

JÉSSICA MATHEUS LEITÃO

**MODELO EXPERIMENTAL PARA CRIAÇÃO
INTRA-ÚTERO DE FISSURAS LABIOPALATINAS
EM RATOS**

CAMPINAS

Unicamp

2008

JÉSSICA MATHEUS LEITÃO

**MODELO EXPERIMENTAL PARA CRIAÇÃO
INTRA-ÚTERO DE FISSURAS LABIOPALATINAS
EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia, área
de concentração Pesquisa Experimental

ORIENTADOR: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L535m Leitão, Jéssica Matheus
 Modelo experimental para criação intra-útero de fissuras
labiopalatinas em ratos / Jéssica Matheus Leitão. Campinas, SP :
[s.n.], 2008.

Orientador : Lourenço Sbragia Neto
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fissura palatina. 3. Fenda labial. 4. Feto. 5. Ratos – Estudos
experimentais. I. Sbragia Neto, Lourenço. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Experimental model for intrauterine cleft lip and palate in rats

Keywords: • Cleft pallate
• Cleft lip
• Fetus
• Rats, experimental model

Titulação: Mestre em Cirurgia
Área de concentração: Pesquisa experimental

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto
Prof. Dr. Antonio Gonçalves Oliveira Filho
Prof. Dr. Antonio Aldo Melo Filho

Data da defesa: 17 - 12 - 2008

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Jéssica Matheus

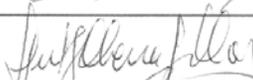
Orientador: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Membros:

1. Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto -



2. Prof. Dr. Antonio Gonçalves Oliveira Filho -



3. Prof. Dr. Antônio Aldo Melo Filho -



Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17/12/2008

DEDICATÓRIA

*Ao meu **marido**, que tanto admiro*

*À minha **filha**, que me ensinou o*

real sentido da palavra AMOR.

À Deus

Por me propiciar tamanha força e perseverança.

Ao orientador, Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Por me permitir participar de seus estudos, por compartilhar seu conhecimento e trabalho.

À minha família

Pelo apoio e compreensão.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Violin Pereira

Por permitir o uso de seu laboratório e iluminar o caminho que muitas vezes parecia sem saída.

À todos do laboratório de histologia e embriologia do Instituto de Biologia

Em especial, ao Juvani pela sua enorme paciência e dedicação.

Às queridas amigas do laboratório Frances, Azize e Márcia.

Pela amizade em tempos de alegria e tristeza, por todas as orações e apoio, inclusive pelas aulas no micrótomo e no fotomicroscópio.

À Pós-graduação e ao Departamento de Cirurgia

Pelo auxílio sempre presente.

O tempo não pára!
Só a saudade é que faz as coisas
pararem no tempo...

Mário Quintana

	PÁG.
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	18
2- OBJETIVOS	23
3- MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1- Avaliação da Comissão de Ética na Experimentação Animal	26
3.2- Animais	26
3.3- Constituição dos Grupos Experimentais	26
3.4- Procedimento Cirúrgico	27
3.5- Coleta de Dados	30
3.6- Análise Macroscópica	31
3.7- Análise Histológica	31
4- ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5- RESULTADOS	34
5.1- Resultado Morfológico	35
5.2- Resultado Histológico	36
6- DISCUSSÃO	41
7- CONCLUSÃO	47
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
9- APÊNDICES	55
Apêndice 1- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos FLP operados no DG 17,5	56

Apêndice 2- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos Controle operados no DG 17,5.....	57
Apêndice 3- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos SHAM operados no DG 17,5.....	58
Apêndice 4- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos FLP operados no DG 18,5.....	59
Apêndice 5- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos Controle operados no DG 18,5.....	60
Apêndice 6- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos SHAM operados no DG 18,5.....	61
Apêndice 7- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos FLP operados no DG 19,5.....	62
Apêndice 8- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos Controle operados no DG 19,5.....	63
Apêndice 9- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos SHAM operados no DG 19,5.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

FLP	Fissura Labiopalatina
FL	Fissura Labial
FP	Fissura Palatina
IG	Idade Gestacional
DG	Dias Gestacionais
N	Número
C	Controle
S	SHAM

LISTA DE NOTAÇÕES

min	Minuto
%	Porcentagem
°C	Grau Celcius
n°	Número
®	Marca registrada
µm	Micrômetros
mm	Milimetro
ml	Mililitro
mg	Miligrama
g	Gramma
Kg	Quilogramas
G	(Gauge) Calibre de agulha

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Pesos corporais (g) das ratas prenhes de acordo com os dias gestacionais.....	35
Tabela 2- Peso médio (g) corporal dos fetos de acordo com os DG.....	35
Tabela 3- Avaliação macroscópica da FLP dos fetos de acordo com os DG.....	36
Tabela 4- Descrição das características histológicas das FLP de acordo com diferentes IG.....	37

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Rata grávida anestesiada antes da cirurgia e a posição fetal para a realização da FLP.....	28
Figura 2- Passos cirúrgicos na seqüência da confecção da FLP.....	29
Figura 3- Passos cirúrgicos na seqüência da confecção da FL (SHAM)....	30
Figura 4- Faces fetais gerais ao nascimento (21,5 dias) dos ratos aos 17, 5 dias de confecção das FLP.....	37
Figura 5- Fotomicrografias fetais gerais ao nascimento (21,5 dias) dos ratos aos 17, 5 dias de confecção das FLP.....	38
Figura 6- Faces fetais gerais ao nascimento (21,5 dias) dos ratos aos 18, 5 dias de confecção das FLP.....	38
Figura 7- Fotomicrografias fetais gerais ao nascimento (21,5 dias) dos ratos aos 18, 5 dias de confecção das FLP.....	39
Figura 8- Faces fetais gerais ao nascimento (21,5 dias) dos ratos aos 19, 5 dias de confecção das FLP.....	39
Figura 9- Fotomicrografias fetais gerais ao nascimento (21,5 dias) dos ratos aos 19,5 dias de confecção das FLP.....	40

RESUMO

A fissura labiopalatina (FLP) é a anormalidade congênita mais comum da face. As fissuras labiais (FL) e palatinas podem ser associadas, porém são etiologicamente diferentes. Essas malformações levam a um aspecto facial anormal e à fala defeituosa. Modelos animais têm sido utilizados para estudar a embriogênese e a patogênese das FLP por meio da criação cirúrgica fetal em animais de grande e pequeno porte. O modelo experimental em fetos de ratos já foi testado e possui as vantagens de ter menor custo, menor tempo de gestação, maior disponibilidade de fetos por gravidez (8 a 12 fetos) e menor índice de abortamento e de trabalho de parto prematuro. Embora o modelo de rato tenha sido testado, a idade gestacional (IG) ideal para a criação do defeito não está claramente padronizada.

O objetivo deste estudo foi validar o modelo cirúrgico de FLP em fetos de ratos determinando a melhor idade gestacional.

Ratas Sprague-Dowley grávidas (n=16) em três diferentes idades gestacionais (17,5, 18,5 e 19,5 dias de gestação) (termo=22 dias) foram submetidas à laparotomia, o focinho do feto escolhido para o defeito foi exposto da cavidade uterina e com um punch dermatológico de 3mm demarcou-se no lábio superior o ponto médio entre a linha média facial e a comissura labial esquerda. Após a demarcação do *punch*, criou-se a FLP cortando um triângulo externamente à circunferência da demarcação do *punch*. Após confecção da FLP, retornou-se o feto à cavidade do útero, fechando-a pela sutura previamente realizada. Cada feto com FLP foi comparado a um feto controle (C) e outro SHAM (S). No dia 21,5 de gestação, os fetos foram retirados do útero foram pesados, fotografados e sacrificados, os crânios foram removidos e fixados em solução fixadora de formol 10% e corados para H&E em cortes de 5µm de espessura para a caracterização dos tecidos e verificação da existência da FLP e possível reepitelização do lábio operado.

Nos dias 17,5, 18,5 e 19,5 foram operadas respectivamente 4, 7 e 5 ratas. O número de fetos considerados foi respectivamente 15 FLP, 15 C e 15 SHAM. Na avaliação macroscópica das FLP dos dias 17,5, 18,5 e 19,5 foi observado depressão na região do defeito, assimetria e retração labial.

O padrão descritivo da histologia das FLP demonstrou ausência de interrupção completa do lábio operado e regeneração parcial da fissura no dia 17,5, ausência de interrupção completa do lábio operado e regeneração parcial das bordas das fissuras no dia 18,5 e no

dia 19,5 completa interrupção do lábio e bordas da FLP afastadas. Nas três idades gestacionais selecionadas todos os fetos apresentaram FLP sem diferença macroscópica aparente. Entretanto, na avaliação histológica, verificou-se que na idade gestacional de 19,5 dias os fetos apresentaram FLP com maiores semelhanças às fissuras que ocorrem naturalmente ou por meio de indução não-cirúrgica. O modelo mostrou-se factível e a melhor idade gestacional para a confecção das FLP em ratos foi a de 19,5 DG.

ABSTRACT

Cleft lip and palate (CLP) are the most frequent congenital defects of the face. CLP can occur in association, although they don't share the same etiology. These defects may impose face abnormalities and speech problems. Animal models have been used to study embryogenesis and pathogenesis of cleft lip and palate and surgical cleft correction in fetuses of both large and small animals have been described. Fetal rat model has been validated and has the advantages of lower cost, shorter gestation, more fetuses per pregnancy and less abortion and premature labor. Although rat model is in use, the ideal gestational day for cleft correction has never been studied.

