

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Eric Kwame Karikari Darko

**COMPARAÇÃO DE CORTES TRANSVERSAIS DO NERVO MASSETÉRICO DE
CADÁVERES HUMANOS PROCESSADOS POR DUAS DIFERENTES TÉCNICAS
HISTOLÓGICAS**

Porto Alegre

2018

Eric Kwame Karikari Darko

**COMPARAÇÃO DE CORTES TRANSVERSAIS DO NERVO MASSETÉRICO DE
CADÁVERES HUMANOS PROCESSADOS POR DUAS DIFERENTES TÉCNICAS
HISTOLÓGICAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de habilitação: Morfologia

Orientadora: Profa. Dra. Taís Malysz

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Darko, Eric Kwame Karikari
COMPARAÇÃO DE CORTES TRANSVERSAIS DO NERVO
MASSETÉRICO DE CADÁVERES HUMANOS PROCESSADOS POR DUAS
DIFERENTES TÉCNICAS HISTOLÓGICAS / Eric Kwame Karikari
Darko. -- 2018.
41 f.
Orientadora: Taís Malysz.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. nervo massetérico. 2. fibra nervosa. 3.
anatomia. 4. histologia. 5. morfometria. I. Malysz,
Taís, orient. II. Título.

Eric Kwame Karikari Darko

**COMPARAÇÃO DE CORTES TRANSVERSAIS DO NERVO MASSETÉRICO DE
CADÁVERES HUMANOS PROCESSADOS POR DUAS DIFERENTES TÉCNICAS
HISTOLÓGICAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 06 de julho de 2018

BANCA EXAMINADORA

Dr. Henrique Zaquia Leão

Dra. Paula Rigon da Luz Soster

Dra. Taís Malysz

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela benção da vida e toda força para sempre lutar em frente e nunca desistir.

Agradeço aos meus pais por toda força, companheirismo e amor incondicional. Obrigado por toda dedicação aos meus estudos e por compreender minha ausência por muitos anos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me fornecer a oportunidade de vir estudar aqui, e possibilitar a realização desse trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Anatomia Humana da UFRGS pela colaboração e, principalmente, pela amizade. Obrigado por todos os momentos incríveis de ensinamentos.

À minha orientadora Professora Doutora Taís Malysz pelo enorme apoio, conhecimento transmitido e por me orientar de forma exemplar. Muito obrigado por me acolher e pela oportunidade incrível que foi tê-la como orientadora.

Ao Daniel Prato Schmidt por me guiar em inúmeros momentos difíceis e por toda a experiência enriquecedora na área. Sobretudo, muito obrigado por se tornar um verdadeiro irmão!

A todos os meus amigos e familiares que, de alguma forma, ajudaram-me a tornar esse trabalho possível. Muito obrigado!

RESUMO

Em cadáveres humanos o estudo histológico de nervos espinais e cranianos tem sido complementar à descrição do seu trajeto anatômico, norteando assim procedimentos cirúrgicos e de bloqueio. O objetivo deste trabalho foi descrever a localização anatômica do nervo massetérico e identificar qual técnica histológica mais indicada para analisar morfometricamente as fibras nervosas mielinizadas de cadáveres fixados pós-congelamento do acervo do Laboratório de Anatomia Humana da UFRGS. Foram utilizados 4 cadáveres caucasianos do gênero feminino com faces íntegras, totalizando 8 hemifaces estudadas. Dois cadáveres foram recém-retirados das cubas de formol e os outros dois já estavam em mesas de estudo há 1 ano e banhados com solução de preservação. O posicionamento do nervo massetérico e da artéria massetéica em relação ao tragus e ao arco zigomático foram registrados através do uso de um paquímetro digital. Em cada hemiface, após o registro de medidas foi coletado um segmento do nervo, antes da sua ramificação, o qual foi dividido em duas partes iguais. Cada parte foi utilizada para uma técnica específica: RA - inclusão em resina acrílica com coloração em Azul de Toluidina e PHE - inclusão em parafina com coloração em Hematoxilina-Eosina. Para análises histológicas e morfométricas, as imagens dos cortes transversais dos nervos do lado direito de dois cadáveres, sendo um da cuba de formol e um da mesa de estudo foram capturadas e digitalizadas com um microscópio Nikon Eclipse E-600 (Japan) acoplado a uma câmera de alta performance CCD. Para análise das imagens foi usado o Software ZEN 2.3 (Zeiss). Foram realizadas medidas da área de secção transversa do nervo e da densidade de fibras nervosas mielinizadas e mensuráveis. De acordo com os resultados o nervo esteve localizado na profundidade do músculo masseter a $32,3 \pm 2,6$ mm de distância do tragus e a $8,2 \pm 0,9$ mm de distância do arco zigomático. A artéria massetéica apresentou-se imediatamente posterior e inferior ao nervo em todos os cadáveres. Ambos estavam posicionados a $10,1 \pm 0,9$ mm da superfície. O cadáver oriundo da cuba apresentou a melhor preservação microscópica do nervo massetérico, quando comparado com o da mesa, e isso ficou melhor evidenciado pelo processamento histológico RA em relação ao PHE. Os axônios do nervo oriundo do cadáver da cuba, processado com a técnica RA, apresentaram-se com aspecto circular bem definido, as bainhas de mielina bem coradas e homogêneas em meio a tecido conjuntivo sem rupturas. Este mesmo nervo no processamento em PHE apresentou-se com retração axonal, má definição das fibras nervosas e com a presença de espaçamentos endoneurais. A área de secção transversa do nervo deste cadáver foi menor que a dos outros e ele também apresentou uma densidade maior de fibras nervosas mielinizadas e identificáveis. Em conclusão, o nervo massetérico esteve localizado a cerca de 3,2 cm anteriormente ao tragus, 0,8 cm inferiormente ao arco zigomático e a cerca de 1 cm de profundidade. A melhor técnica histológica para analisar morfometricamente as fibras nervosas mielinizadas de cadáveres fixados pós-congelamento do acervo do Laboratório de Anatomia Humana da UFRGS foi a RA. Adicionalmente, o corpo oriundo da cuba de formol mostrou ter melhor preservação estrutural do nervo massetérico em comparação com cadáver oriundo das mesas de estudo.

Palavras-chave: nervo massetérico, fibra nervosa, anatomia, histologia, morfometria.

ABSTRACT

The histological study of spinal and cranial nerves in human cadavers has been complementary to the description of its anatomical path, guiding surgical procedures. The objective of this work was to describe the anatomical location of the masseteric nerve and identify the most efficient histological technique for the morphometric analyses of the myelinated nerve fibers of post-freezing fixed cadavers from the Laboratory of Human Anatomy of UFRGS. Four caucasian female cadavers with intact faces were used, totaling 8 hemifaces studied. Two corpses were freshly removed from the formaldehyde vats and the other two were already on study tables for 1 year and bathed with preservation solution. The positioning of the masseteric nerve and the masseteric artery in relation to the tragus and the zygomatic arch were measured by using a digital caliper. In each hemiface, a nerve segment was collected after measurement immediately before its branching, and was divided into two equal parts. Each part was used for a specific technique: RA - inclusion in acrylic resin with Toluidine Blue staining and PHE - inclusion in paraffin with Hematoxylin-Eosin staining. For the histological and morphometric analyses, the images of the cross-sectional sections of the nerve segments on the right side of two cadavers, one from the formaldehyde vat and one from the study table, were captured and digitized with a Nikon Eclipse E-600 (Japan) microscope coupled to a High performance CCD camera. The software ZEN 2.3 (Zeiss) was used to analyze the images. The cross-sectional area of the nerve and the density of the measurable myelinated nerve fibers were measured. According to the results, the nerve was located at the depth of the masseter muscle at 32.3 ± 2.6 mm from the tragus and at 8.2 ± 0.9 mm from the zygomatic arch. The masseteric artery was immediately posterior and inferior to the nerve in all corpses. Both were positioned at 10.1 ± 0.9 mm from the surface. The cadaver from the vat presented the best microscopic preservation of the masseteric nerve when compared to the nerves of the cadaver from the laboratory table. This was further brought to evidence by the RA histological processing in relation to the PHE. The axons of the nerve from the cadaver of the vat processed with the RA technique presented well-defined circular appearance, well-stained and homogeneous myelin sheaths in the middle of connective tissue without ruptures. This same nerve in the PHE processing presented with axonal retraction, poor definition of nerve fibers and with the presence of endoneurial spaces. The cross-sectional area of the nerve from the vat was smaller than that of the others and presented a higher density for myelinated and identifiable nerve fibers. In conclusion, the masseteric nerve was located about 3.2 cm anterior to the tragus, 0.8 cm inferior to the zygomatic arch and about 1 cm deep. The best histological technique for the morphometric analyses of the myelinated nerve fibers of the fixed post-freezing cadavers from the Laboratory of Human Anatomy of UFRGS was RA. Additionally, the cadaver from the formaldehyde vat showed to have better preservation of the masseteric nerve in comparison with cadaver from the study tables.

Keywords: masseteric nerve, nerve fiber, anatomy, histology, morphometry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** A - Vista lateral esquerda de um cadáver feminino com a hemiface esquerda dissecada, evidenciando a região de interesse anteriormente ao tragus (T) e inferiormente ao arco zigomático (AZ). B – Região dissecada em maior aumento evidenciando a incisura da mandíbula (IM) e acima dela o nervo massetérico (#) e a artéria massetérica (*)23
- Figura 2:** Imagens da área de secção transversal do nervo massetérico dos cadáveres Cdir e Mdir em aumento 10X.....24
- Figura 3:** Imagens da área de secção transversa do nervo massetérico dos cadáveres Cdir e Mdir em aumento 100X26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Os dados de análise morfométrica de cortes histológicos transversais do nervo massetérico direito de 2 cadáveres humanos, Cdir oriundo da cuba de formol e Mdir oriundo da mesa de estudo e processados por duas diferentes técnicas histológicas RA:Resina/Azul de Toluidina; PHE: Parafina/Hematoxilina-Eosina.....	25
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO COMPREENSIVA.....	10
1.1	JUSTIFICATIVA.....	16
1.2	OBJETIVOS.....	17
1.2.1	Objetivo geral.....	17
1.2.2	Objetivos específicos.....	17
2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	18
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34
	ANEXO - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA JOURNAL OF MORPHOLOGICAL SCIENCES	37

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

O sistema nervoso pode ser didaticamente organizado em sistema nervoso periférico (SNP), formado pelos nervos e gânglios e sistema nervoso central (SNC), formado pelo encéfalo e pela medula espinal (YOUNG et al., 2007; KIERSZENBAUM & TRES, 2008). De acordo com o critério funcional, o sistema nervoso somático representa a parte do sistema nervoso que possui uma parte aferente que transmite impulsos dos receptores periféricos ao SNC para interpretação, e a parte eferente que leva impulsos do SNC ao músculo esquelético. O sistema nervoso visceral leva impulsos dos receptores das vísceras ao SNC e impulsos de volta do SNC aos receptores das vísceras como nos músculos liso e cardíaco e nas glândulas exócrinas (MACHADO, 2006; DRAKE et al., 2010).

