	10/03/2016 09:05:18	GUILHERME LEAL DANTAS	Aceito
Orçamento	04_orcamento.docx	10/03/2016 09:04:26	GUILHERME LEAL DANTAS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 22 de Julho de 2016

Assinado por:
Marta de Fátima de Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1250
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-370
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8613 Fax: (85)3281-6961 E-mail: cephuwo@huwc.ufc.br

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada: **Histomorfometria das terminações nervosas livres e mecanorreceptores do músculo constritor superior da faringe em humanos**, sob a responsabilidade dos pesquisadores **Guilherme Leal Dantas, Erika Ferreira Gomes e Maria Luzete Costa Cavalcante**.

Nesta pesquisa, nós estamos buscando entender como é e como funciona um músculo da garganta que fica próximo da amígdala.

Em relação à sua participação na pesquisa, você irá fazer um exame da garganta com uma palheta e responderá algumas perguntas simples sobre ronco, cansaço, pressão arterial. O seu pescoço será medido com uma fita, e iremos medir também o seu peso e altura. Essa etapa da pesquisa terá duração de cerca de 30 (trinta) minutos. Você poderá sentir vontade de vomitar durante o exame da garganta com a palheta e ficará totalmente à vontade para não responder alguma pergunta do questionário se ficar constrangido ou incomodado. Um dos objetivos da pesquisa é escolher pacientes que têm chance pequena de ter uma doença chamada **apneia do sono**, que é a diminuição ou parada da respiração durante o sono por causa do fechamento da garganta que pode acontecer enquanto você dorme. Antes da cirurgia, será necessário a realização de um exame em outro dia chamado polissonografia durante uma noite. O objetivo é confirmar que você não tem apneia do sono. A **polissonografia** é o exame usado para a investigação de várias doenças do sono. Você deve dormir com fios colados por adesivos sobre o corpo, que irão registrar as ondas cerebrais, respiração, batimentos cardíacos, ronco, esforço para respirar e a movimentação das pernas e olhos. Você poderá se movimentar normalmente durante o exame. O exame não dói. Não se usam agulhas ou instrumentos semelhantes. Você poderá sentir um pouco de desconforto com os fios ou ficar incomodado por não dormir na sua casa, atrapalhando assim o seu sono. Não haverá absolutamente nenhuma despesa referente à pesquisa, e você será devidamente compensado em relação a transporte, alimentação e dia não trabalhado. Se for necessário para fins de emprego, você receberá uma declaração ou atestado, de forma que você não será prejudicado. A cirurgia da amígdala que foi indicada pelo médico no ambulatório de otorrino será feita da forma que é realizada normalmente. Na hora da cirurgia, depois que tirar a amígdala, será retirado também um pedacinho do músculo que fica bem próximo, do tamanho da metade do seu dedo mínimo e da largura de um palito de fósforo. Isso não vai mudar em

nada o resultado da sua cirurgia. Esse material utilizado para a pesquisa será guardado com total segurança e examinado em outro dia através de um microscópio. O tempo necessário para tirar esse pedacinho do músculo é de um minuto e os riscos são mínimos, inerentes à cirurgia de retirada das amígdalas. O mais comum seria um discreto sangramento.

Não há benefício direto para você. A sua colaboração é para o desenvolvimento da ciência, o que lhe poderá ser útil ou não em algum momento da sua vida. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para a ciência. No caso, esperamos que o estudo do músculo da garganta possa ajudar a entender melhor a doença da apneia do sono.

Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo para seu tratamento nesse hospital, ou seja, se desejar não participar, sua cirurgia será realizada da mesma forma.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas.

Não há despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo. Você também não receberá para participar. Se precisar vir outra vez, você será compensado.

O material será guardado e se for necessário para outros estudos, entraremos em contato com você para autorização.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr ***Guilherme Leal Dantas***, que pode ser encontrado na Rua Eduardo Salgado, 411, apt 200, telefones: 30386092 (residencial) e 999913157 (celular).

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC – Rua Capitão Francisco Pedro 1290, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8589 – E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br”

Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se você concordar em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