This study aimed to validate the surgical model for CLP in rat fetuses, determining the ideal gestational day. Pregnant Sprague-Dowley rats (n=16) underwent laparotomy for fetal exposure in three gestational moments (day 17.5, 18.5 and 19.5), being term on 22nd day. Fetal head was exposed and a 2mm punch used to mark the superior lip between midline and left commissure and then CLP created laterally through a triangular excision. For every operated fetus one control (C) and one Sham (S) fetus were present. On day 21.5, fetuses were removed, photographed, weighed and euthanized. Heads were fixed in formaline and 5µm slices stained with hematoxylin eosin for cleft visualization and analysis of reepithelization.

A total of 45 fetuses were included, being 15 CLP, 15 C and 15 S. Macroscopic analysis of CLP revealed depression at the defect, lip retraction and asymmetry.

Microscopy demonstrated on day 17.5 absence of lip interruption and partial wound regeneration. On day 18.5 lip interruption and partial wound regeneration were identified. On day 19.5 there was complete lip interruption as well as reepithelization of wound borders.

All fetuses presented same macroscopic findings, independent of gestational day of operation. Differently, histology demonstrated that fetuses operated on day 19.5 presented CLP most similar to those occurring spontaneously or induced. In this study we confirmed model feasibility and demonstrated that the best gestational age to perform CLP is on day 19.5 of gestation.

1- INTRODUÇÃO

As FLP são os defeitos congênitos mais comuns da face, levando a um aspecto facial deformado e à fala defeituosa. Segundo Moore e Persaud (2000), as fissuras labiais e palatinas podem ser associadas, porém são etiologicamente diferentes e são classificadas embriologicamente em dois grupos: a) fissuras envolvendo o lábio superior e a parte anterior da maxila, com ou sem envolvimento de partes das regiões remanescentes dura ou mole do palato e b) fissuras envolvendo as regiões dura e mole do palato.

As fissuras anteriores incluem fissura labial, com ou sem fissura da parte alveolar da maxila, e resultam de uma deficiência do mesênquima na proeminência maxilar (uni ou bilateral) e do seguimento intermaxilar. As fissuras de lábio superior variam desde depressões pequenas da borda vermelha do lábio até fissuras maiores, que se estendem para dentro do assoalho nasal (Moore e Persaud, 2000).

As fissuras posteriores incluem fissuras do palato secundário ou posterior que se estendem pelas regiões dura e mole do palato até a fossa incisiva, separando a parte anterior e posterior do palato. Resultam de distorções do crescimento dos processos palatinos laterais que impedem sua migração e fusão medial.

As fissuras palatinas (FP) podem envolver apenas a úvula ou estender-se pelas regiões mole e dura do palato. As fissuras do palato posterior localizam-se atrás da fossa incisiva e são derivadas da ausência de fusão das massas mesenquimais dos processos palatinos laterais entre si e com o septo nasal. As fissuras da parte anterior e posterior do palato são secundárias a defeitos de fusão nos processos palatinos laterais com o mesênquima do palato primitivo e com o septo nasal (Moore e Persaud, 2000).

Existem várias classificações das FL e FLP, sendo a classificação de Spina et al. (1972) amplamente utilizada no Brasil. Nela as fissuras são classificadas tendo como ponto de referência o forame incisivo. Elas podem ser denominadas pré-forame incisivo, pós-forame incisivo e trans-forame incisivo.

As fissuras pré-forame incisivo acometem o lábio com envolvimento alveolar, denominadas completas, ou sem envolvimento alveolar, incompletas. As fissuras pós-forame incisivo acometem o palato, em geral são medianas e podem envolver palatos

duro e mole (completa) ou apenas palato duro ou palato mole (incompleta). As fissuras trans-forame situam-se desde o lábio, arcada alveolar e palato (duro ou mole) e podem ser uni ou bilateral. Fissuras raras como submucosas ou ocultas são classificadas como pós-forame incisivo.

A ocorrência de fissuras orais é de 1:750 nascidos vivos, sendo o segundo defeito congênito mais comum, depois dos defeitos do tubo neural (Northrup e Volcik, 2000). As FL com ou sem FP ocorrem com uma distribuição racial previsível, acometendo 0,3:1000 afro-americanos, 1:1000 caucasianos, 2,1:1000 japoneses, e 3,6:1000 nativos americanos. Já as FP isoladas ocorrem em cerca de 1:2000 nascidos vivos, sem preferência racial (Strong e Buckmiller, 2001).

Apesar de bons resultados estéticos e funcionais serem rotineiramente encontrados no reparo pós-natal das FL e FP, procedimentos cirúrgicos consecutivos podem resultar em formação de cicatriz e retardo no crescimento do terço médio da face (Longaker, 1990).

Nas últimas duas décadas, cirurgias intra-útero têm sido estudadas em modelos experimentais de mamíferos de pequeno e grande porte (Papadopulos, 2005). Em humanos são indicadas em casos especiais para correção de defeitos congênitos fetais como hérnia diafragmática, hidrocefalia e meningomielocele (Khan et al., 2007; Sutton, 2008). Essa modalidade terapêutica apresenta problemas limitantes como parto prematuro, morte fetal e exposição cirúrgica do feto (Harling et al., 2003).

Com o avanço de novos instrumentos para embrioscopia e fetoscopia minimamente invasiva, o número de complicações após intervenção fetal vem diminuindo, podendo futuramente, após estudo em modelos animais, ser aplicável em enfermidades não letais (Deprest et al., 2006). Portanto, esta modalidade terapêutica pode tornar-se uma realidade clínica no futuro das cirurgias de defeitos craniofaciais (Papadopulos et al., 2005).

Modelos animais vêm sendo utilizados para estudar a embriogênese e patogênese das FLP, incluindo o desenvolvimento das anomalias resultantes em fissuras, assim como suas deformidades secundárias. Mais recentemente, os estudos consistem na

manipulação de animais com criação do defeito utilizando-se teratógenos ou por meio da criação cirúrgica fetal da FL e FLP (Sullivan-Jones, 1992; Harling et al., 2003).

Dentre os animais utilizados para o estudo de FL ou FLP intra-útero estão as ovelhas (Hedrick et al., 1996), coelhos (Stern et al., 1992), ratos (Salazar, 1988) e camundongos (Hallock, 1985).

No modelo experimental de confecção e reparo de FLP em ovelhas foi observado discreto alargamento da narina no lado operado e deslocamento inferior do septo nasal, completa reepitelização do lábio com regeneração da musculatura, ausência de cicatriz no lábio reparado e crescimento simétrico da maxila (Estes et al., 1992).

No modelo experimental em coelhos foi observada mínima assimetria da narina, margens da pele e mucosa completamente epitelizadas com regeneração das células musculares, ausência de cicatriz no lábio e comprimento da maxila semelhante ao do grupo controle não fissurado (Dodson et al., 1991).

Estudos em ratos e camundongos submetidos à confecção e reparo de FL evidenciaram encurtamento e deslocamento do filtro labial em direção ao lado reparado, continuidade do epitélio e do mesênquima e lábios contínuos sem cicatriz com discreta assimetria (Salazar, 1988; Hallock, 1985).

O modelo experimental de fetos de rato para confecção de defeitos fetais possui as vantagens de ter menor custo, tempo de gestação curto (22 dias), maior disponibilidade de fetos por gravidez (8 a 12 fetos), índice de abortamento e de trabalho de parto prematuro baixo e já ter sido testado anteriormente (George e Fuh, 2003; Bittencourt et al., 2006).

O tratamento cirúrgico pós-natal de FL ou FLP apresenta resultados estéticos favoráveis ao paciente, mas pode estar associado à existência de cicatriz e resultar em retrusão da maxila ou do terço médio da face, devido à formação de tecido cicatricial secundária à dissecação de tecido mole (Oberge et al., 1995; Farmand, 2002).

Stelnicki et al. (1997) demonstraram que a cicatrização fetal é semelhante à neonatal, entretanto possui as vantagens de ser mais rápida e de não apresentar tecido cicatricial macro e microscopicamente.

A velocidade e a extensão da cicatrização intra-útero varia dentre as diferentes espécies. Em ratos, a completa reepitelização de feridas na face seguida da cicatrização do mesênquima ocorre em 24 horas, enquanto em macacos leva 20 a 30 dias (Hallock, 1985).

Oberg et al. (1995) repararam FL intra-útero em camundongos aproximando as bordas da fissura resultando em crescimento normal do lábio, demonstrando o excelente grau de regeneração do tecido sem cicatrização.

Considerando as vantagens do processo de cicatrização fetal nos estudos clínicos e experimentais, a melhor qualidade do diagnóstico e a maior segurança à mãe e ao feto, a correção dos defeitos intra-útero poderá ser uma opção ao tratamento convencional mesmo quando realizado em condições não-letais, como FL ou FLP (Papadopulos et al., 2005).

Neste sentido, a correção intra-útero da FL ou FLP também poderá resultar em prevenção ou minimização das inúmeras implicações do defeito facial como atraso do desenvolvimento motor global, de linguagem, social e cognitivo (Neiman e Savage, 1997).

O modelo experimental em fetos de ratos já foi testado e possui as vantagens de ter menor custo, menor tempo de gestação, maior disponibilidade de fetos por gravidez (8 a 12 fetos) e menor índice de abortamento e de trabalho de parto prematuro. Embora o modelo de rato tenha sido testado, a idade gestacional (IG) ideal para a criação do defeito não está claramente padronizada.

Portanto, a validação e a utilização do modelo cirúrgico de FLP em fetos de ratos poderão trazer subsídios para compreensão da cicatrização fetal e contribuir para o tratamento do defeito intra-útero.