Os nervos do SNP incluem nervos espinais (31 pares), que estão conectados com a medula espinal e nervos cranianos (12 pares), que estão conectados com o encéfalo. Os nervos podem ser puramente sensitivos, puramente motores ou mistos. Os nervos sensitivos e motores possuem neurônios sensitivos (somáticos e viscerais) cujo corpo celular encontra-se dentro de um gânglio sensitivo, localizado fora do SNC. Os nervos motores possuem axônios de neurônios eferentes somáticos cujos corpos celulares estão localizados no SNC. Existem nervos motores que apresentam componentes neuronais viscerais e são formados por axônios de neurônios pré-ganglionares, cujos corpos são encontrados no SNC e também podem ter axônios de neurônios pós-ganglionares, cujos corpos celulares estão dentro de gânglios motores viscerais no SNP. Os nervos mistos apresentam componentes sensitivos e motores (STEVENS & LOWE, 1995; ELLIS, 2006; STANDRING, 2010; DRAKE et al., 2010).

Os nervos espinais são nervos que se conectam com a medula espinal e inervam os membros, o tronco e algumas partes da cabeça (MACHADO, 2006). Há 31 pares de nervos espinais. Eles têm uma distribuição segmentar e saem do canal vertebral entre os pedículos das vértebras adjacentes, atravessando os forames intervertebrais. De acordo com Dângelo e Fattini (2002) os nervos espinais são os cervicais (C1 a C8), torácicos (T1 a T12), lombares (L1 a L5), sacrais (S1 a S5) e coccígeo (Co1). Cada nervo se liga à medula espinal por raízes posteriores e anteriores. As raízes posteriores são aferentes e enviam impulsos nervosos para o SNC (SNELL, 2010). As raízes anteriores, são eferentes e seus corpos celulares situam-se na substância cinzenta da medula espinal (DÂNGELO & FATTINI, 2002). O nervo espinal (misto) ramifica-se em ramo anterior e posterior após atravessar o forame intervertebral. O ramo posterior inerva os músculos e também conduz informações sensitivas do dorso, e o

ramo anterior inerva os músculos e também conduz informações sensitivas advindas dos membros e parede anterolateral do tronco (DRAKE et al., 2010; SNELL, 2010).

Os nervos cranianos estão associados ao encéfalo e, a maior parte faz conexão com o tronco encefálico, exceção os nervos óptico e olfatório que se associam ao diencéfalo e telencéfalo (MACHADO, 2006). Os 12 pares de nervos cranianos saem do encéfalo e atravessam os forames do crânio recebendo números romanos para sua identificação, na ordem de cranial para caudal (I a XII). Existem nervos cranianos que são funcionalmente mistos (V - trigêmio, VII - facial, IX - glossofaríngeo, X - vago), enquanto outros nervos cranianos têm funções exclusivamente sensoriais (I – olfatório, II - óptico, VIII - vestibulococlear) ou motores (III - oculomotor, IV - troclear, VI - abducente, XI - acessório, XII - hipoglosso) (SNELL, 2010; STANDRING, 2010). Os nervos I e II têm conexões com o cérebro, enquanto os outros 10 pares de nervos cranianos (III ao XII) têm conexão com núcleos localizados no tronco encefálico (MOORE et al., 2014).

O nervo periférico é constituído basicamente por fibras nervosas e tecido conjuntivo. O epineuro, perineuro e endoneuro formam o tecido conjuntivo que envolve o nervo periférico, os fascículos de fibras nervosas e as fibras nervosas, respectivamente, e cuja função é organizar e proteger a fibra nervosa (STEVENS & LOWE, 1995; FLORES et al., 2000). O epineuro é a parte do tecido conjuntivo denso fibroso (YOUNG et al., 2007) que circunda o nervo e envia septos para seu interior, conduzindo vasos sanguíneos e linfáticos para seu suprimento vascular (MACHADO, 2006). Isso é importante porque para o endoneuro realizar troca de substratos de metabolização e produtos de degradação com a corrente sanguínea, ele depende dos vasos sanguíneos da bainha epineural que penetram no endoneuro (ROSS & WOJCIECH, 2011). O perineuro é a parte que envolve os feixes (fascículos) de fibras nervosas (MACHADO, 2006) e é formado por camadas de células perineurais achatadas e justapostas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Ele vai da zona da transição do SNC até a periferia, onde termina de maneira aberta nas junções neuromusculares e terminações não encapsuladas (STANDRING, 2010). Sua função é regular a pressão intrafascicular e o meio osmótico dentro do endoneuro, e também funcionar como protetor do nervo contra agentes infecciosos (FLORES et al., 2000). As células do perineuro possuem junções oclusivas que são fundamentais na formação da barreira hematoneural, que regula difusão de metabólitos entre o neurônio e corrente sanguínea (ROSS & WOJCIECH, 2011). O endoneuro é a parte delicada e frouxa do tecido conjuntivo que envolve cada fibra nervosa (MACHADO, 2006; YOUNG et al., 2007; SNELL, 2010). É formado predominantemente por fibras reticulares sintetizadas pelas células de Schwann que envolvem

os axônios dentro da bainha perineural (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; STANDRING, 2010).

As células de Schwann formam tanto a bainha de mielina (BEAR, 2002), dos axônios motores e sensitivos (MACHADO, 2006). Nas fibras mielínicas, cada célula de Schwann forma um pequeno cilindro pelo qual passa o axônio (STANDRING, 2010). Ao longo desta fibra, ocorrem interrupções da bainha em alguns pontos chamados nódulos de Ranvier, e a porção do axônio envolta por uma célula de Schwann, entre dois nódulos de Ranvier, é chamada internodo (FLORES et al., 2000; YOUNG et al., 2007). As células de Schwann maduras mielinizantes diferem-se das células de Schwann maduras não mielinizantes por possuir em várias proteínas de mielina (STANDRING, 2010). A bainha de mielina é um isolamento lipídico que reveste axônios para protegê-los e aumentar a velocidade de condução do impulso. Assim sendo, quanto maior a bainha de mielina mais rápido a transmissão do impulso ao longo axônio (PURVES et al., 2008; MOORE et al., 2014). A mielina serve como isolante elétrico, assim a carga permanece no citosol durante a transmissão ao longo do axônio até chegar ao nódulo de Ranvier, onde despolariza a membrana desta região, provocando a abertura de canais de sódio dependentes de voltagem no nódulo. O influxo de íons de sódio renova o potencial de ação a ser propagado ao longo do próximo internodo (BOLSOVER et al., 2004). Essa geração de potencial de ação nódulo a nódulo é chamada condução saltatória (EROSCHENKO, 2008).

Os axônios amielínicos podem ter diâmetros geralmente entre 1 μm a 2 μm (STANDRING, 2010), onde um conjunto de cerca de 10-15 axônios estão circundados por superposição de células de Schwann (MACHADO, 2006). Vários axônios podem ser envolvidos por uma única célula de Schwann (FLORES et al., 2000). Nos axônios amielínicos, não ocorre a presença de nódulos de Ranvier, uma vez que uma bainha contínua é formada pelas células de Schwann (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Assim, a condução de impulsos não depende dos canais de sódio que se situam nos nódulos de Ranvier. Sua propagação depende do fluxo através de canais iônicos presentes ao longo de todo o axônio para a região ativa da membrana (MORELL & QUARLES, 1999). A condução de impulsos desses axônios é comparativamente lenta, em relação aos axônios mielinizados (STANDRING, 2010).

O nervo trigêmeo (V) é o principal nervo sensitivo da face e possui um componente motor que inerva os músculos da mastigação. Os corpos dos neurônios deste nervo estão no núcleo motor, localizado na ponte, no núcleo sensitivo que se localiza ao longo do tronco

encefálico, e na porção cervical da medula espinal. Também existem corpos de neurônios sensitivos deste nervo localizados no gânglio trigeminal.

Três núcleos constituem o núcleo sensitivo do trigêmeo. O núcleo mesencefálico situa-se no tegmento da ponte, onde as fibras propioceptivas são recebidas e informações sobre a propriocepção dos músculos de mastigação são fornecidas (SGARBI et al., 2009; STANDRING, 2010). O núcleo sensitivo principal situa-se na profundidade do tegmento na parte média da ponte, e é responsável pela integração tátil do nervo trigêmeo (SGARBI et al., 2009). O núcleo trigeminal espinal recebe impulsos de dor e temperatura pela medula cervical superior (VAN EIJDEN & LANGENBACH, 2017). As fibras sensitivas da raiz do trigêmeo dividem-se de maneira que 50% formam em ramos ascendentes e descendentes enquanto os outros 50% entram na parte posterior da ponte. Os ramos ascendentes terminam no núcleo sensitivo principal e os ramos descendentes no núcleo espinal (SNELL, 2010; STANDRING, 2010)

O nervo oftálmico (NC V1), o nervo maxilar (NC V2) e a parte sensitiva do nervo mandibular (NC V3) são as três divisões do gânglio trigeminal sensitivo (DRAKE et al., 2010; ESTEVES et al., 2009). A inervação promovida por eles é parecida aos dermatômos da inervação cutânea por nervos espinais, com a única diferença sendo nenhuma ou pequena superposição dessas três divisões trigeminais, pois cada uma inerva uma área específica (MOORE et al., 2014). Quanto à organização somatotópica das três divisões do trato, as fibras sensoriais da divisão oftálmica trigeminal terminam na área inferior do núcleo espinal, as fibras da divisão maxilar terminam centralmente no núcleo espinal, enquanto as fibras da divisão mandibular terminam na área superior do núcleo espinal (SNELL, 2010). No entanto, sua distribuição sofre algumas alterações em caso de severa neuralgia do nervo trigêmeo (STANDRING, 2010).

O núcleo espinal é composto por três subnúcleos: o subnúcleo oral, que se une ao núcleo sensitivo principal e os subnúcleos interpolar e o subnúcleo caudal, representando a parte mais inferior, que se continua com a coluna cinzenta posterior da medula espinal. Os neurônios do subnúcleo caudal podem ser ativados por estímulos nociceptivos aplicados fora do próprio campo receptor. É um local importante onde pode ocorrer retransmissão de estímulos nociceptivos. O subnúcleo oral também possui função nociceptiva (STANDRING, 2010).

A integração de todas as informações sensoriais aferentes do trigêmeo ocorre no tálamo antes de serem enviadas ao córtex (VAN EIJDEN & LANGENBACH, 2017). A maior parte das fibras que originam-se nos núcleos sensitivos do trigêmeo sobe no lemnisco medial,

após atravessar a linha mediana, e termina no tálamo contralateral, núcleo ventral pósteromedial, onde os neurônios de terceira ordem são projetados para áreas 1, 2 e 3 do giro pós-central do córtex (STANDRING, 2010; SNELL, 2010). As fibras do subnúcleo caudal do núcleo espinal trigeminal, principalmente das lâminas I, V e VI, são projetadas para os núcleos ântero superiores do trigêmio, cerebelo, substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo, área parabraquial da ponte, formação reticular do tronco encefálico e medula espinal (STANDRING, 2010).