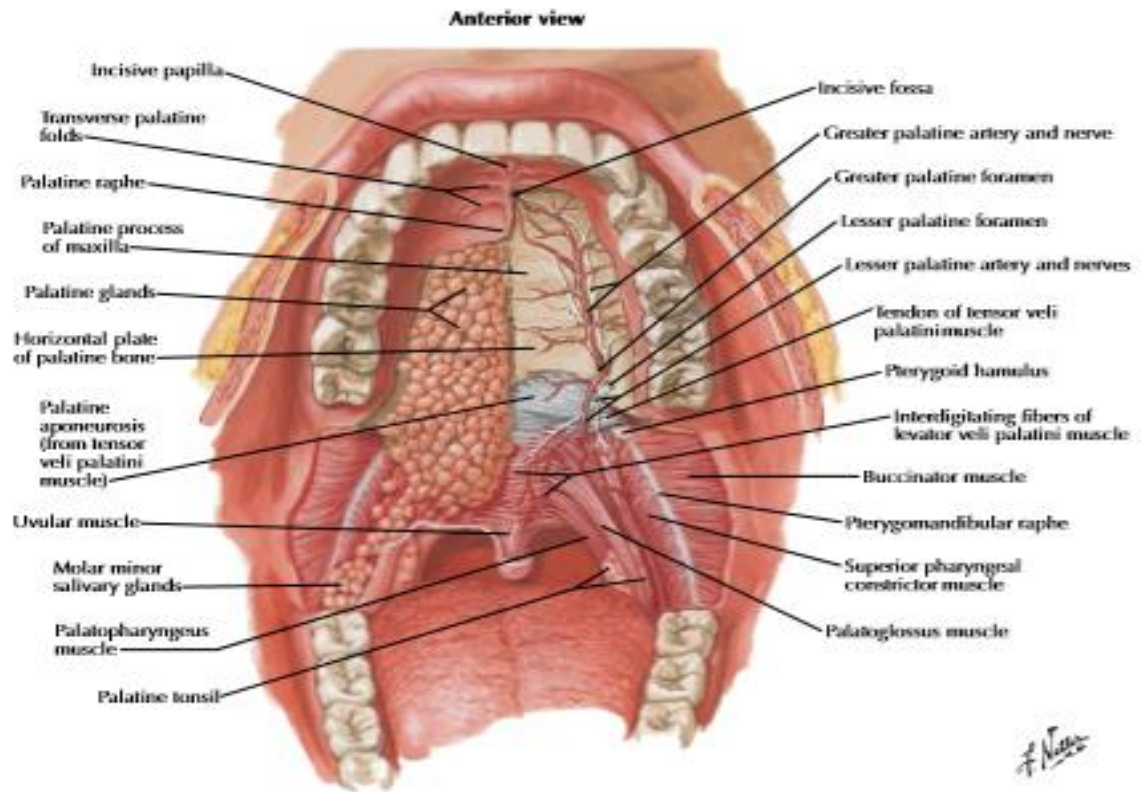
APÊNDICE C - DADOS GERAIS DOS INDIVÍDUOS

DADOS	Ind 1	Ind 2	Ind 3	Ind 4	Ind 5	Ind 6
Sexo	Fem	Fem	Masc	Fem	Fem	Fem
Idade	29 anos	22 anos	23 anos	29 anos	29 anos	35 anos
IAH	0	0	0,2/hora	2,1/hora	1,8/hora	0,2/hora

Ind, indivíduo; IAH, índice de apneia e hipopneia registrado em exame de tonometria arterial periférica com *Watch-PAT*

Fonte: elaborada pelo autor

ANEXOS
ANEXO A – ANATOMIA DA OROFARINGE



FONTE: Netter, Atlas de Cabeça e Pescoço, 2007

ANEXO B - QUESTIONÁRIO STOP-BANG

Questionário STOP-BANG

1. **Snore** – Ressona alto (audível através de porta fechada)?
 Sim Não
2. **Tired** – Durante o dia sente-se frequentemente cansado ou sonolento?
 Sim Não
3. **Observed** – Já alguém reparou que para de respirar durante o sono?
 Sim Não
4. **Pressure** – Tem ou é medicado para hipertensão arterial?
 Sim Não
5. **Body Mass Index** – Índice de massa corporal acima de 35?
 Sim Não
6. **Age** – Idade superior a 50 anos?
 Sim Não
7. **Neck** – Perímetro cervical superior a 40 cm?
 Sim Não
8. **Gender** – Sexo masculino?
 Sim Não

Questionário adaptado de: Chung F et al. *Anesthesiology* 2008; 108: 812-821, e Chung F et al *Br J Anaesth.* 2012; 108: 768-775.

ANEXO C - QUESTIONÁRIO DE BERLIM

Questionário de Berlim	
<p>Categoria 1</p> <p>1. Você ronca?</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Não sei</p> <p>2. Seu ronco é:</p> <p>Pouco mais alto que sua respiração?</p> <p>Tão mais alto que sua respiração?</p> <p>Mais alto do que falando?</p> <p>Muito alto que pode ser ouvido nos quartos próximos?</p> <p>3. Com que frequência você ronca?</p> <p>Praticamente todos os dias</p> <p>3-4 vezes por semana</p> <p>1-2 vezes por semana</p> <p>Nunca ou praticamente nunca</p> <p>4. O seu ronco incomoda alguém?</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p>5. Alguém notou que você para de respirar enquanto dorme?</p> <p>Praticamente todos os dias</p> <p>3-4 vezes por semana</p> <p>1-2 vezes por semana</p> <p>Nunca ou praticamente nunca</p>	<p>Categoria 2</p> <p>6. Quantas vezes você se sente cansado ou com fadiga depois de acordar?</p> <p>Praticamente todos os dias</p> <p>3-4 vezes por semana</p> <p>1-2 vezes por semana</p> <p>Nunca ou praticamente nunca</p> <p>7. Quando vc está acordado você se sente cansado, fadigado ou não sente bem?</p> <p>Praticamente todos os dias</p> <p>3-4 vezes por semana</p> <p>1-2 vezes por semana</p> <p>Nunca ou praticamente nunca</p> <p>8. Alguma vez você cochilou ou caiu no sono enquanto dirigia?</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p>Categoria 3</p> <p>9. Você tem pressão alta?</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Não sei</p> <p>IMC=</p>
<p>Pontuação das perguntas: Qualquer resposta circulada é considerada positiva.</p> <p>Pontuação das categorias: Categoria 1 é positiva com 2 ou mais respostas positivas para as questões 1-5; Categoria 2 é positiva com 2 ou mais respostas positivas para as questões 6-8; Categoria 3 é positiva se a resposta para a questão 9 é positiva ou o IMC > 30.</p> <p>Resultado final: 2 ou mais categorias positivas indicam alto risco para AOS.</p>	

Referência: Netzer NC, Stoohs RA, Netzer CM, Clark K, Strohi KP. Using the Berlin Questionnaire to identify patients at risk for the sleep apnea syndrome. *Ann Intern Med.* 1999 Oct 5;131(7):485-91.