2- OBJETIVOS

Validar o modelo experimental fetal de FLP determinando a melhor idade gestacional (IG) para confecção do defeito utilizando como parâmetros características macro e microscópicas das lesões criadas.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Avaliação da Comissão de Ética na Experimentação Animal

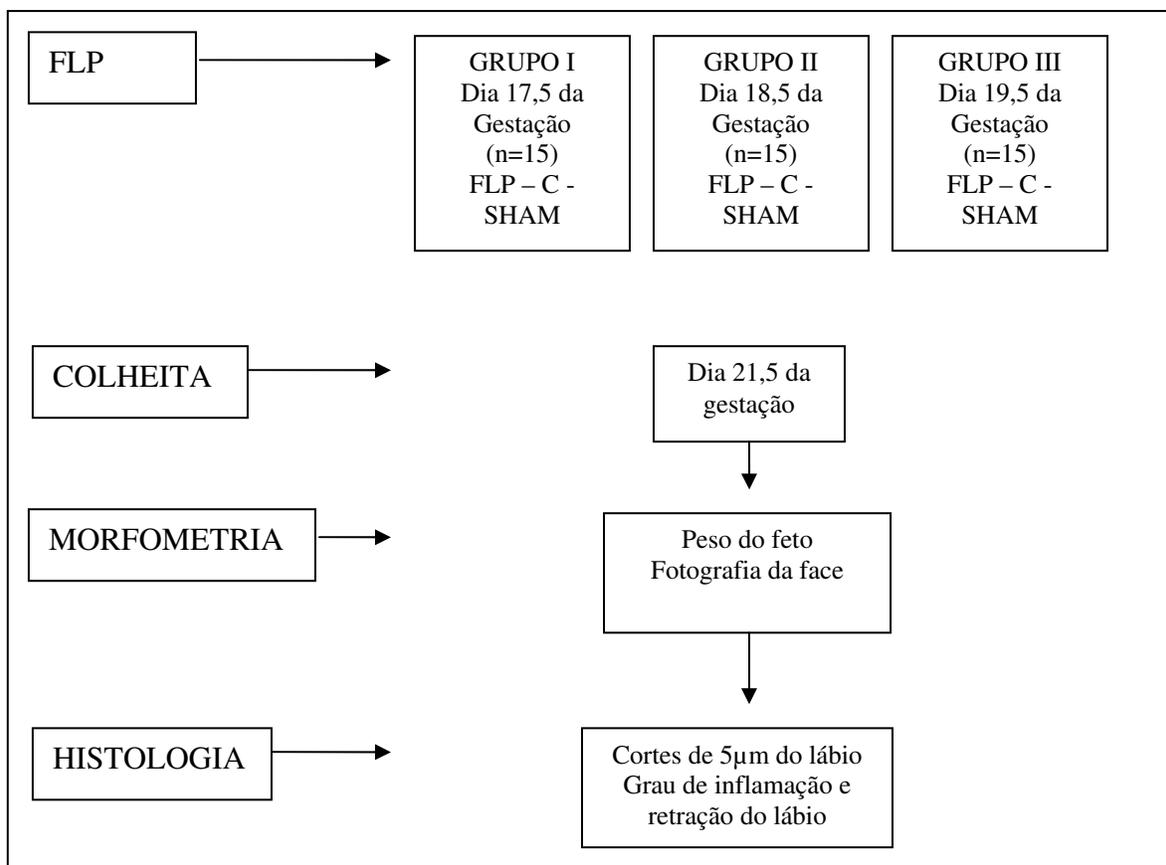
O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA-IB-UNICAMP) sob protocolo número 685-1.

3.2- Animais

Ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas adultas com peso ao redor de 370g provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB - UNICAMP, Campinas), foram mantidos em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro), temperatura (média de 23°C), umidade relativa próxima de 55% e receberam água e ração para roedores à vontade. Os acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo, colocando-se duas fêmeas na caixa do macho, e o dia zero de prenhes foi determinado pela presença de espermatozóides em esfregaços vaginais de fêmeas em estro (gestação do rato = 22 dias).

3.3- Constituição dos Grupos

Três grupos de 15 fetos da raça Sprague –Dowley denominados GRUPOS I, II e III foram submetidos à confecção de FLP unilateral à esquerda em diferentes IG, respectivamente dias 17,5, 18,5 e 19,5 da gestação da rata (termo = 22 dias).



3.4- Procedimento Cirúrgico

Na data prevista para a cirurgia, conforme a IG previamente estabelecida e após aclimatação de 24 horas no laboratório, as ratas Sprague-Dowley grávidas foram submetidas a anestesia geral com injeção intramuscular de ketamina base- 50mg/ml (Ketamina[®] - Pfizer do Brasil) associada com xilazina 10mg/ml (Rompum[®]- Bayer do Brasil Ltda) na dose de 0,6 ml por animal via intra-muscular aplicado na musculatura lateral da coxa com seringa de insulina e agulha de calibre 20G. Esta composição anestésica (180mg/kg de ketamina/ 1,25 mg/kg de xilazina) manteve o animal sob anestesia profunda durante um período de três horas e o pós-operatório transcorreu de maneira indolor durante o período compreendido entre 6 e 12 horas.

O abdome foi submetido à tricotomia cuidadosa com tosquadeira elétrica Sunbeam[®]. Após assepsia com solução aquosa de clorohexidina (Chlorohex[®]) e colocação de campos estéreis, realizou-se laparotomia mediana e a seguir a exposição do útero.

Os fetos foram contados da região proximal para distal em relação ao colo do útero, dividido em lado direito e esquerdo. O primeiro e o último feto de cada corno uterino foram desprezados por apresentarem grande diferença de tamanho e peso em relação aos demais. O segundo feto, contado a partir do istmo do útero direito, foi considerado o primeiro feto da numeração, sendo submetido à FLP, o feto seguinte controle, seguido do feto SHAM. A numeração e a decisão cirúrgica seguiram continuamente. Esse cuidado prévio da numeração dos fetos permite que não haja escolha na decisão do feto a ser operado (Figura 1).

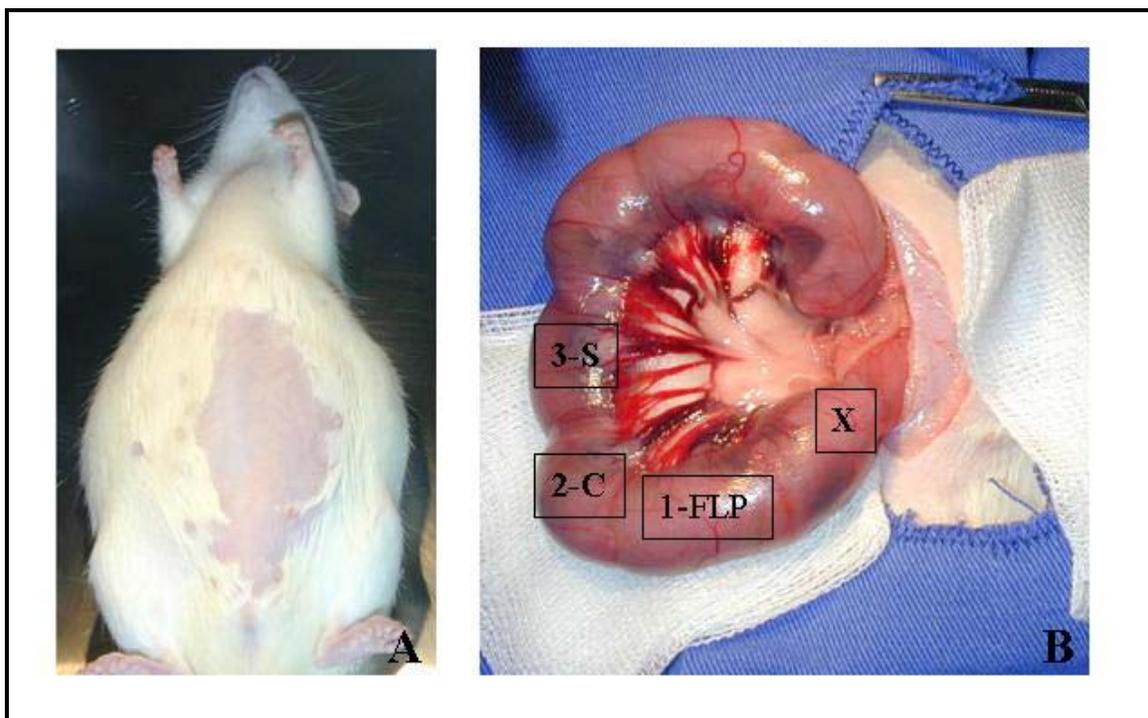


Figura 1- (A) Representa a rata prenhe anestesiada antes da cirurgia e (B) a posição fetal para a realização da FLP, C (controle) e S (SHAM).

Sob microscopia óptica (microscópio Nikon com ampliação 2,5X), foi realizada sutura em bolsa com fio de Prolene 6-0 na parede uterina e em seguida o útero foi aberto em suas 2 camadas (muscular e membrana amniótica). Para confecção da FLP apenas o focinho do feto escolhido foi exposto e então realizado um *punch* dermatológico de 2 mm na linha média entre o lábio superior e a maxila anterior alveolar e entre a linha média e a

comissura labial esquerda. A lesão de forma triangular foi realizada com micro-tesoura tendo como base os cortes da lesão externa à circunferência da demarcação do *punch* e o tecido da lesão foi então extraído (lesão excisional).

Após a confecção da FLP, a focinho do feto foi retornado à cavidade do útero e a histerectomia fechada pela sutura em bolsa previamente realizada (Figura 2).

Os fetos SHAM tiveram o mesmo procedimento até a exposição do focinho, mas ao invés de ser realizada a FLP foi realizada uma incisão vertical de 2 mm entre a linha média e a comissura labial esquerda sem extração de tecido (Figura 3).