O núcleo motor do nervo trigêmeo possui uma forma ovoide. Ele localiza-se medialmente ao núcleo sensitivo que se encontra no centro da ponte (STANDRING, 2010; EIJDEN & LANGENBACH, 2017). No plano coronal, ele emerge onde a raiz do nervo trigêmeo deixa a ponte e termina caudalmente, entre a ponte e o bulbo (KOSTAKIS et al., 2008). Apresenta neurônios multipolares de grandes tamanhos, cercados por células multipolares de menor tamanho (STANDRING, 2010). Os seus neurônios são maiores do que os neurônios do núcleo sensorial principal e do núcleo reticular pontino, permitindo, assim, a diferenciação dos neurônios motores do trigêmeo (KOSTAKIS et al., 2008).

As fibras dos tratos corticobulbares terminam em neurônios motores ou em interneurônios dos núcleos motores dos nervos trigêmeos. Os seus axônios inervam os músculos da mastigação (VAN EIJDEN & LANGENBACH, 2017). Por essa razão, danos aos neurônios motores do trigêmeo podem resultar em paralisia dos músculos de mastigação (BYRNE & DAFNY, 2014).

O nervo mandibular (NC V3) é o maior nervo da divisão do trigêmeo. Contém tanto fibras sensoriais como motoras e sai do crânio pelo forame oval (STANDRING, 2010; DRAKE et al., 2010; SNELL, 2010). Após descer pelo forame oval, o nervo mandibular passa entre os músculos tensor do véu palatino e pterigoideo lateral, dando origem a um ramo meníngeo (supre a dura-máter) e ao nervo para o músculo pterigoideo medial (também supre os músculos tensor do véu palatino e o tensor do tímpano). O nervo mandibular divide-se então em tronco anterior e um tronco posterior. O tronco anterior apresenta um ramo bucal (sensitivo para a bochecha) e ramos para os músculos da mastigação denominados nervo massetérico, nervo temporal profundo e nervo pterigoideo lateral. O tronco posterior (maior) origina três ramos sensoriais principais (nervo auriculotemporal, nervo lingual e alveolar inferior) e fibras motoras para suprir o músculo milo-hióideo e o ventre anterior do músculo digástrico (STANDRING, 2010; DRAKE et al., 2010; VAN EIJDEN & LANGENBACH, 2017).

O nervo massetérico segue lateralmente superior ao músculo pterigoideo lateral, sob a base do crânio, anteriormente à articulação temporomandibular e posteriormente ao tendão do músculo temporal. Sequencialmente emerge da fossa infratemporal, atravessa a parte posterior da incisura da mandíbula junto à artéria massetérica, ramifica-se e entra no músculo masseter. Este nervo também emite ramos articulares para a articulação temporomandibular (COOMBS et al., 2009; STANDRING, 2010; YOSHIOKA & TOMINAGA, 2015).

O estudo microscópico dos nervos envolve as etapas de coleta do material, fixação, desidratação e clarificação, inclusão, seccionamento e coloração. A fixação do tecido impede a autólise das células, cria ligações e gera estabilidade entre as moléculas, evita a proliferação bacteriana e preserva os tecidos para futuras colorações (STEVENS & LOWE, 1995). Para microscópio óptico, formaldeído a 4% é um fixador comumente usado, assim como glutaraldeído que forma mais ligações cruzadas entre as moléculas em comparação com o formaldeído a 4% (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). No caso de microscopia eletrônica, é importante ter maior estabilidade entre as moléculas das células para preservá-las, em função da propriedade de alta resolução deste aparelho. Por isso, aconselha-se o uso de fixação dupla, uma depois da outra como a fixação por glutaraldeído tamponada seguido por tetróxido de ósmio (BANKS et al., 1999). Para poder cortar em micrótomo para futura coloração, o fragmento fixado é embebido em parafina, para microscópio óptico (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008), ou em resina plástica para microscópio eletrônico (BANKS et al., 1999). Para este fim, o fragmento passa por desidratação gradual em etanol 70% a 100%. Na clarificação do tecido, o etanol é substituído pela solução xilol, que é miscível com etanol e parafina, além de deixar o tecido transparente ou translúcido para a futura coloração (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). A parafina ou resina confere rigidez ao fragmento para cortar em micrótomo (GARTNER & HIATT, 1999).

A utilização de corantes é fundamental para visualizar os tecidos ao microscópio de óptico (FISCHER et al., 2006). A hematoxilina, sendo um corante básico, forma ligações com componentes ácidos como DNA e RNA, por isso, cora o núcleo, retículo endoplasmático rugoso e ribossomos em azul-púrpura (YOUNG et al., 2007; BANKS et al., 1999). É o corante mais utilizado nas lâminas histológicas (EROSCHENKO, 2008). Por outro lado, a eosina, sendo corante ácido, liga-se a componentes básicos da célula, como os grupamentos amino ionizados das proteínas citoplasmáticas, e cora-os em vermelho ou rosa (YOUNG et al., 2007). Azul de toluidina é um corante básico que também pode ser usado para cortes semifinos de tecidos embebidos em resina. É usada para analisar a morfologia de nervos (RISLING et al., 1993) em alta resolução (YOUNG et al., 2007).

1.1 JUSTIFICATIVA

O conhecimento sobre a estrutura, variações anatômicas e a localização do nervo massetérico pode contribuir para procedimentos cirúrgicos que o utilizam para neurorrafia com nervo facial paralisado (HWANG et al., 2005; BORSCHHEL et al., 2012; KIM et al., 2013).

Alguns autores têm utilizado, para estudo morfométrico dos nervos de cadáveres frescos (6 a 10h após a morte), a técnica de inclusão em parafina e coloração com Hematoxilina-Eosina (JOTZ et al., 2011; CHAKRAVARTHY et al., 2009) e a técnica de inclusão em resina e coloração em Azul de Toluidina (BORSCHHEL et al., 2012; TIAGO et al., 2005). O uso de nervos periféricos de cadáveres humanos de laboratórios de anatomia humana, utilizados didaticamente em aulas, para análise morfométrica, já foi realizado por outros autores através da técnica de Hematoxilina-Eosina (BOEHM & KONDRASHOV, 2016) e da técnica de coloração com Azul de Toluidina (HAUCK et al., 2009).

Considerando a possibilidade do uso de nervos de cadáveres fixados pós-congelamento do acervo do Laboratório de Anatomia Humana da UFRGS para estudos anatômicos e histológicos, este trabalho objetiva descrever a localização anatômica do nervo massetérico e identificar a técnica histológica mais indicada para realização de análise morfométrica de cortes transversais de nervos massetéricos de cadáveres do laboratório de Anatomia Humana da UFRGS.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Descrever a localização anatômica do nervo massetérico e identificar a técnica histológica mais indicada para realização de análise morfométrica de cortes transversais de nervos massetéricos de cadáveres do laboratório de Anatomia Humana da UFRGS.

1.2.2 Objetivos específicos

- Descrever o posicionamento do nervo massetérico em relação ao tragus e ao arco zigomático.
- Descrever a relação de posicionamento anatômico entre o nervo massetérico e a artéria massetérica.
- Analisar comparativamente os aspectos histológicos qualitativos e quantitativos dos cortes transversais dos nervos massetéricos de cadáveres, processados com duas diferentes técnicas histológicas.
- Analisar comparativamente os aspectos histológicos qualitativos dos cortes transversais dos nervos massetéricos de cadáveres fixados pós-congelamento recém-retirados da cuba de formol e oriundos de mesas de estudo do laboratório buscando reconhecer a técnica mais indicada para este estudo histológico deste nervo.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Comparison of the transverse sections of the masseteric nerve of human cadavers processed by two different histological techniques

Eric Kwame Karikari Darko, Daniel Prato Schmidt, Taís Malysz

Eric Kwame Karikari Darko:

Departamento de ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 - 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. erickwamekarikaridarko@gmail.com.

Daniel Prato Schmidt:

Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 - 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. dpschmidt@hotmail.com.

Taís Malysz:

Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 - 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. taismalysz@yahoo.com.br.

Abstract

Introduction: The objective of this study was to describe the anatomical location of the masseteric nerve and identify the most efficient histological technique for the morphometrical analysis of the myelinated nerve fibers from fixed post-frozen cadavers. **Material and Methods:** Four female cadavers were used, 2 of which had been removed from the formaldehyde vats and 2 others that had been on study tables for close to 1 year. A segment of the right and left masseteric nerve was collected and divided into two parts, one for each histological technique: inclusion in acrylic resin with toluidine blue staining, inclusion in paraffin with hematoxylin-eosin staining. Qualitative and quantitative analysis of the cross-sectional images of the masseteric nerve were done. **Results:** The nerve was located at 32.3 ± 2.6 mm anterior to the tragus, 8.2 ± 0.9 mm inferior to the zygomatic arch and 10.1 ± 0.9 mm deep. All the cadavers from the vat had better histological preservation of the masseteric nerve. The nerve from the cadaver of the vat had smaller cross-section areas and myelinated fibers compared to the other nerves. **Conclusion:** The most efficient histological technique to analyze the myelinated nerve fibers was to include them in acrylic resin with toluidine blue staining. The cadavers removed immediately from the vat showed better structural preservation of the masseteric nerve compared to those from the study tables.

Keywords: masseteric nerve, nerve fiber, anatomy, histology, morphometry

Running Title: Comparison of masseteric nerves in cadavers

Introdução: O nervo massetérico, um dos ramos motores do nervo mandibular (V3), segue sob a base do crânio, anteriormente à articulação temporomandibular e posteriormente ao tendão do músculo temporal. Sequencialmente emerge da fossa infratemporal, atravessa a parte posterior da incisura da mandíbula junto à artéria massetérica, ramifica-se e entra no músculo masseter. Este nervo também emite ramos articulares para a articulação temporomandibular (Coombs et al., 2009; Standring, 2010; Yoshioka e Tominaga, 2015). O conhecimento sobre a estrutura, variações anatômicas e a localização do nervo massetérico pode contribuir para procedimentos cirúrgicos que o utilizam para neurorrafia com nervo facial paralisado (Hwang et al., 2005; Borschel et al., 2012; Kim et al., 2013). Alguns autores têm utilizado, para estudo morfométrico dos nervos de cadáveres frescos (6 a 10h após a morte) a técnica de inclusão em parafina e coloração com Hematoxilina-Eosina (Jotz et al., 2011; Chakravarthy et al., 2009) e a técnica de inclusão em resina e coloração com Azul de Toluidina (Borschel et al., 2012; Tiago et al., 2005). O uso de nervos periféricos de cadáveres humanos de laboratórios de anatomia humana, utilizados didaticamente em aulas, para análise morfométrica, já foi realizado por outros autores através da técnica de Hematoxilina-Eosina (Boehm e Kondrashov, 2016) e a técnica de coloração em Azul de Toluidina (Hauck et al., 2009).

Considerando a possibilidade do uso de nervos de cadáveres fixados pós-congelamento do acervo do Laboratório de Anatomia Humana da UFRGS para estudos anatômicos e morfométricos, este trabalho objetiva descrever a localização anatômica do nervo massetérico e identificar a técnica histológica mais indicada para realização de análise morfométrica de cortes transversais de nervos massetéricos de cadáveres do laboratório de Anatomia Humana da UFRGS.

Material e Métodos: Foram utilizados 4 cadáveres caucasianos do gênero feminino, totalizando 8 hemifaces, 16 amostras de nervos (8 para cada técnica histológica diferente). Os nervos massetéricos foram coletados de cadáveres do Laboratório de Anatomia Humana do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) doados para estudo. Por rotina do laboratório, os corpos humanos doados (cerca de 8-12 h após a morte) são mantidos congelados em câmara fria (-10°C) por cerca de 2 anos. Posteriormente são perfundidos em solução de formaldeído 10% e mantidos em cubas, imersos na mesma solução, por cerca de 6 meses. Após este prazo passam para as mesas de estudo onde são dissecados e utilizados com fins didáticos por alunos de disciplinas de Anatomia Humana da graduação e pós-graduação. Nestas mesas de estudo, os corpos são

diariamente mantidos hidratados por uma solução contendo glicerina 10%, álcool 10% e desinfetante. Os corpos humanos utilizados neste estudo apresentavam idade média de 74 ± 10 anos e tinham as faces íntegras. Dois dos quatro corpos foram utilizados da cuba de formol e dois das mesas de estudo, cerca de 1 ano após sua saída da cuba. Em ambas as hemifaces dos cadáveres deste estudo, através de instrumental cirúrgico, a pele, tecido subcutâneo, sistema muscular aponeurótico da face e parte do músculo massetérico foram dissecados para evidenciar o nervo e a artéria massetérica. O posicionamento do nervo massetérico e da artéria massetérica em relação ao tragus e ao arco zigomático foi registrado através do uso de um paquímetro digital. Após o registro de medidas foi coletado um segmento (aproximadamente 5 mm) do nervo massetérico direito e esquerdo, imediatamente antes da sua ramificação. Estes segmentos foram divididos em duas partes iguais. Cada coto nervoso (parte do segmento) foi utilizado para uma técnica específica: (1) inclusão em resina acrílica com coloração em Azul de Toluidina (Gartner e Hiatt, 2014), (2) inclusão em parafina com coloração em Hematoxilina-Eosina (Stevens e Lowe, 1995; Banks et al., 1999).

Para a técnica de inclusão em resina e coloração com azul de toluidina, o nervo foi fixado em solução de glutaraldeído 2,5% (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA) e paraformaldeído 4% (Reagen, São Paulo, Brasil) em tampão fosfato 0,1M por 48 horas. A seguir, o material foi lavado em solução tampão fosfato (TF 0,1M), pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% (Banks et al., 1999) e novamente lavado em TF. Sequencialmente o material foi desidratado em concentrações crescentes de acetona, pré-embebido progressivamente em solução de resina diluída em acetona e posteriormente embebido em resina Durcupan ACM 100% (Fluka, Switzerland) em moldes que sequencialmente, foram colocados em estufa a 60°C para polimerização. Os cortes semifinos (800-900 nm) dos segmentos do nervo foram obtidos no ultramicrótomo (Leica Ultracut UCT 2.0, Germany). As lâminas contendo os cortes foram coradas com azul de toluidina (Merck, Germany) 1% diluído em tetraborato de sódio 4% (Ecibra, Brasil) (Marcuzzo et al., 2008).

Para a técnica hematoxilina-eosina, o material foi pós-fixado em solução de paraformaldeído 4% por 24 horas, desidratado em álcool e diafanizado em xilol. Sequencialmente foi impregnado em banhos de parafina e posteriormente incluído em parafina. Os cortes transversais dos nervos massetéricos com espessura de $4\mu\text{m}$ foram feitos através do Micrótomo (Leica RM 2125), aderidos em lâminas gelatinizadas e colocados para secagem a 37°C . Posteriormente, as lâminas passaram por banhos de xilol, álcool decrescente e água destilada. Foram então, submetidos à coloração em Hematoxilina (10 min) seguida de Eosina (20 min) para visualização das estruturas celulares (Stevens e Lowe, 1995),

desidratados em álcool crescente, e xilol. Lâminas foram cobertas com solução de Permount e lamínulas.

As imagens dos cortes transversais dos segmentos do nervo foram capturadas e digitalizadas com um microscópio Nikon Eclipse E-600 (Japan) acoplado a uma câmera de alta performance CCD. Para medir a área de secção transversa foi usada a objetiva com aumento de 10X e para medir área da fibra nervosa foi usada objetiva com aumento de 100X e fotografadas 5 imagens de cada corte transversal do nervo, sendo 4 periféricas e 1 central. Em cada imagem foi plotada uma área de interesse de $4549,54 \mu\text{m}^2$, totalizando uma área total analisada de $22747,7 \mu\text{m}^2$ em cada nervo. Também foi analisada a densidade de fibras nervosas mielinizadas e mensuráveis (número de fibras mielinizadas/ mm^2). Foram realizadas descrições qualitativas e quantitativas. Para as avaliações quantitativas foi utilizado o Software ZEN 2.3 (Zeiss). Somente foram medidas as fibras que apresentavam o axônio e a região da bainha de mielina evidentes. Pela qualidade das imagens, foram escolhidos os nervos do lado direito de dois corpos, 1 da cuba (Cdir, 69 anos) e 1 da mesa (Mdir, 78 anos) para fazer registros sobre os valores morfométricos. A análise estatística foi feita através de registro de média e desvio padrão e as comparações entre as médias de área de secção transversa das fibras entre técnicas diferentes utilizando o teste T-student, considerando $p < 0,05$.

Resultados: Os nervos massetéricos das oito hemifaces foram identificados através da dissecação da região localizada anteriormente ao tragus e inferiormente ao arco zigomático (Figura 1). O nervo esteve localizado na profundidade do músculo masseter a $32,3 \pm 2,6$ mm de distância do tragus e a $8,2 \pm 0,9$ mm de distância do arco zigomático. A artéria massetéica, que cursa juntamente ao nervo, apresentou $29,8 \pm 2,6$ mm de distância do tragus e a $7,46 \pm 1,15$ mm de distância do arco zigomático. Artéria e nervo apareceram posicionados a $10,1 \pm 0,9$ mm da superfície.

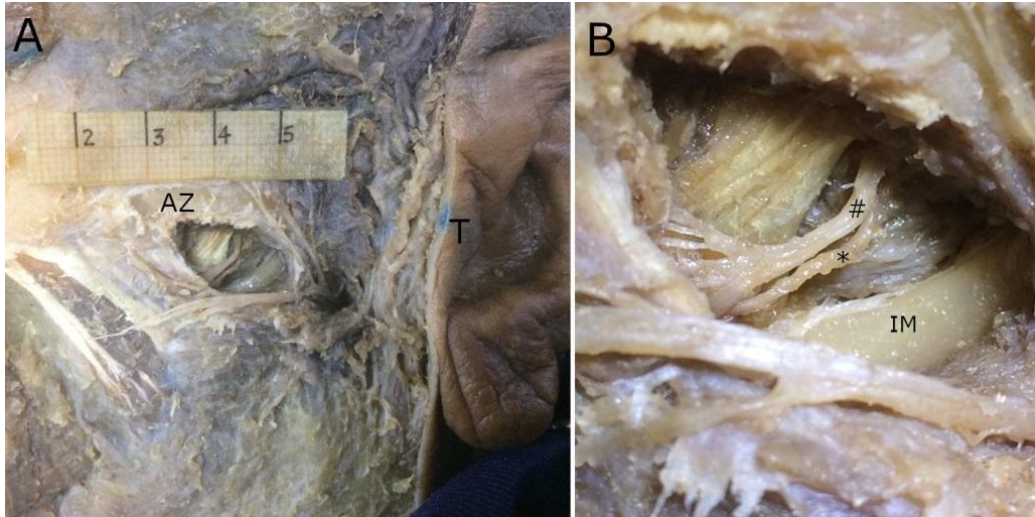


Figura 1 – A - Vista lateral esquerda de um cadáver feminino com a hemiface esquerda dissecada, evidenciando a região de interesse anteriormente ao tragus (T) e inferiormente ao arco zigomático (AZ). B – Região dissecada em maior aumento evidenciando a incisura da mandíbula (IM) e acima dela o nervo massetérico (#) e a artéria massetérica (*).

A área de secção transversal do nervo massetérico do cadáver Cdir foi de $0,15 \text{ mm}^2$ na técnica resina/azul de toluidina (Fig 2A) e $0,21 \text{ mm}^2$ na técnica parafina/hematoxilina-eosina (Fig 2B). A área de secção transversal do nervo massetérico do cadáver Mdir foi de $0,28 \text{ mm}^2$ na técnica resina/azul de toluidina (Fig 2C) e $0,25 \text{ mm}^2$ na técnica parafina/hematoxilina-eosina (Fig 2D).

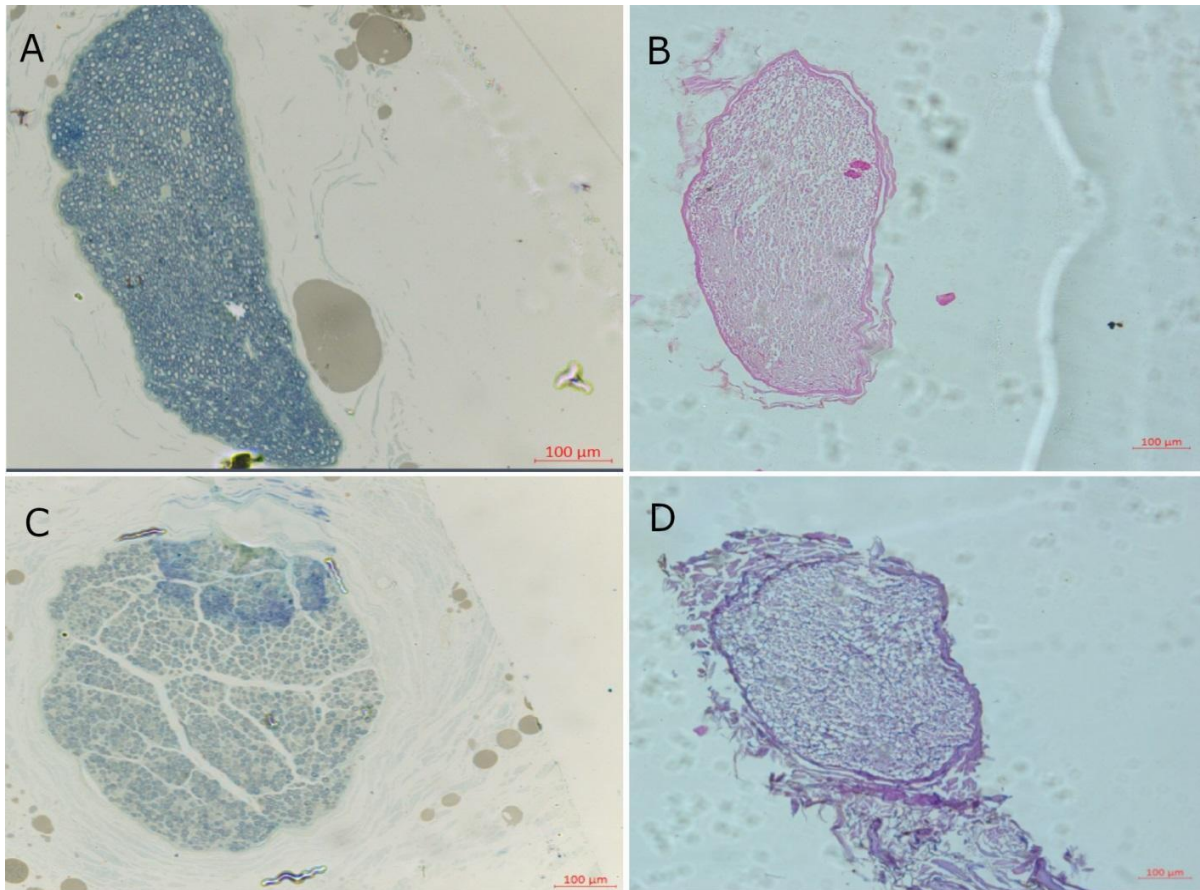


Figura 2: Imagens utilizadas para mensuração da área de secção transversal do nervo massetérico do cadáver Cdir na técnica resina/azul de toluidina (A) e na técnica parafina/hematoxilina-eosina (B) e do cadáver Mdir na técnica resina/azul de toluidina (C) e na técnica parafina/hematoxilina-eosina (D). Objetiva 10X.