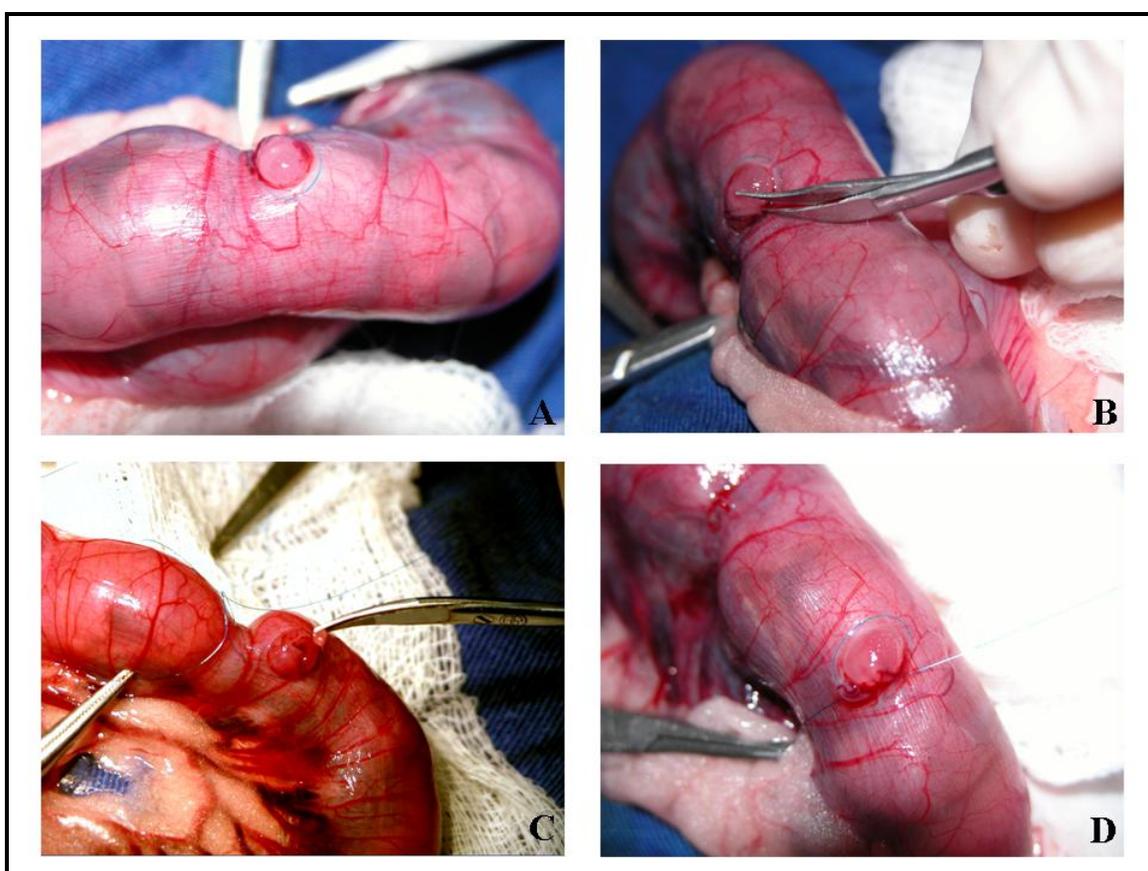


Figura 2- Representa os passos cirúrgicos na seqüência da confecção da FLP.

A, Sutura em bolsa na parede uterina, útero aberto em suas duas camadas, focinho do feto exposto. **B**, Lesão triangular realizada com micro-tesoura. **C**, Extração do tecido. **D**, Retorno do feto à cavidade do útero e fechamento da histerectomia pela sutura em bolsa previamente realizada.

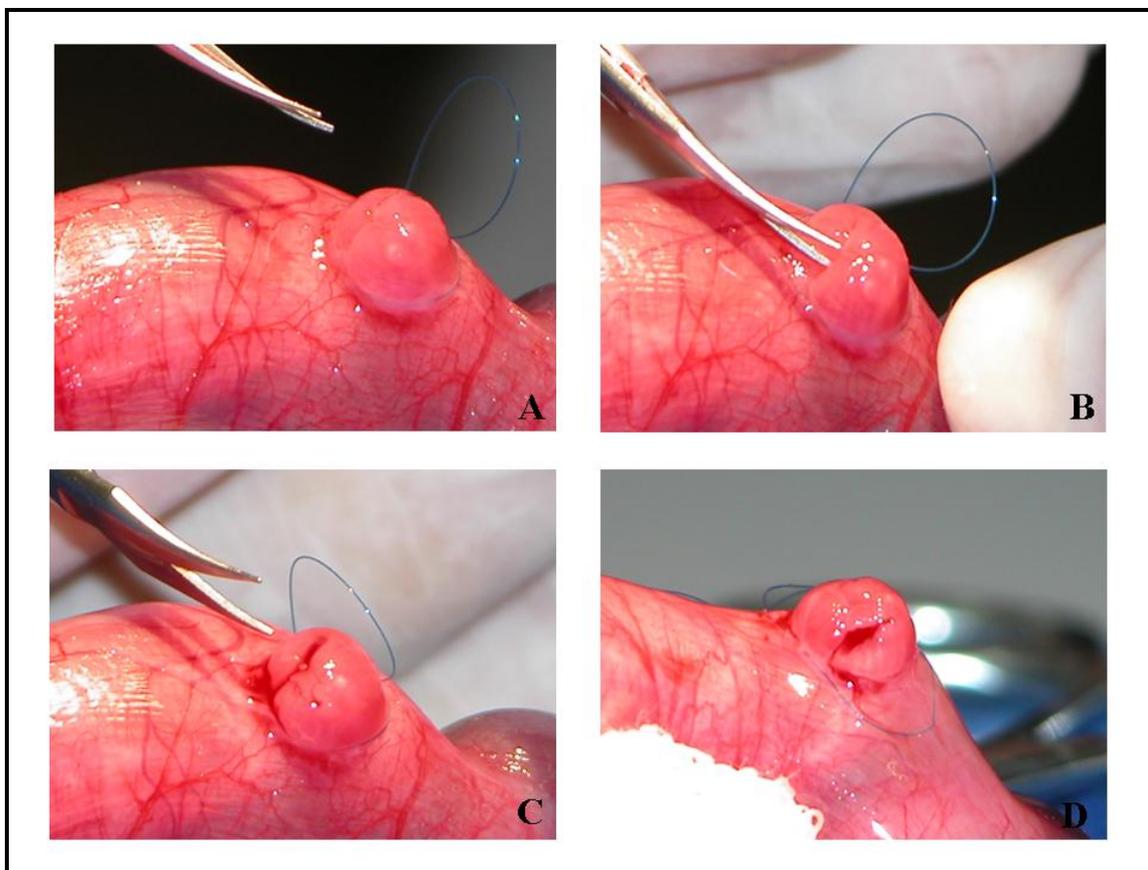


Figura 3- Representa os passos cirúrgicos na seqüência da confecção da FL (SHAM)

A, Sutura em bolsa na parede uterina, útero aberto em suas duas camadas, focinho do feto exposto. **B**, Posicionamento do feto para abertura do focinho. **C**, Incisão vertical de 2 mm entre a linha média e a comissura labial esquerda realizada com micro-tesoura. **D**, Retorno do feto à cavidade do útero e fechamento da hysterectomia pela sutura em bolsa previamente realizada.

3.5- Coleta de Dados

No dia 21,5 de gestação, a rata foi novamente anestesiada (mesma dose previamente descrita) e submetida à operação cesariana. Os fetos foram retirados do útero, pesados em balança de precisão, fotografados de frente e perfil com câmara Nikon Coolpix® modelo 990 e imediatamente sacrificados por meio de punção suboccipital após a anestesia intra-peritoneal de 0,3 ml da mesma droga da anestesia materna. As ratas, ainda

sob anestesia, foram pesadas e sacrificadas por ex-sanguinação. Os pesos das ratas e dos fetos foram anotados. Os crânios dos fetos foram removidos e imersos em solução fixadora de paraformaldeído 4%.

3.6- Análise Macroscópica

Na análise macroscópica, foram consideradas as seguintes características do lábio superior: depressão, assimetria e retração.

Foi considerada depressão a falha no vermelhão labial com continuidade do lábio.

A assimetria foi caracterizada pela falta de simetria entre os lados fissurado e não fissurado do lábio superior.

A retração foi caracterizada pelo encurtamento do lábio fissurado em sentido medial e cranial.

3.7- Análise Histológica

Após a fixação em solução de paraformaldeído 4% as amostras foram desidratadas em um gradiente crescente de etanol, sendo 70 %, 80 %, 90 % e 100 % respectivamente, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo Leica® - Modelo RM 2145, com espessura de 5 µm e posteriormente coletados em lâminas histológicas pré-tatadas com Poli-L-lisina para melhor aderência. Os cortes foram corados por Hematoxilina de Erlich/Eosina (H/E) para identificação histológica.

Os cortes histológicos foram fotografados utilizando o foto-microscópio Nikon Eclipse E800, com ampliação de 20 vezes e arquivadas em formato digital.

Na avaliação histológica foram considerados a presença de FLP completa ou incompleta, presença de regeneração, presença de depressão, características do epitélio e tecido conjuntivo e de células inflamatórias presentes na lesão.

4- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos dos pesos fetais e maternos foram comparados entre os grupos FLP, C e SHAM entre si e entre os dias gestacionais (DG) pelo método de ANOVA com pós-teste Tukey-Kramer considerando as diferenças significativas para $p \leq 0,05$.

5- RESULTADOS

5.1- Resultado Morfológico

Do total de 19 ratas operadas, 16 completaram o estudo. Uma rata morreu no pós-operatório com 18,5 DG devido a problema anestésico e duas abortaram após a realização da FLP no dia 17,5 e 18,5 DG. O peso médio da ratas operadas encontra-se na tabela 1. Não houve diferença estatística entre os pesos das ratas operadas ($p > 0.05$).