A área total analisada em cada nervo foi de $0,02 \text{ mm}^2$ ($22747,7 \text{ } \mu\text{m}^2$). Nesta área, foi possível mensurar um número maior de fibras nervosas mielinizadas identificáveis no nervo massetérico do cadáver oriundo da cuba (Cdir) e processado através da técnica resina/azul de toluidina ($n=263$). Uma menor quantidade de fibras nervosas foi analisada em nervos do cadáver Mdir processado através da técnica resina/azul de toluidina ($n=131$) e nos nervos de ambos os corpos processados com a técnica parafina/hematoxilina-eosina ($n=117$ e $n=110$ respectivamente; Tabela 1). A densidade de fibras analisadas também foi maior no cadáver oriundo da cuba (Cdir) e processado através da técnica resina/azul de toluidina ($0,012 \text{ fibras/mm}^2$) em comparação com os outros processados por meio da técnica parafina/hematoxilina-eosina (Tabela 01).

Corpo	Técnica	NFA	DF (nf/mm ²)	AMF (μm ²)
Cdir	RA	263	0,012	72,01±21,8
	PHE	117	0,005	93,3±33,6*
Mdir	RA	131	0,006	81,3 ±33,3
	PHE	110	0,005	112,45±45,2*

Tabela 1: A tabela representa os dados de análise morfométrica de cortes histológicos transversais do nervo massetérico direito de 2 cadáveres humanos, Cdir oriundo da cuba de formol e Mdir oriundo da mesa de estudo e processados por duas diferentes técnicas histológicas RA: Resina/Azul de Toluidina; PHE: Parafina/Hematoxilina-Eosina. NFA: número de fibras analisadas; DF: densidade de fibras (nf/mm²); AMF: área média de fibras mielínicas (μm²). * p<0,05 vs PHE em ambos os corpos.

Como podemos ver na Tabela 1 na Figura 3, as médias das áreas de secção transversa das fibras nervosas do nervo massetérico direito dos cadáveres Cdir e Mdir, foram maiores nos tecidos processados com a técnica parafina/hematoxilina-eosina (93,3±33,6 e 112,45±45,2μm², respectivamente) do que com a técnica resina/azul de toluidina (72,01±21,8 e 81,3 ±33,3μm², respectivamente).

Embora as áreas axonais não tenham sido medidas devido à imprecisão na medida das imagens processadas com hematoxilina-eosina, as áreas de secção transversa dos axônios dos nervos massetérico processados com a técnica resina/azul de toluidina, especialmente nos nervos de cadáveres oriundos da cuba, foram aparentemente maiores do que nos processados com a técnica parafina/hematoxilina-eosina (Figura 3). Todos os cadáveres oriundos da cuba apresentaram melhor preservação do nervo massetérico, e isso ficou melhor evidenciado pelo processamento histológico por inclusão em resina e coloração com azul de toluidina. Em meio ao tecido conjuntivo endoneural, as bainhas de mielina apresentaram-se bem nítidas e axônio com aspecto circular mantido. De acordo com as análises morfométricas, o nervo oriundo de cadáver retirado diretamente da cuba de formol e processado pela técnica de RA apresentou maior densidade de axônios possíveis de serem analisados e uma menor área de secção transversa das fibras nervosas analisadas (Tabela 1, Figuras 2A e 3A).

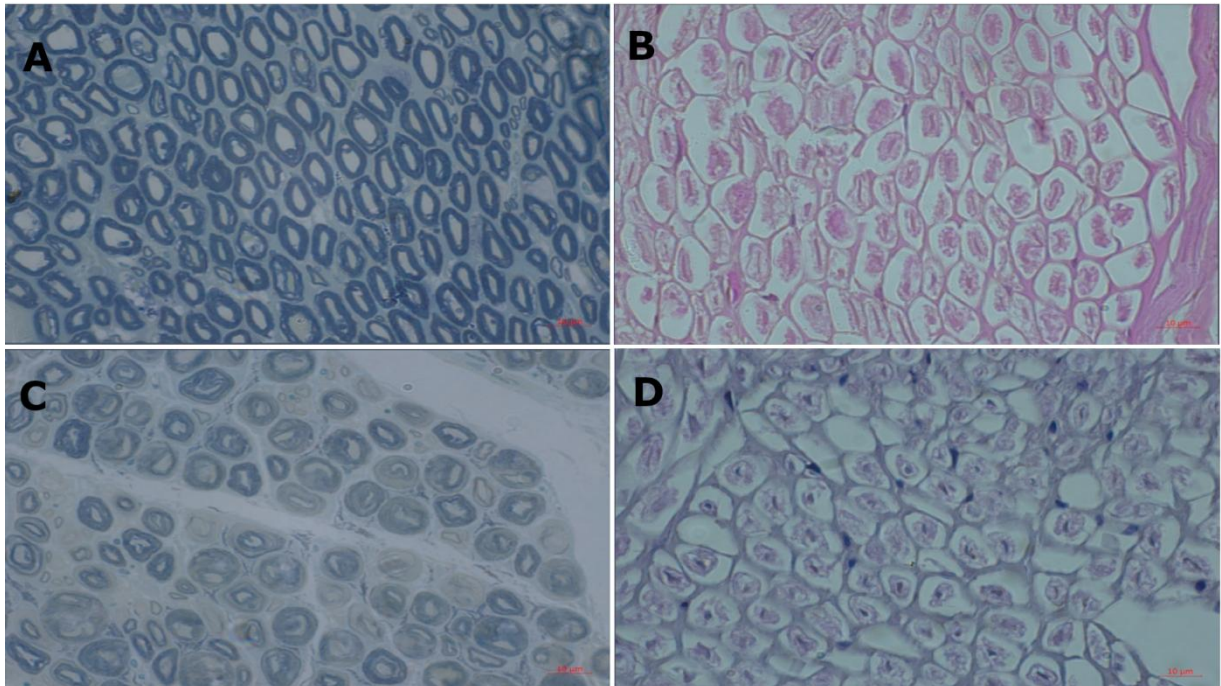


Figura 3: Imagens de secção transversal do nervo massetérico do cadáver Cdir na técnica resina/azul de toluidina (A) e na técnica parafina/hematoxilina-eosina (B) e do cadáver Mdir na técnica resina/azul de toluidina (C) e na técnica parafina/hematoxilina-eosina (D). Nos cortes das imagens A e C observe os axônios (branco) envolvidos pela bainha de mielina (azul) em meio a tecido conjuntivo endoneural. Nos cortes das imagens B e D observe os axônios na região central das fibras (mais corados) em meio a um espaço em branco que parece vazio pela extração dos lipídios da bainha de mielina quando da preparação e rodeados por tecido conjuntivo endoneural. Alguns núcleos (mais pigmentados) das células de Schwann também estão visíveis externamente ao espaço em branco (imagens B e D). Objetiva 100X.

Discussão: A localização do nervo massetérico e a sua relação com a artéria massetérica é muito importante para nortear procedimentos cirúrgicos ou de bloqueio anestésico. Os nervos massetéricos estiveram localizados a $32,3 \pm 2,6$ mm (cerca de 3 cm) de distância do tragus e a $8,2 \pm 0,9$ mm (cerca de 1 cm) de distância do arco zigomático. De acordo com o trabalho de Borschel et al (2012) o nervo foi encontrado a $31,6 \pm 3,0$ mm anterior ao tragus e $10,8 \pm 1,8$ mm inferior ao arco zigomático, sendo desta forma, compatível com os nossos resultados. Além disso, vale ressaltar que o nervo massetérico apresentou-se posicionado imediatamente anterior e superior à artéria massetérica em todos os indivíduos avaliados.

O uso de nervos periféricos em cadáveres humanos de laboratórios de anatomia humana, utilizados didaticamente em aulas, já foi realizado por outros autores. Recentemente Boehm e Kondrashov (2016), utilizando 8 cadáveres, descreveram a presença de corpos celulares nas raízes do nervo acessório utilizando a técnica hematoxilina-eosina. Ray et al (2016) estudaram o trajeto anatômico do nervo cutâneo femoral lateral em 34 cadáveres e fizeram avaliação histológica através da mesma técnica, registrando valores de área de

fascículos e do nervo. Hauck et al., (2009) identificaram fibras eferentes somáticas e parassimpáticas, através de valores de área de secção transversa das fibras nervosas, em raízes nervosas sacrais de 6 cadáveres do laboratório de anatomia humana, incluídas em resina e coradas com azul de toluidina.

Neste estudo, a análise das fibras nervosas baseou-se no fato de que as fibras escolhidas deveriam ser completas, possuindo axônio e bainha de mielina visíveis, capazes de serem analisados. Segundo a visualização microscópica das lâminas coradas por azul de toluidina, as fibras nervosas completas foram determinadas pela presença de bainhas de mielina coradas em azul escuro, enquanto os axônios e o tecido conjuntivo não foram corados ou coraram-se levemente em azul (Ross et al., 2012). Esta técnica permitiu melhor análise e identificação da bainha de mielina e observação da maioria das fibras como intactas e isoladas, permitindo a contagem da maioria das fibras nervosas.

De acordo com o resultado da técnica da hematoxilina-eosina, tanto o axônio como o tecido conjuntivo coraram-se em rosa e a parte lipídica da bainha de mielina não foi corada. Foi possível analisar e contar os axônios das fibras bem como alterações no tecido conjuntivo, como rupturas e distorção tecidual. As fibras que não foram analisadas incluíram fibras cujo espaço do diâmetro estava em branco, que apresentaram rupturas no meio das fibras dificultando análises dos axônios ou/e a bainha de mielina, e fibras que apareciam como se estivessem fusionadas pela ruptura do endoneuro (Ross et al., 2012).

A técnica de azul de toluidina permitiu analisar um percentual significativamente de fibras maior (71,86%) no nervo do cadáver oriundo imediatamente da cuba do que seu correspondente percentual (41,13%) no nervo do cadáver oriundo da mesa. A técnica de hematoxilina-eosina permitiu analisar percentual de fibras (57,23%) um pouco maior nos nervos da mesa em comparação ao seu percentual de análise (45,25%) nos nervos da cuba, uma diferença que não foi significativa. A grande diferença de percentagem de fibras analisadas pelo azul de toluidina entre os nervos da cuba e da mesa indica que, Os nervos dos cadáveres das cubas permanecem mais bem conservados que os nervos dos cadáveres das mesas, o que contribui para a eficiência da técnica.

O tetróxido de ósmio é usado como fixador secundário no processamento histológico, antes da coloração pelo azul de toluidina e permite visualizar bem a bainha de mielina (Ross et al., 2012). Ele funciona por reagir com lipídios para oxidar as ligações não saturadas, proporcionando aumento de densidade e contraste da imagem (Bozzola e Russell, 1999). Essa propriedade de tetróxido de ósmio claramente indica que ele é muito útil nos estudos cujo objetivo é examinar a bainha de mielina e a facilidade de identificação das fibras nervosas

como foi neste estudo. Assim, o maior número de fibras analisadas, da densidade e da porcentagem de fibras, além de uma melhor preservação axonal foram possibilitadas pelo uso da técnica resina/azul de toluidina.

Conforme vimos nos resultados, a área média das fibras nervosas mielinizadas foram maiores nos nervos submetidos a técnica parafina/hematoxilina-eosina. Isso pode ser explicado porque nesta técnica há perda de lipídios durante o processamento histológico, deixando espaços em branco na forma de vacúolos (Inue et al., 2007; Junqueira e Carneiro, 2008). O xilol, utilizado para remover o álcool antes da impregnação em parafina, é um solvente orgânico que tem capacidade de dissolver outras substâncias orgânicas, como lipídios (Department of health and human services, 2007). Assim, o xilol teria retirado o conteúdo lipídico da bainha de mielina das fibras, criando espaços vazios e maiores em branco ao redor das fibras, como mostrado pelos resultados deste trabalho. Isso gera um certo grau de incerteza ao analisar morfometricamente as bainhas de mielina das fibras observadas. Em contrapartida, os tecidos fixados em glutaraldeído e incluídos em resina possuem sua bainha de mielina bem preservada e corada (Young et al., 2007). A presença do tetróxido de ósmio usado nesta técnica impede inchaço da bainha de mielina (Di Scipio et al., 2008) e impede que esta seja “lavada”, proporcionando contraste para sua identificação (Bozzola e Russell, 1999).

Outros trabalhos relatam alguns fatores com alto grau de interferência nos resultados de análises histológicas, como o pH do fixador e a qualidade do fixador utilizado. Um fixador de baixa qualidade pode provocar retração tecidual, perda tecidual e a interferência na qualidade do corante usado (Silveira, 2006; Suvarna, et al., 2012). Há também a questão da preservação inicial dos cadáveres, como o congelamento, que pode provocar eventual perda de coloração das lâminas a serem analisadas (Baraibar e Schoning, 1985). Seria melhor ter um estudo controle para analisar os efeitos dos fixadores e de congelamento-descongelamento sobre tecidos nervosos periféricos dos cadáveres para evitar futuras incertezas associadas com algumas técnicas de coloração com hematoxilina-eosina.

Os nervos de cadáver oriundo da cuba, além de registrarem maiores números de fibras analisadas e maior densidade de fibras mielínicas, eles possuem maior preservação axonal para ambas as técnicas de azul de toluidina e hematoxilina-eosina do que os nervos de cadáveres da mesa, o que sugere uma provável indicação de que os nervos são melhor preservados na cuba do que na mesa. Dos Santos (2014) diz que cadáveres da rotina (nervos da mesa) podem ser danificados ou entrar em deterioração pela sua frequente manipulação e seu uso prolongado. Portanto, é possível que o baixo rendimento dos nervos da mesa

comparado aos nervos da cuba tenha uma relação com a conservação dos tecidos. Assim, a técnica de pós-fixação em glutaraldeído e em tetróxido de ósmio com inclusão em resina e coloração com azul de toluidina apresentou-se eficiente para análise das fibras mielínicas do nervo massetérico em cadáveres recém retirados da cuba de formol. As diferenças encontradas, nestes aspectos, em relação aos nervos de cadáveres oriundos das mesas de estudo se devem ao fato de que nestes corpos identificamos o nervo com sinais degenerativos que incluem menor número e densidade de fibras nervosas mielínicas analisadas, ruptura de tecido conjuntivo e pior preservação dos axônios.

Este é o primeiro estudo histológico realizado com tecidos oriundos de cadáveres do Laboratório de Anatomia Humana da UFRGS. Neste laboratório, a partir do momento que os corpos são recebidos pela Universidade, os mesmos são congelados, posteriormente perfundidos com formol e imersos na mesma solução fixadora nas cubas. Por rotina, após a retirada da cuba, os corpos são dissecados conforme a necessidade e mantidos nas mesas de estudo cobertos por um lençol e banhados por solução de preservação (álcool, glicerina e desinfetante) sem retornar mais para a cuba de formol. Essa tem sido uma ótima condição para uso do corpo em atividades didáticas, porém pelo que vimos neste trabalho, parece não possibilitar a preservação dos tecidos biológicos da forma ideal, dificultando o seu uso em pesquisa.

Conclusão: O nervo massetérico de cadáveres caucasianos, do sexo feminino, fixados pós-congelamento do acervo Laboratório de Anatomia Humana da UFRGS, esteve localizado a cerca de 3,2 cm anteriormente ao tragus, 0,8 cm inferiormente ao arco zigomático e a cerca de 1,0 cm da superfície. A técnica histológica mais indicada para analisar morfometricamente as fibras nervosas mielínicas destes cadáveres foi a de pós-fixação em glutaraldeído e tetróxido de ósmio com inclusão em resina acrílica e coloração com azul de toluidina, quando comparada a pós-fixação em paraformaldeído, inclusão em parafina e coloração com hematoxilina-eosina. Adicionalmente, os corpos recém-retirados da cuba de formol mostraram ter melhor preservação estrutural do nervo massetérico em comparação com cadáveres oriundos das mesas de estudo, os quais são mantidos hidratados por uma solução de preservação sem formol.

Referências

BANKS, R.W., WINDHORST, U. and JOHANSON, A., 1999. *Modern Techniques in Neuroscience Research*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

BARAIBAR, M. and SCHONING, P., 1985. Effects of Freezing and Frozen Storage on Histological Characteristics of Canine Tissues. *Journal of Forensic Sciences*. Vol. 30, No. 2, pp. 439-447, <https://doi.org/10.1520/JFS11823J>. ISSN 0022-1198. Acesso em: 05 Maio 2018.

BOEHM, KE. and KONDRASHOV, P. Distribution of neuron cell bodies in the intraspinal portion of the spinal accessory nerve in Humans. *The anatomic record*, 299: 98-102 (2016).

BORSCHER, G.H., KAWAMURA, D.H., KASUKURTHI, R., HUNTER, D.H., ZUKER, R.M. and WOO, A.S., 2012. The motor nerve to the masseter muscle: an anatomic and histomorphometric study to facilitate its use in facial reanimation. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, [s.l.], v. 65, n. 3, p.363-366. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2011.09.026>. Acesso em: 05 Março 2018.

BOZZOLA, J. and RUSSELL, L., 1999. Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists. Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett*. 2 ed. pp. 21–31. ISBN 9780763701925. Acesso em: 02 Junho 2018.

CHAKRAVARTHY M.S., KUMAR, P., DHALAPATHY, S., PRASAD, K. and ANITHA MARX C. Microanatomical and immunohistochemical study of the human radial nerve at the antecubital fossa. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* Volume 191, Issue 4, 2009, Pages 389-398

COOMBS, C.J., EK, E.W., WU, T., CLELAND, H. and LEUNG, M.K., 2009. Masseteric-facial nerve coaptation—an alternative technique for facial nerve reinnervation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 62, pp. 1580-158. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2008.05.046>. Acessado em: Acesso em: 01 Março 2018.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2007. Public health statement, Xylene. Public health agency for toxicology and disease registry. www.atsdr.cdc.gov/. Acesso em: 25 de Maio 2018.

DI SCIPIO, F., RAIMONDO, S., TOS, P. and GEUNA, S., 2008. A Simple Protocol for Paraffin-Embedded Myelin Sheath Staining With Osmium Tetroxide for Light Microscope Observation. *Microscopy Research and Technique* 71:497–502. Acesso em: 10 Junho 2018.

DOS SANTOS, L.B., DEL-BEL, E.A., PITTELLA, J.E.H. and TUMAS, V., 2014. Influence of external factors on the preservation of human nervous tissue for histological studies: review article. *J Bras Patol Med Lab*. v. 50, n. 6, p. 438-444. Acesso em: 02 Junho 2018.

GARTNER, L.P. and HIATT, J.L., 2014. *Atlas Colorido de Histologia: Corantes*. 6^a Ed. Guanabara Koogan Ltda.

HAUCK, E.F., SCHWEFER, M. WITTKOWSKI, W. and BOTHE, H.W. 2009. Measurements and mapping of 282,420 nerve fibers in the S1–5 nerve roots. **J. Neurosurg Spine** 11:255–263,

HWANG, K., KIM, Y.J. and SONG, I.H., 2005. Course of the Masseteric Nerve in Masseter Muscle. *Journal Of Craniofacial Surgery*. [s.l.], v. 16, n. 2, p.197-200. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00001665-200503000-00003>. Acesso em: 04 Março 2018.

INUE, A.H., ANDRADE, A.C., FERREIRA, A.L., DORNELLAS, A.P.S., NIWA, A.M., VESENICK, D.C. MASSAYO, J., MORI, L.S.S.L.S.M.P., APARECIDA DE PAULA, H., MANIEZZO, N.M., CAVALIN, P.B.B., CESTARI, P.R.Y.R.M.L.S.E., SEMPREBOM, S.T., FUJITA, T.S. and SATO, V.C.V.A.H., 2007. *Atlas de patologia geral*. Londrina: Universidade Estadual de Londrina. Acesso em: 07 Março 2018.

JOTZ, G.P., CAMPOS, D., RODRIGUES, M.F. and XAVIER, L.L., 2011. Histological Asymmetry of the Human Recurrent Laryngeal Nerve. *Journal of Voice*, Vol 25, No.1. Acesso em: 03 Março 2018.

JUNQUEIRA, L.C.U. and CARNEIRO, J., 2008. *Histologia Básica: Texto / Atlas*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 524 p.

KIM, M., KO, Y. and SHIM, H. 2013. A reliable anatomic approach for identification of the masseteric nerve. *British Association of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgeons*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2013.04.056>. Acesso em: 03 Março 2018.