Tabela 1- Representa o peso médio (g) corporal e o desvio padrão das ratas operadas.

DG	N	Peso e Desvio Padrão
17,5	4	350 ± 40
18,5	7	360 ± 14
19,5	5	380 ± 21
21,5	16	391 ± 11

O peso médio dos fetos operados ao nascimento de acordo com o DG encontra-se na tabela 2. Não houve diferença estatística entre os pesos dos fetos ao nascimento comparando entre FLP, C e SHAM e entre os DG ($p > 0.05$).

Tabela 2- Representa o peso médio (g) corporal dos fetos de acordo com os DG.

DG	FLP	C	SHAM	P
17,5	4,97 (± 0,80)	5,53 (± 0,81)	5,51 (± 0,46)	$p > 0.05$
18,5	5,43 (± 0,85)	5,35 (± 0,65)	5,19 (± 0,82)	$p > 0.05$
19,5	5,33 (± 0,72)	5,48 (± 0,89)	4,95 (± 0,70)	$p > 0.05$

Na avaliação macroscópica dos 15 fetos do Grupo I (17,5 DG) observamos: 13 o apresentaram depressão na região da confecção da fissura, 13 apresentaram assimetria labial e sete apresentaram retração labial.

Na avaliação macroscópica dos 15 fetos do Grupo II (18,5 DG) observamos: 15 apresentaram depressão na região da confecção da fissura, 12 apresentaram assimetria labial e 10 apresentaram retração labial.

Na avaliação macroscópica dos 15 fetos do Grupo III (19,5 DG) observamos: 15 apresentaram depressão na região da confecção da fissura, 14 apresentaram assimetria labial e nove apresentaram retração labial no local da fissura (Tabela 3).

Tabela 3- Avaliação macroscópica da FLP dos fetos de acordo com os DG.

DG	Depressão	Assimetria	Retração
17,5	87%	87%	47%
18,5	100%	80%	67%
19,5	100%	93%	57%

5.2- Resultado Histológico

Na avaliação histológica dos fetos IG de 17,5 foi observado a FLP parcialmente regenerada, apresentando ainda depressão no local da lesão. O epitélio das bordas da lesão migraram parcialmente em direção à região da fissura confeccionada; entretanto foi observado que o epitélio regenerado era mais fino em relação ao epitélio controle. Também foi notada a presença de células mesenquimais dentro da lesão na delicada conexão com a camada de tecido conjuntivo, entretanto em menor quantidade quando comparado ao tecido não lesado. Havia presença de pouco infiltrado de células inflamatórias, neutrófilos na maioria (Figura 5).

Na avaliação histológica dos fetos de IG de 18,5 foi observada a FLP parcialmente regenerada, com profunda depressão no local da lesão. A região da fissura confeccionada permaneceu não epitelizada. A evidência da lesão foi limitada ao aumento significativo do número de células, feixes de colágenos finos e vascularização. Não foi observada evidência de infiltrado de células inflamatórias (Figura 9).

Na avaliação histológica dos fetos de IG de 19,5 foi observado que a FLP permaneceu aberta com bordas da pele e mucosa não epitelizadas. Foi notado que o tecido conjuntivo continha quantidades variáveis de eritrócitos, coágulo de fibrina e ausência de células indicativas de inflamação aguda (Figura 8). A Tabela 4 representa a descrição das características histológicas das FLP de acordo com as diferentes IG.

Tabela 4- descrição das características histológicas das FLP de acordo com diferentes IG.

DG	17,5	18,5	19,5
FLP	Incompleta	Incompleta	Completa
Regeneração	Presente	Presente	Ausente
Depressão	Presente	Presente	Ausente
Característica	Epitélio fino e regenerado	Epitélio fino, regenerado com vascularização e colágeno	Epitélio regenerado e tecido conjuntivo
Inflamação	Presente	Ausente	Ausente

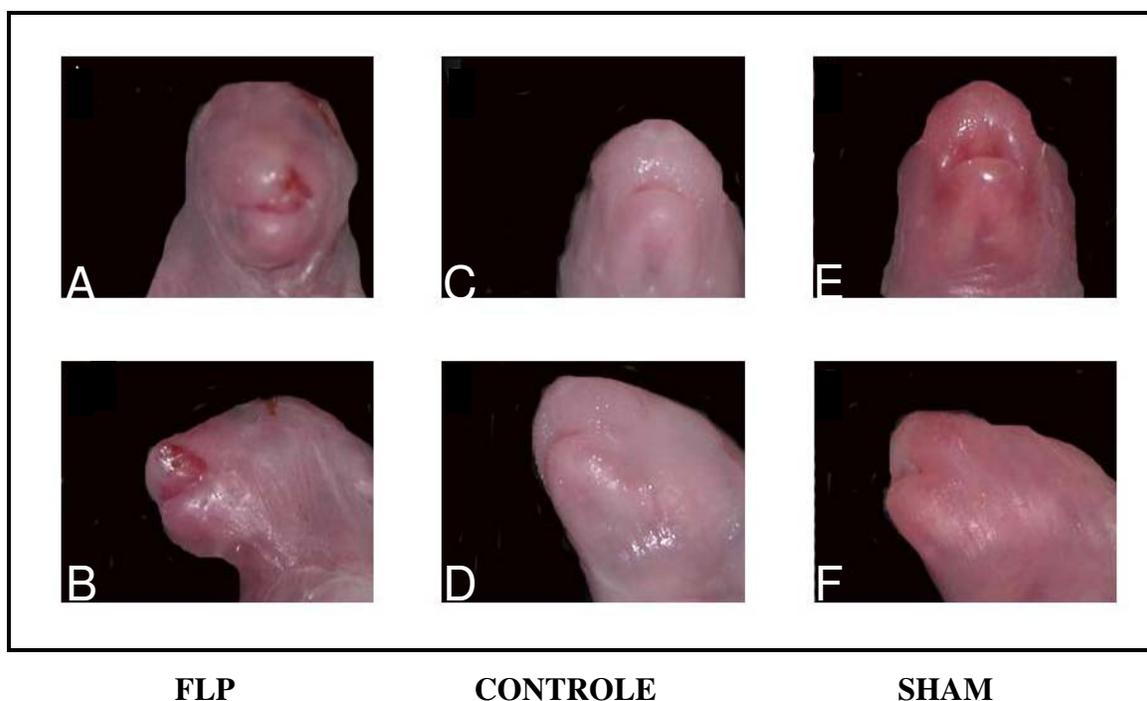


Figura 4- Representa as faces fetais gerais ao nascimento (21,5 dias) dos ratos aos 17,5 dias de confecção das FLP. *A e B*, Feto com FLP caracterizada pela depressão, assimetria e retração labial; *C e D*, Feto Controle; *E e F*, Feto SHAM.

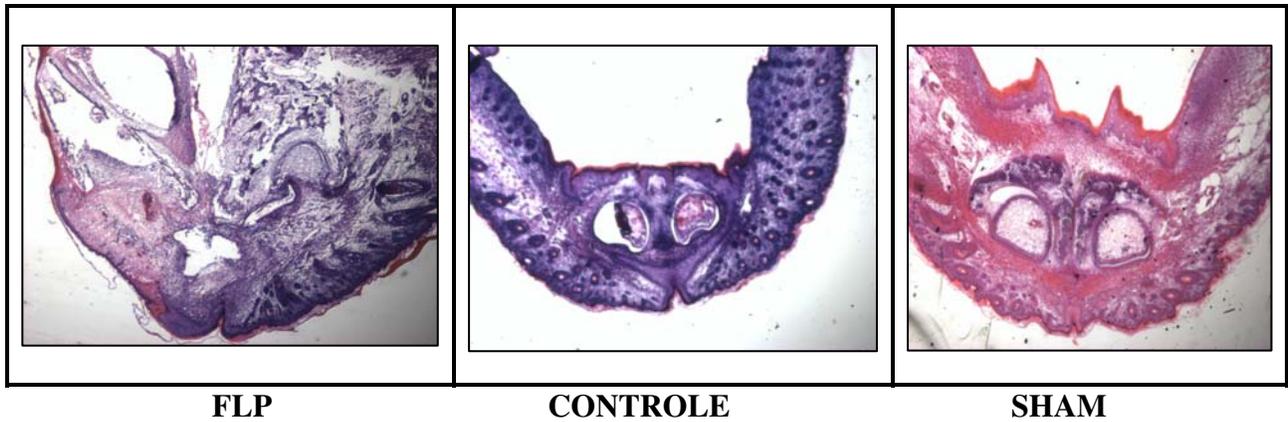


Figura 5- Representa as fotomicrografias gerais dos lábios fetais ao nascimento (21,5 dias) dos ratos aos 17,5 dias de confecção das FLP (20X).