MARCUZZO, S., DUTRA, M.F., STIGGER, F., SEVERO DO NASCIMENTO, P., ILHA, J., KALIL-GASPAR, P.I. and ACHAVAL, M., 2008. Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy-like rodent model: Walking pattern and soleus quantitative histology. *Brain Research*. 1222. 129 – 140. doi:10.1016/j.brainres.2008.05.042. Acesso em: 15 junho 2018.

RAY, B., D'SOUZA A.S., KUMAR, B., MARX, C., GHOSH, B., GUPTA, N.K. and MARX A., 2010. Variations in the Course and Microanatomical Study of the Lateral Femoral Cutaneous Nerve and Its Clinical Importance. *Clinical Anatomy* 23:978–984. DOI:10.1002/ca.21043. Acesso em: 09 Março 2018.

ROSS, M.H., WOJCIECH, P. and BARNASH, T. 2012. *Atlas de Histologia Descritiva*. Porto Alegre: Artmed.

SILVEIRA, S.O., 2006. *Orientação para práticas de laboratório*. Universidade de Santa Maria, 60p. Acesso em: 02 Março 2018.

STANDRING, S., 2010. *Gray's anatomia*. 40. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda. 1583 p. Do original: Gray's Anatomy.

STEVENS, A. and LOWE, J., 1995. *Histologia: Sistema nervoso e Técnicas usadas em histologia e na biologia celular*. 1ª ed. Manole Ltda.

SUVARNA, S.K., LAYTON, C. and BANCROFT, J.D., 2012. *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier.

TIAGO, R.S.L., FARIA, F.P., PONTES, P.A.L and BRASIL, O.O.C. 2005. Morphometric aspects of the human hypoglossal nerve in adults and the elderly. *Rev Bras Otorrinolaringol.* V.71, n.5, 554-8.

YOSHIOKA, N. and TOMINAGA, S., 2015. Masseteric nerve transfer for short-term facial paralysis following skull base surgery. *J plast Reconstr Aesthet Surg* 68: 764-770. Acesso em: 06 Março 2018.

YOUNG, B., LOWE, J.S., STEVENS, A. and HEATH, J.W., 2007. *Wheater Histologia Funcional: Texto e Atlas em Cores*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltd. 436 p. Tradução de: *Wheater's Functional Histology*, 5th ed.

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O nervo massetérico de cadáveres caucasianos, do sexo feminino, fixados pós-congelamento do acervo Laboratório de Anatomia Humana da UFRGS, esteve localizado a cerca de 3,2 cm anteriormente ao tragus, 0,8 cm inferiormente ao arco zigomático e a cerca de 1,0 cm da superfície. A técnica histológica mais indicada para analisar morfometricamente as fibras nervosas mielinizadas destes cadáveres foi a de pós-fixação em glutaraldeído e tetróxido de ósmio com inclusão em resina acrílica e coloração em azul de toluidina, quando comparada a pós-fixação em paraformaldeído, inclusão em parafina e coloração com hematoxilina-eosina. Adicionalmente, os corpos recém-retirados da cuba de formol mostraram ter melhor preservação estrutural do nervo massetérico em comparação com cadáveres oriundos das mesas de estudo, os quais são mantidos hidratados por uma solução de preservação sem formol.

O conhecimento sobre a estrutura e a localização do nervo massetérico podem contribuir para procedimentos cirúrgicos que o utilizam para neurorrafia com nervo facial paralisado. Esse trabalho mostra que é possível realizar estudos histológicos em cadáveres do Laboratório de Anatomia Humana estimulando a prática da pesquisa científica neste ambiente. Futuros trabalhos podem avaliar outros nervos e tecidos de cadáveres recém-retirados das cubas de formol.

REFERÊNCIAS

- BANKS, R.W., WINDHORST, U, JOHANSON, A. (eds.). **Modern Techniques in Neuroscience Research**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. - 2.ed. - Porto Alegre: Artmed, 2002. 878p.
- BOEHM, KE; KONDRASHOV, P. Distribution of neuron cell bodies in the intraspinal portion of the spinal accessory nerve in Humans. **The anatomic record**, 299: 98-102 (2016).
- BOLSOVER, Stephen R. et al. **Cell Biology A Short Course**. 2nd Ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2004. 525p.
- BORSCHHEL, Gregory H. et al. The motor nerve to the masseter muscle: an anatomic and histomorphometric study to facilitate its use in facial reanimation. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, [s.l.], v. 65, n. 3, p.363-366, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2011.09.026>. Disponível em: <Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery (2012)>. Acesso em: 05 Março 2018.
- BYRNE, J. H.; DAFNY, N. Lab 10 - Cranial Nerve Nuclei and Brain Stem Circulation: **Cranial Nerve V-Trigeminal Nerve**. 2014. The University of Texas Medical School at Houston (UTHealth). <https://nba.uth.tmc.edu/neuroanatomy/L10/Lab10p26_index.html> Acesso em: 07 Março 2018.
- CHAKRAVARTHY Marx S. et al. Microanatomical and immunohistochemical study of the human radial nerve at the antecubital fossa. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger** Volume 191, Issue 4, 2009, Pages 389-398
- COOMBS, C. J. et al. Masseteric-facial nerve coaptation—an alternative technique for facial nerve reinnervation. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, 62. 2009. pp. 1580-158. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2008.05.046>. Acesso em: 01 Março 2018.
- DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2002.
- DRAKE, R.; VOGL, W; MITCHELL, A. **Gray's Anatomy for Students**. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2010.
- ELLIS, Harold. **Clinical Anatomy A revision and Applied Anatomy for clinical students**. 11th ed. Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd. 2006.
- EROSCHENKO, Victor. **Di Fiore's atlas of histology with functional correlations**. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2008.
- ESTEVES, A. et al. Anatomical description of the trigeminal nerve [v] and its branching in mongrel dogs. **Braz. J. Morphol. Sci.** 2009, vol. 26, no. 3-4, p. 187-192. Acesso em: 08 Março 2018.

FISCHER, A., JACOBSON, K., ROSE, J & ZELLER, R. 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. **CSH Protocols**; 2008; doi:10.1101/pdb.prot4986.

FLORES, A. J.; LAVERNIA, C. J.; OWENS, P. Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. **American journal of orthopedics (Belle Mead, N.J.)** 29(3):167-73. 2000. Acesso em: 08 Março 2018.

GARTNER, L P; HIATT, J L. **Tratado de Histologia Em Cores: Corantes**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.

HAUCK, E.F., et al. Measurements and mapping of 282,420 nerve fibers in the S1–5 nerve roots. **J. Neurosurg Spine** 11:255–263, 2009

HWANG, Kun et al. Course of the Masseteric Nerve in Masseter Muscle. **Journal of Craniofacial Surgery**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.197-200, mar. 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00001665-200503000-00003>. Acesso em: 04 Março 2018.

JOTZ, Geraldo P. et al. Histological Asymmetry of the Human Recurrent Laryngeal Nerve. **Journal of Voice**, Vol 25, No.1. 2011. DOI:[10.1016/j.jvoice.2009.06.007](https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2009.06.007). Acesso em: 04 Março 2018.

JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto / Atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2017.

KIERSZENBAUM, A. TRES, L. L. **Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda. 2012.

KIM, M; KO, Y; SHIM, H. A reliable anatomic approach for identification of the masseteric nerve. **British Association of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgeons**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2013.04.056>. 2013. Acesso em: 03 Março 2018.

KOSTAKIS, Nicholas; Ng, Lydia; **Guillozet-Bongaarts**, Angela. Motor Nucleus of the Trigeminal Nerve. **Nature Precedings**, [s.l.], p.2-2, 18 ago. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/npre.2008.2202.1>
<<http://precedings.nature.com/documents/2202/version/1>>. Acesso em: 04 Março 2018.

MACHADO, Angelo. **Neuroanatomia Funcional**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. 363 p.

MOORE, Keith L.; DALLEY, Arthur; AGUR, Anne M. **Anatomia orientada para a clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda., 2014. 1307 p. Tradução de: Moore clinical oriented anatomy ISBN 978-85-277-2584-2.

MORELL, P.; QUARLES, R. H. The Myelin Sheath. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 6 ed. Philadelphia:Lippincott-Raven. 1999. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27954/> Acesso em: 05 Março 2018.

PURVES, Dale et al. **Neurociências**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

RISLING, Marten G. et al., Regrowth of motor axons following spinal cord lesions: Distribution of lamina and collagen in CNS scar tissue. **Brain Research Bulletin**. Vol. 30, pp. 405-414, 1993. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90272-D](https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90272-D).

ROSS, Michael H.; WOJCIECH, Pawlina. **Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. 996p.

SGARBI, Nicolás et al. Anatomy of the Trigeminal Nerve. Key Anatomical Facts for MRI Examination of Trigeminal Neuralgia. **Sociedad De Radiologia e Imagenologia Del Uruguay**. 12(2):28-33. 2009. Acesso em: 05 Março 2018.

SNELL, Richard S. **Clinical Neuroanatomy**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. p 543.

STANDRING, Susan. **Gray's anatomia**. 40. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2010. 1583 p.

STEVENS, A; LOWE, J. **Histologia: Sistema nervoso e Técnicas usadas em histologia e na biologia celular**. 1^a ed. Manole Ltda. 1995.

TIAGO, Romualdo SL et al. Morphometric aspects of the human hypoglossal nerve in adults and the elderly. **Rev Bras Otorrinolaringol**. v.71, n.5, 554-8, sep./oct. 2005

VAN EIJDEN, T. M. G. J; LANGENBACH, G. E. J. Anatomy of the Trigeminal Nerve. **Local Anaesthesia In Dentistry**, [s.l.], p.19-36, 2017. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-43705-7_2. Disponível em: <Local Anaesthesia in Dentistry> Acesso em: 03 Março 2018.

YOSHIOKA, Nobutaka.; TOMINAGA, Shinsuke. Masseteric nerve transfer for short-term facial paralysis following skull base surgery. **J Plast Reconstr Aesthet Surg** 68: 764-770. 2015. Acesso em: 06 Março 2018.

YOUNG, Barbara et al. **Wheater Histologia Funcional: Texto e Atlas em Cores**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2007. 436 p. Tradução de: Wheater's Functional Histology, 5th ed.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA JOURNAL OF MORPHOLOGICAL SCIENCES

Presentation

Journal of Morphological Sciences is issued by SBA-Sociedade Brasileira de Anatomia (*Brazilian Society of Anatomy*) and publishes scientific articles in the area of vertebrate and invertebrate animals.

The publications include structure, functional morphology, animal development, as well all levels of structural organization from the submicroscopical to macroscopical levels including comparative anatomy and *in vitro* systems.

The Journal of Morphological Sciences is currently indexed in the following databases: LILACS (Latin American and Caribbean Health Science Literature), IMLA (Index Medicus Latino-Americano), Veterinary Science Database, CAB Abstracts, CAB Health e BIOSIS (Biological Abstracts and Zoological Record).

It is published four times a year, and each issue contains from 15-17 articles.