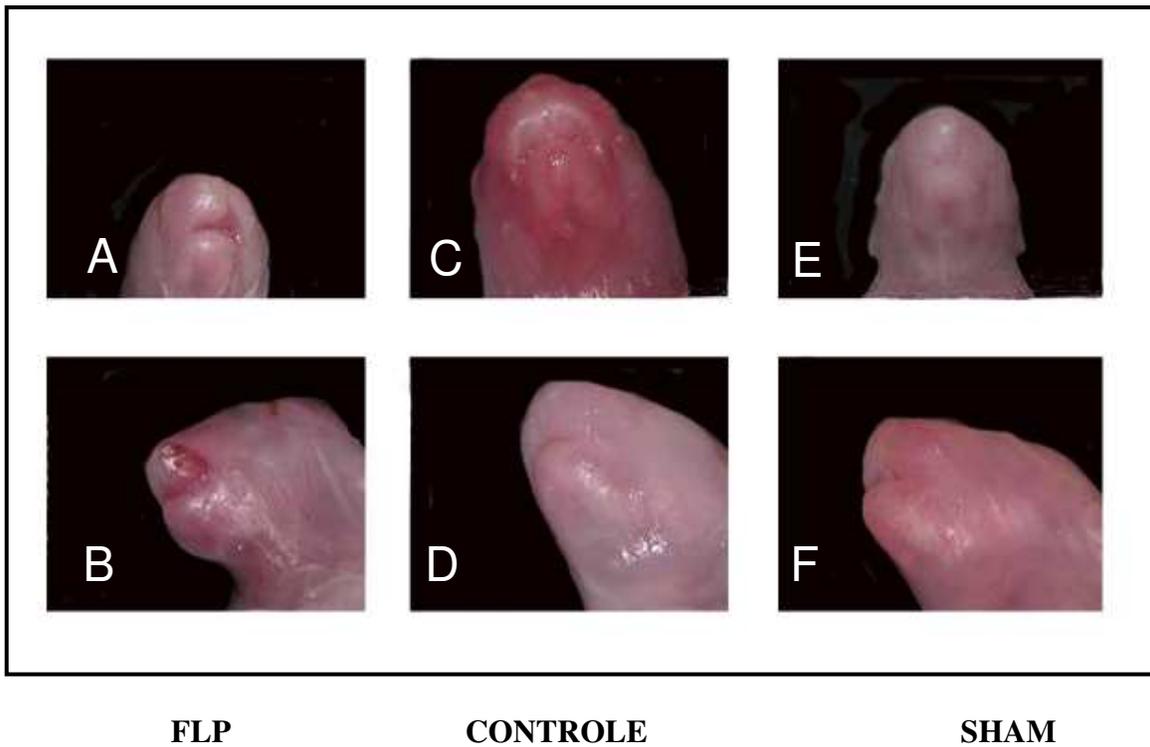


Figura 6- Representa as faces fetais gerais ao nascimento (21,5 dias) dos ratos aos 18,5 dias de confecção das FLP. *A e B*, Feto com FLP caracterizada pela depressão, assimetria e retração labial; *C e D*, Feto Controle; *D e F*, Feto SHAM.

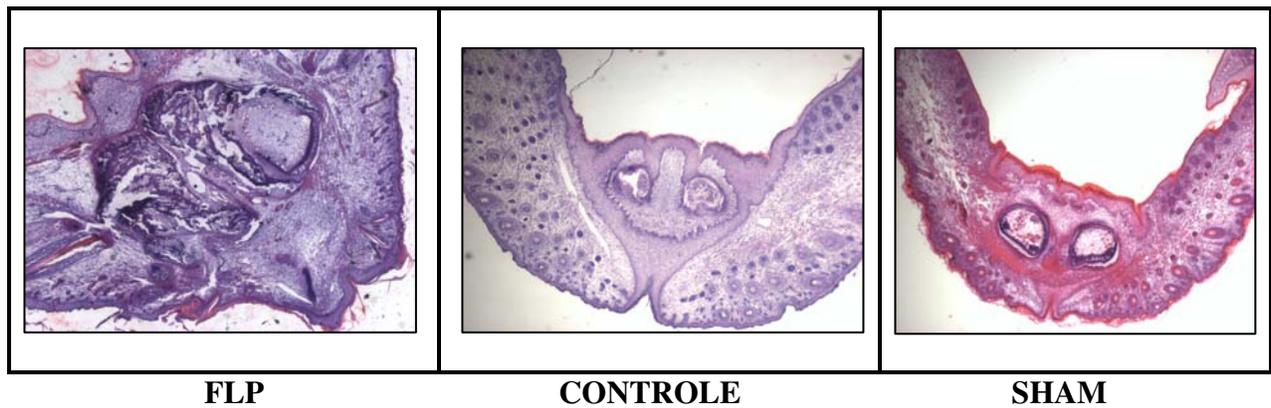


Figura 7- Representa as fotomicrografias gerais dos lábios fetais ao nascimento (21,5 dias) dos ratos aos 18,5 dias de confecção das FLP (20X).

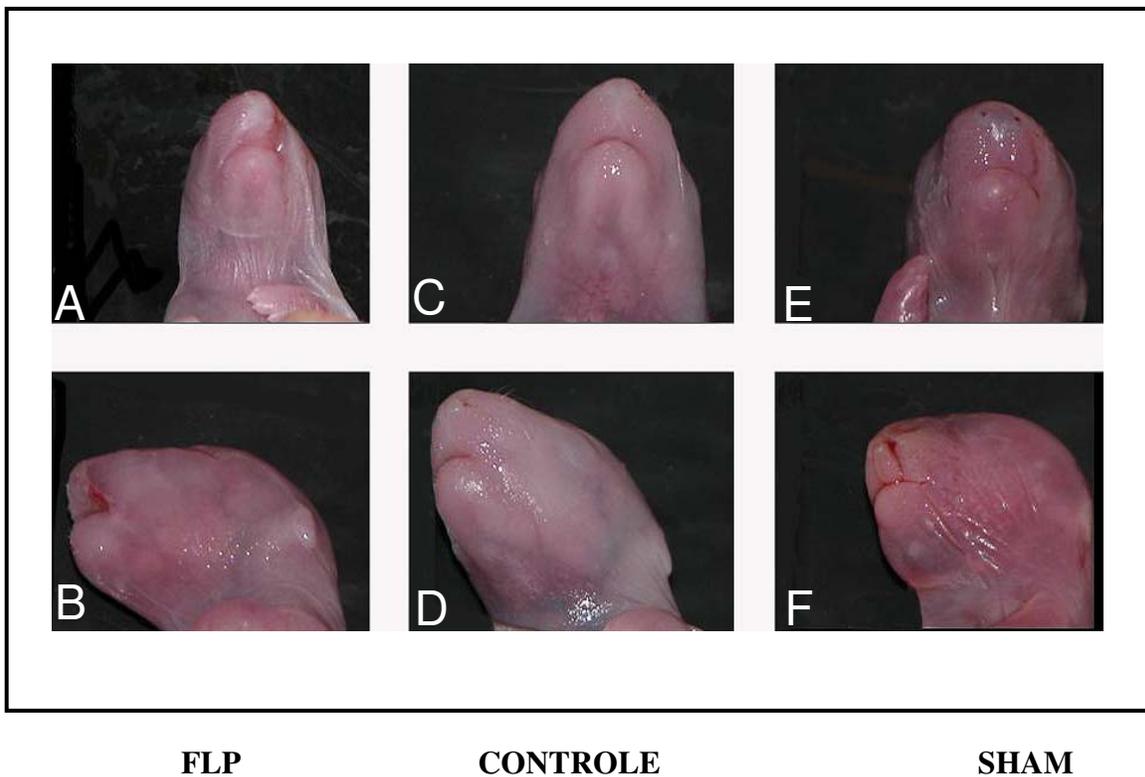


Figura 8- Representa as faces fetais gerais ao nascimento (21,5 dias) dos ratos aos 19,5 dias de confecção das FLP. *A e B*, Feto com FLP caracterizada pela depressão, assimetria e retração labial; *C e D*, Feto Controle; *D e F*, Feto SHAM.

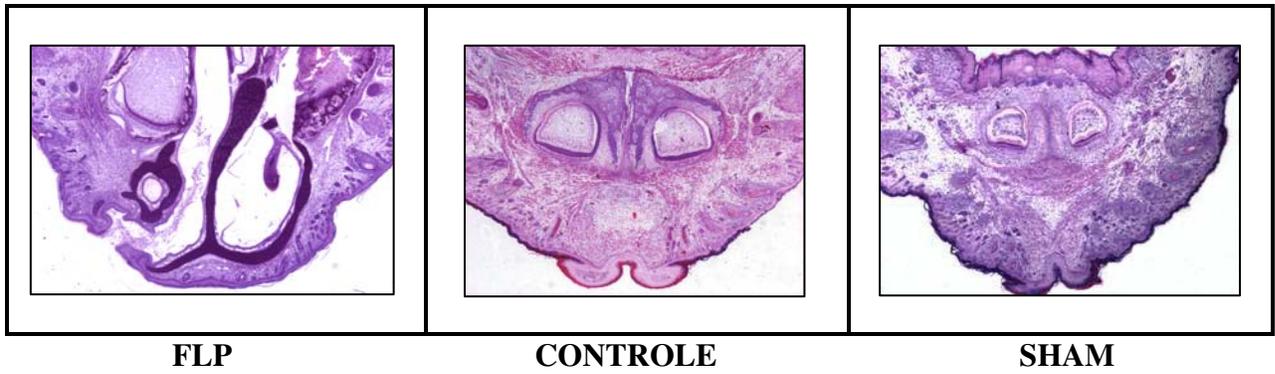


Figura 9- Representa as fotomicrografias gerais dos lábios fetais ao nascimento (21,5 dias) dos ratos aos 19,5 dias de confecção das FLP (20X).

6- DISCUSSÃO

As FLP são consideradas uma das anomalias congênitas mais comuns em todo o mundo e são defeitos que causam transtornos psicológicos e funcionais importantes aos seus portadores e suas famílias, pois levam ao estresse crônico de ordens física, emocional e social (Tobiasen, 1990). A incidência da doença em geral varia entre 0.5 e 2.0:1000 e acomete mais as populações asiáticas (Hagberg et al.,1998; Spritz, 2001).

Murray (2002) destaca o grande ônus econômico que as FLP acarretam, visto que demandam tratamento cirúrgico, clínico, odontológico, fonoaudiológico e psicológico, envolvendo uma equipe multidisciplinar.

A etiologia das FLP ainda não é completamente esclarecida, apesar de existir esforços mundiais para identificar sua causa. Pode estar relacionada com fatores genéticos, ambientais e sócio-econômicos (Hagberg et al.,1998; Murray et al., 1997).

Modelos animais podem fornecer a identificação de genes e loci para estudos em humanos e podem ser utilizados na investigação da interação entre gene e meio ambiente para compreender a fisiopatologia da doença (Broman et al., 1998).

Como causas ambientais associadas às FLP encontram-se: o tabagismo e o etilismo materno, as deficiências nutricionais e a exposição às drogas teratogênicas como as fenantoínas, o ácido valpróico e a talidomida (Warkany et al., 1943; Wyszynski e Beaty, 1996).

Modelos de ratos têm contribuído para identificar os genes envolvidos no desenvolvimento do palato e na natureza da sinalização de moléculas que podem atuar de maneira específica no tecido em estágios críticos da embriogênese (Murray e Schutte, 2004).

Juriloff e Harris (2008) identificaram na linhagem cromossômica de genes humanos e de genes de camundongos portadores de FLP que os genes: BMP4, BMPR1B, TFAP2A, SOX4, WNT9B, WNT3 estavam envolvidos na origem do defeito (Carinci et al., 2007; Juriloff e Harris, 2008).

Nas últimas décadas, o reparo das fissuras orais tem sido amplamente discutido considerando a escolha da técnica cirúrgica e a melhor época para sua realização (Sadovi et al., 2004). A hipoplasia do terço médio da face decorrente do reparo cirúrgico da FL é um achado clínico rotineiro (Edington et al., 1998) e a idade para a realização da cirurgia depende primeiramente do tipo de fissura, dos sintomas do paciente e da capacitação da equipe (Sadovi et al., 2004).

Tem sido considerado que quanto mais precocemente o paciente for operado, menores são as alterações de fala e o ideal seria a correção das FLP e FL em crianças antes do início deste processo de desenvolvimento. Entretanto, reparos tardios teoricamente permitiriam o crescimento facial e maxilar adequado, pois o crescimento facial transversal não está completo até os cinco anos de idade (Millard, 1980). Mais recentemente, o desenvolvimento apropriado da fala do paciente fissurado tem sido priorizado e normalmente a idade para a cirurgia corretiva é inferior a dois anos, sendo recomendado o reparo das FLP ao redor dos 18 meses de idade (Larossa, 2000).

O reparo das FL pode ser realizado aos três meses de idade, resultando em melhora do aspecto do vermelhão do lábio superior e diminuição da rotação do lábio fissurado em direção à asa do nariz (Byrd et al., 2008).

Atualmente com técnicas mais seguras de cirurgia intra-útero utilizadas no tratamento de defeitos com alto risco de mortalidade fetal, a correção intra-útero das FLP seria um grande atrativo devido seu potencial de reparar a lesão com ausência de cicatriz e prevenir deformidades secundárias (Harling et al., 2003).

Os fatores que tornam a correção intra-útero das fissuras orais uma possível realidade seriam: ausência de tecido cicatricial, modernização na precisão e qualidade do diagnóstico fetal por meio de ultrassom, e os recentes sucessos resultantes das cirurgias fetais minimamente invasivas (Lopoo et al., 1999; Deprest et al., 2006).

Para determinar a aplicabilidade da cirurgia intra-útero em anomalias craniofaciais são necessários modelos animais. Os modelos da FLP utilizam animais de pequeno ou grande porte e podem ser criados cirurgicamente ou induzidos por substâncias

teratogênicas. Cada um destes modelos apresenta vantagens e desvantagens e os mais estudados são: macaco, ovelhas, coelhos, ratos e camundongos. (Haberg et al., 1998).

Hallock et al. (1985) relataram sucesso no reparo intra-útero de FL confeccionada cirurgicamente no dia 105 de gestação em um macaco rhesus (termo = 165 dias). A cirurgia em primatas tem a vantagem das semelhanças anatômicas básicas da face dos humanos, entretanto possui alto custo (El-Deeb et al., 1985).

Estes et al. (1992) confeccionaram e repararam intra-útero FLP em ovelhas e observaram ausência de tecido cicatricial e o reparo cutâneo apresentou resposta regenerativa rápida e normalidade do colágeno na derme.

Stelnicki et al. (1998) obtiveram resultados estéticos caracterizados pela deiscência do reparo no lábio e deficiência muscular, além de presença do tecido das bordas da FLP inapropriadamente alinhados e inversão do epitélio quando realizaram cirurgia endoscópica fetal para criação e reparo da FLP em ovelhas, no entanto, não evidenciaram tecido cicatricial na avaliação histológica da lesão.

El-Bokle et al. (1993) confeccionaram e repararam intra-útero FLP em coelhos e obtiveram sucesso na confecção da fissura alveolar onde ocorreu comunicação oro nasal e tecido epitelial normal do lábio, com ausência de tecido inflamatório na avaliação clínica e histológica. Stern et al. (1992), utilizando o mesmo modelo, também notaram que não houve restrição no crescimento maxilar.

A criação do modelo intra-útero de FLP em ratos possui vários benefícios, pois o rato possui gestação curta (termo = 22 dias), com grande número de fetos e é de baixo custo. Cui et al. (2002) testaram este modelo para avaliar a cicatrização das FLP neonatais e demonstraram que fetos com a fissura excisional (com extração do tecido) apresentaram FL ao nascimento com alta taxa de sobrevivência. Em contraste, as fissuras confeccionadas sem a excisão do tecido, regeneraram-se e apresentaram aspectos clínicos e histológicos normais. Os autores concluíram que esse modelo pode ser utilizado para documentar o crescimento facial no reparo intra-útero de FL.

Harling et al. (2003) preconizam que os modelos de FLP devem ser realizados em animais de grande porte devido às dificuldades técnicas, no entanto, diferente do que preconizam estes autores, nós utilizamos o rato, animal de pequeno porte, e não tivemos dificuldades técnicas para a confecção da FLP nas três idades gestacionais selecionadas (17,5, 18,5 e 19,5 dias). Nossos resultados foram similares aos de Cui et al. (2002) sendo que detectamos ao nascimento a presença de FL em fetos submetidos ao procedimento de excisão do tecido labial. Entretanto, o defeito não estava presente nos fetos do grupo SHAM que foram submetidos apenas à incisão, sem extração do tecido do lábio superior, pois houve regeneração completa do lábio.

A determinação da idade gestacional ideal para confecção da FLP intra-útero em ratos também foi discutida em estudos realizados por Salazar (1988). Conforme este autor, a melhor idade estaria entre 18 e 19 dias de gestação, achado que está de acordo com o nosso estudo, no qual foi considerada 19,5 dias a melhor idade gestacional para confecção da FLP. Entretanto, Salazar considerou a menor taxa de óbitos como fator determinante para a definição da idade ideal para a realização do procedimento, enquanto nós procuramos verificar o melhor momento gestacional em que a FLP apresentou características como: existência da FLP ou FL (no caso de SHAM), afastamento das bordas do lábio, epitelização das bordas afastadas, continuidade do epitélio no defeito, presença de coágulos, aumento da vascularização e sinais de inflamação.

Jorge (2002) descreve as características macroscópicas da FL: depressão ou falha no vermelhão; assimetria quando comparados os lados fissurado e não fissurado; e retração como encurtamento do lábio superior fissurado, cuja borda epitelial segue direção oblíqua ascendente nos sentidos medial e cranial.

Nós encontramos menos depressão, assimetria e retração aos 17,5 DG quando comparados às outras IG (18,5 e 19,5). Esses resultados vão de acordo com os resultados dos vários modelos que fazem a FLP mais precoce. Porém, nesta idade e também no DG 18,5 encontramos à avaliação microscópica regeneração parcial da FLP, não apresentando bordas da lesão separadas, o que de fato ocorreu na IG 19,5.

Uma possível explicação para o que ocorreu nos DG 17,5 e 18,5 seria a alta capacidade de cicatrização fetal, como foi relatado por Oberg et al. (1995) e Hallock (1985), que relataram cicatrização total com completa epitelização das FLP confeccionadas e reparadas em fetos de camundongos.

Harling et al. (2003) relataram a existência de poucos estudos considerando o efeito da IG nas propriedades da cicatrização do feto operado. Portanto, nós concluimos a validação da criação do modelo de FLP em ratos considerando a IG 19,5 como ideal para a confecção do defeito facial, podendo assim contribuir para melhor caracterização do modelo e aplicação do método em estudos futuros de correção fetal das FLP.

7- CONCLUSÃO

O modelo experimental fetal de FLP em ratos foi factível e tecnicamente viável sem mortalidade fetal, sendo que a melhor IG para confecção do defeito foi no dia 19,5 da gestação. Nesta data a avaliação histológica revelou presença de FLP caracterizada por interrupção do lábio, com bordas afastadas com ausência de sinais de tecido inflamatório.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bittencourt D, Barreto MWG, França WMG, Gonçalves A, Pereira LAV, Sbragia L. Impact of corticosteroid on intestinal injury in a gastroschisis rat model:morphometric analysis. *J Pediatr Surg.* 2006; 41 (3):547-53.

Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL, Weber JL. Comprehensive human genetic maps: individual in sex specific variation in recombination. *Am J Hum Genet.* 1998; 63 (3):861-9.

Byrd HS, Ha RY, Khosla RK, Gosman AA. Bilateral cleft lip and nasal repair. *Plast Reconstr Surg.* 2008; 122 (4):1181-90.

Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2007; 71 (10):1509-19.

Cui L, Zhang Q, Li FC, Qian YL, Guan WX. Intra-uterine model of cleft lip and scarless wound healing of fetal rats. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2002; 11 (3):216-8.