Editorial Policy

- It accepts articles in the areas of Neuroanatomy, Cytology, Histology, Embriology, Histochemistry, Electron Microscopy, Experimental Pathology, and Morphology.
- All submitted manuscripts to The Journal of Morphological Sciences should contain scientific research.
- The manuscript can be categorized as a Original Article, Short Communication, Review Article, or a Case report.
- All submitted manuscripts should contain original research, with novel theoretical contributions, not previously published and not under consideration for publication elsewhere.
- Papers which have been submitted for scientific conferences, printed in thesis etc., an appropriate statement note should be included as a footnote.
- The editorial will contain brief information regarding a guest author.
- Authors are required to submit manuscripts electronically using the online submission system available at <http://jms.org.br>.
- Works will be submitted to the Editorial Board's review, and analyzed by two anonymous referees. In the case of disagreement between the reviews, a third referee will be heard, and following all reviews the decision on the acceptance of the manuscript will be made.
- The authors will be contacted via e-mail once the review procedure is complete.
- Accepted articles may be subject to changes, which are not to alter the original content of the submission, related to their manuscripts.
- If a paper is to be declined, it will be sent back to the author accompanied by the referees' reviews.
- Authors and referees will be kept anonymous during the review process.

Submission of manuscript

Together with the manuscripts, all authors are required to submit the terms of agreement and submitting rights of graphic reproduction at <http://jms.submitcentral.com.br/>.

Form of the manuscript

Manuscripts should be submitted electronically only at <http://jms.submitcentral.com.br/> .

The language of all publications is English, and the text should be typed in Times New Roman font, 12 point, with 1.5 spacing between lines and all pages should be numbered as follows:

1) Page 1

Title and Identification

1.1. Title

- "Word or sentence that identifies the manuscript content". (ABNT 6022).
- The full title and the subtitle (IF there is one) should be written in English.
- Titles should be no longer than 15 words.
- The title should not bear any abbreviations, and species names and Latin words should be in italics.
- The title must be given in boldface and centered (see below):

Diel variation in fish assemblages in tidal creeks in southern Brazil

1.2. Identification/affiliation

- Author's name(s) and address:
- "The author who is responsible for the intellectual content of the manuscript". (ABNT 6022).
- The identification should include the first author's full name (no abbreviations), and, in the line below, a brief curriculum qualifying the author in that specific field of knowledge plus a complete address. The same directions should apply to all the authors.
- The qualification/affiliation in the Field should include in the following order: Laboratory, College or School, Institute, and University.
- The address must be given below the qualification, must be given in the following order: number and street, borough, city, state, P.O. box, zip code (institution), and current author's e-mail.
- Leave one line blank between the authors' identification and their respective addresses.

Example:

Rodrigo Silva Santos.

Department of Zoology, Biosciences Institute, State University of São Paulo – UNESP.
Av. 24ª, nº 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil. sipauba@caunesp.unesp.br

Felipe Braga.

Department of Hydrobiology, Federal University of São Carlos – UFSCar.

Via Washington Luiz, Km 235, CP 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil.

braga@power.ufscar.br.

Please note the number of authors of an article is limited to a maximum of 10.

Should more people contribute to the article, they can be included in the acknowledgements.

2) Page 2

Abstract and keywords in English

2.1. Abstract

The abstract should be a single paragraph containing fewer than 250 words. It should be concise and indicate the content of the manuscript clearly stating the objective, the major findings, methodology, results, and the principal conclusions. The text should be typed in Times New Roman font, 12 point, with 1.5 spacing between lines. It should be preceded by the word "Abstract" and followed by the keywords.

The abstract should not include abbreviations and should be structured as follows: **Introduction, Material and Methods, Results and Conclusion.**

2.1.1. Keywords

A list of up to 5 words directly below the abstract and preceded by the Word "keywords" should be provided. Keywords should express the precise content of the article.

Note: Page 2 should contain a short running title in English, as a footnote and no longer than 45 characters, to be printed at the head of each page.

FOR ORIGINAL ARTICLE AND REVIEW ARTICLES

3) Page 3

Introduction, Material and Methods, Results and Conclusion

Leave one line blank between each topic

3.1. Introduction

- It should indicate briefly give the context of the study and the objective. It should clearly state how the research is related to others in the field studied. The reasons for undertaking it and what is new or important about this study should be clearly stated.
- The introduction should provide enough background information for the reader to understand the topic and contents of the paper,
- It should be preceded by the word "introduction" in boldface and followed by: (colon) and the text.

3.2. Materials and Methods

- A clear and thorough statement of the contents of the manuscript.
- The materials and methods used in the experiments should be reported in this section. It should mention the materials source (manufacturer, city, state, country), the supplier, the description of animals studied (number, sex, weight, age, species).
- Methods which have been previously described should be mentioned in brief only with proper references unless they have been modified in the present work.
- Newly introduced techniques should be described in detail to allow easy repetition.
- The text should be preceded by the words "Materials and Methods" in boldface and followed by: (colon).
- Tables, Figures, and Annexes and respective legends can be included when necessary. Hence they should be mentioned in the text because when the manuscript is submitted they come at the end of it.

3.3. Results

- Results should be clearly presented. Tables, figures, and annexes can also be used without data overlap.
- Tables, Figures, and Annexes and respective legends can be included when necessary. Hence they should be mentioned in the text because when the manuscript is submitted they come at the end of it.
- Phrases that express doubt such as "it seems to increase" or " it seems to be higher than" should be avoided.
- Non-significative results should not be used.
- The text should be preceded by the word "Results" in boldface and followed by: (colon).

3.4. Conclusion

- Should be concise. Hypothesis should be discarded. Consider other hypotheses when justified, but define them clearly.
- All the most relevant ideas that directly derive from the work should be precisely and concisely included. The conclusions should be related to the

objectives and give an answer to the hypothesis of the study. Results interpretation should be related to what has been mentioned previously in the manuscript.

- Information given previously in the introduction, materials and methods, and results can be cited again in the conclusions, but authors should not repeat detailed data that were previously presented.
- The text should be preceded by the word "Conclusions" in boldface and followed by: (colon).

CASE REPORT AND SHORT COMMUNICATION

For the case report category, the article should be structured as Introduction, Case Report and Discussion; if the item Conclusion is necessary, it should be inserted after; for Short Communications, it should be structured as Introduction, Short Communication and Discussions. The Introduction and Discussion sections should follow the criteria in items 3.1 and 3.4.

4) Page 4

Acknowledgements and References

4.1. Acknowledgements

- Acknowledgements such as technical assistance, financial support, scholarships, and collaborations can be included when appropriate and names should be cited with consent
- Acknowledgements are placed at the end of report pages before the references.
- It should be preceded by the word "Acknowledgements" in boldface and followed by: (colon).

4.2. References

References should conform to the guidelines established in ISO 690/2010, should be arranged alphabetically and present the name of all authors.

Examples of style for references:

4.2.1. Books

AUTHORS' SURNAME TYPED IN CAPITAL LETTERS, first name initials, year of publication, title, subtitle (if there is one), edition, followed by the publishing house and place of publication.

MOORE, K.L., PERSAUD, T.V.N. and TORCHIA, M.G., 2013. *The developing human clinically oriented embryology*. 9th ed. Canada: Elsevier Saunders.

4.2.2. Book Chapter

AUTHORS' SURNAME TYPED IN CAPITAL LETTERS, first name initials, year of publication, title, editors, book title, place of publication, publishing house and page number.

BURKE, G.L. and BELL, R.A., 2000. Trends in cardiovascular disease: incidence and risk factors. In: N.D. WONG, H.R. BLACK and J.M. GARDIN, eds. *Preventive cardiology*. New York: McGraw-Hill, pp. 21-46.

4.2.3. Thesis, Dissertations, and Monograph

AUTHORS' SURNAME TYPED IN CAPITAL LETTERS, first name initials, year of publication, title, subtitle (if there is one), place (city), institution, page number and notes.

ALMEIDA, G.A., 1995. *Resíduos de pesticida organoclorados no complexo esturinolagunar Iguape-cananéias e rio Ribeira e Iguape*. São Paulo: Instituto de Oceanografia; Universidade de São Paulo, 95 p. Dissertação de Mestrado em Oceanografia Física.

4.2.4. Journal Articles

AUTHORS' SURNAME TYPED IN CAPITAL LETTERS, first name initials, year of publication, article title, subtitle (if there is one), full title of the journal, volume, issue and page number.

ADALA, J.F. and CAMPOS, G.E.R., 2017. Effects of long-term physical exercise in the skeletal muscles of rats. *Journal of Morphological Sciences*, vol. 34, no. 4, pp. 226-231.

4.2.5. Articles Previously Presented at Scientific Conferences

AUTHORS' SURNAME TYPED IN CAPITAL LETTERS, first name initials, year of publication, title, editors, event name or title, event day, month and year, event place, place of publication, publishing house and page number.

KJESBU, O.S., 2010. The utility of gonad histology in studies of fish reproduction and the subsequent management of fisheries and ecosystems. In: D.M. WYANSKI and N.J.

BROWN-PETERSON, eds. *Proceedings of the 4th Workshop on Gonadal Histology of Fishes*, 16-19 June 2009, El Puerto de Santa María, Spain. El Puerto de Santa María, Spain: Fish Reproduction and Fisheries; American Fishery Society/Marine Fishery Section, pp. 11-14.

4.2.6. Patents

AUTHORS' SURNAME TYPED IN CAPITAL LETTERS, first name initials, title of invention, country, industrial patent number, day, month year and notes, if applicable.

PÓ, W. *Conversor eletrônico de lâmpadas*. Brasil. Patente industrial, no. 6500856. 15-05-1985.

4.2.7. Institutions and Commercial websites

INSTITUTIONS AND COMMERCIAL NAMES TYPED IN CAPITAL LETTERS, date [date of access (day, month, year)]. Available from: .

JOURNAL OF MORPHOLOGICAL SCIENCES, 2017 [viewed 07 December 2017].

Available from: <http://jms.org.br/index.php>

Figures, Charts, Tables and Graphs

- Figures, Charts, Tables and Graphs should be presented clearly.
- They should be typed in Times New Roman font, 12 point, with 1.5 spacing between lines properly inserted and numbered sequentially into the text.
- Figures, Charts, Tables and Graphs should be as close as possible of the text in which they were mentioned.
- They should be properly titled and have legends.
- Images should have scan resolution of 300 dpi (81 mm ou 957 pixels); (167 mm ou 1972 pixels).

Units of Measure

- Use only SI units (International System of Units);

Reference citations

- All references should be cited in the text indicating the author's surname followed by the year of publication.
Example: (Kjesbu, 2008) or Kjesbu (2008)
- For references with two authors, both surnames should be cited joined by the word "and".
Exemple: (Adala and Campos, 2017) or Adala and Campos (2017)
- For references with more than two authors, text citations should be shortened to the primary name followed by "et al.". Example: (Moore et al., 2013) or Moore et al. (2013)

Appendix

- Complement of the manuscript. Should be submitted at the end of the manuscript after the figures, charts, tables, and graphs.

Annex

Complement citation of the manuscript. Should be submitted at the end of the manuscript after the figures, charts, tables, and graphs.