Deprest J, Jani J, Lewi L, Ochsenein-Koble N, Cannie M, Done E, et al. Fetoscopic surgery:encouraged by clinical experience and boosted by instrument innovation. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006; 11 (6):398-412.

Dodson T, Schmidt B, Longaker MT, Kaban LB. Fetal cleft lip repair in rabbits: postnatal facial growth after repair. *J Oral Maxillofac Surg* 1991; 49 (6):603-11.

Edington HD, Mooney MP, Losken A, Hurwitz DJ, Siegel MI. The effects of soft tissue expansion on lip repair and midfacial growth in a rabbit cleft lip model. *Ann Plast Surg.* 1998; 41 (2):171-9.

El-Bokle BDS, Smith SJ, Germane N, Sharawy M. New technique for creating permanent experimental alveolar clefts in a rabbit model. *Cleft Palate Craniofac J.* 1993; 30 (6):542-7.

El-Deeb M; Horswell B; Waite DE. A primate model for producing experimental alveolar cleft defects. : *J Oral Maxillofac Surg.* 1985; 43 (7): 523-7.

Estes JM, Whitby DJ, Lorenz HP, Longaker MT, Szabo Z, Adzick NS, et al. Endoscopic creation and repair of fetal cleft lip. *Plast Reconstr Surg.* 1992; 90 (5):743-9.

Farmand M. Lip repair techniques and their influence on the nose. *Facial Plast Surg.* 2002; 18 (3):155-64.

George TM, Fuh E. Review of animal models of surgically induced spinal neural tube defects: implications for fetal surgery. *Pediatr Neurosurg.* 2003; 39 (2):81-90.

Hagberg C, Larson O, Milerad J. Incidence of cleft lip and palate and risks of additional malformation. *Cleft Palate Craniofac J.* 1998; 35 (1):40.

Hallock GG. In utero cleft lip repair in A/J mice. *Plast Reconstr Surg.* 1985; 75 (6):785-8.

Hallock GG, Rice DC, McClure HM. In utero lip repair in the rhesus monkey: an update. *Plast Reconstr Surg.* 1987; 80 (6):855-8.

Harling TR, Stelnicki EJ, Hedrick MH, Longaker MT. In utero models of craniofacial surgery. *World J Surg.* 2003; 27 (1):108-16.

Hedrick MH, Rice HE, Wall KJV, Adzick S, Harrison MR, Siebert J, et al. Delayed in utero repair of surgically created fetal cleft lip and palate. *Plast Reconstr Surg.* 1996; 97 (5):900-7.

Jorge D. Anatomia patológica nas fissuras labiopalatais. In: Mélega JM. *Cirurgia plástica: fundamentos e arte II – cirurgia reparadora de cabeça e pescoço.* 1ª.ed, 2002, editora Guanabara Koogan.

Juriloff DM, Harris MJ. Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008; 82 (2):63-77.

Khan PA, Cloutier M, Piedboeuf B. Tracheal occlusion: a review of obstructing fetal lungs to make them grow and mature. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2007; 145C (2):125-38.

LaRossa D. The state of the art in cleft palate surgery. *Cleft Palate Craniofac J.* 2000; 37 (3):225-8.

Longaker M. A rabbit model for fetal cleft lip repair. *J Oral Maxillofac Surg.* 1990; 48 (7):714-9.

Lopoo JB, Hedrick MH, Chasen S, Montgomery L, Chervenack FA, Goldstein R, et al. Natural history of fetuses with cleft lip. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 103 (1):34-8.

Millard DR. Alveolar and palatal deformities. *Cleft craft: the evolution of its surgery*, vol 3. Boston: Little, Brown and Company; 1980 p 449-54.

Moore KL, Persaud TVN. O aparelho faríngeo. In: Moore KL, Persaud TVN, editors. *Embriologia básica*. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 171-209.

Murray JC, Daack-Hirsch S, Buetow KH. Clinical and epidemiologic studies of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate J.* 1997; 34 (1):7-10.

Murray JC. Gene environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin.Genet.* 2002; 61 (4):248-56.

Murray JC, Schutte BC. Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *J Clin Invest.* 2004; 113 (12):1676-8.

Neiman GS, Savage HE. Development of infant and toddlers with clefts from birth to three years of age. *Cleft Palate Craniofac J.* 1997; 34 (3):218-25.

Northrup H, Volcik KA. Spina bifida and other neural tube defects. *Curr Probl Pediatr.* 2000; 30 (10):313-32.

Oberg KC, Evans ML, Nguyen T, Peckham NH, Kirsch WM, Hardesty RA. *Cleft Palate Craniofac J.* 1995; 32 (2):129-37.

Papadopoulos NA, Papadopoulos MA, Kovacs L, Zeilhofer HF, Henke J, Boettcher P, Biemer E. Foetal surgery and cleft lip and palate: current status and new perspectives. *Br J Plast Surg.* 2005; 58 (5):593-607.

Sadove AM, van Aalst JA, Culp JA. Cleft palate repair: art and issues. *Clin Plastic Surg.* 2004; 31 (2):231-41.

Salazar A. Intrauterine repair of lesion resembling cleft lip and its effect on maternal behavior in rats. *Cleft Palate J.* 1988; 25 (1):38-42.

Spina V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classification of cleft lip and cleft palate. Suggested changes. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1972; 27(1):5-6.

Spritz RA. The genetics and epigenetics of orofacial clefts. *Curr Opin Pediatr.* 2001; 13 (6):556-60.

Stelnicki EJ, Bullard KM, Harrison MR, Cass DL, Adzick NS. A new in vivo model for the study of fetal wound healing. *Ann Plast Surg.* 1997; 39 (4):374-80.

Stelnicki EJ, Vanderwall K, Hoffman WY, Szabo Z, Harrison MR, Foster R, et al. Adverse outcomes following endoscopic repair of a fetal cleft lip using an ovine model. *Cleft Palate Craniofac J.* 1998; 35 (5):425-9.

Stern M, Schmidt B, Dodson TB, Stern R, Kaban LB. Fetal cleft lip repair in rabbits: histology and role of hyaluronic acid. *J Oral Maxillofac Surg* 1992; 50 (3):263-8.

Strong EB, Buckmiller LM. Management of the cleft palate. *Fac Plast Surg Clin North Am.* 2001; 9 (1):15-25.

Sullivan-Jones P, Hansen DK, Sheehan DM, Holson RR. The effect of teratogens on maternal corticosterone levels and cleft incidence in A/J mice. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1992; 12 (4):183-9.

Sullivan WG. In utero cleft lip repair in the mouse without an incision. *Plast Reconstr Surg.* 1989; 84 (5):723-732.

Sutton LN. Fetal surgery for neural tube defects. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008; 22 (1):175-88.

Tobiasen JM. Psychosocial adjustment to cleft lip and palate. In: Bardach J, Morris HL. Multidisciplinary management of cleft lip and palate. Philadelphia. W.B. Saunders, 1990. p820-4.

Warkany J, Nelson RC, Schraffenberger E. Congenital malformations induced in rats by maternal nutritional deficiency. Am J Dis Child. 1943; 65 (5):882-894.

Wyszynski DF, Beaty TH. Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. Teratology. 1996; 53 (5):309-17.

9- APÊNDICES

Apêndice 1- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos FLP operados no DG 17,5.

GRUPO	DIA	N	PESO			
Fissura	17.5	1	5,61			
Fissura	17.5	2	5,28			
Fissura	17.5	3	3,719			
Fissura	17.5	4	5,672			
Fissura	17.5	5	5,304			
Fissura	17.5	6	5,667			
Fissura	17.5	7	3,578			
Fissura	17.5	8	4,16			
Fissura	17.5	9	5,487			
Fissura	17.5	10	5,88			
Fissura	17.5	11	5,331			
Fissura	17.5	12	4,301			
Fissura	17.5	13	5,217			
Fissura	17.5	14	5,113			
Fissura	17.5	15	6,244			
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>DesvPad</i>	
Fissura 1	15	59,596	4,97	0,644	0,802	

Apêndice 2- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos Controle operados no DG 17,5.

GRUPO	DIA	N	PESO			
Controle	17.5	16	5,309			
Controle	17.5	17	4,86			
Controle	17.5	18	5,624			
Controle	17.5	19	4,702			
Controle	17.5	20	5,106			
Controle	17.5	21	5,372			
Controle	17.5	22	3,965			
Controle	17.5	23	5,614			
Controle	17.5	24	6,366			
Controle	17.5	25	6,829			
Controle	17.5	26	5,353			
Controle	17.5	27	6,717			
Controle	17.5	28	5,598			
Controle	17.5	29	4,89			
Controle	17.5	30	4,887			
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>DesvPad</i>	
Controle1	15	71,84	5,53	0,66	0,813	

Apêndice 3- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos SHAM operados no DG 17,5.

GRUPO	DIA	N	PESO			
Sham	17.5	31	5,443			
Sham	17.5	32	4,998			
Sham	17.5	33	5,257			
Sham	17.5	34	5,373			
Sham	17.5	35	6,173			
Sham	17.5	36	4,856			
Sham	17.5	37	5,088			
Sham	17.5	38	5,318			
Sham	17.5	39	5,481			
Sham	17.5	40	5,84			
Sham	17.5	41	5,654			
Sham	17.5	42	6,293			
Sham	17.5	43	5,139			
Sham	17.5	44	6,194			
Sham	17.5	45	6,18			
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>DesvPad</i>	
sham1	15	77,11	5,51	0,21	0,462	

Apêndice 4- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos FLP operados no DG 18,5.

GRUPO	DIA	N	PESO			
Fissura	18.5	46	5,667			
Fissura	18.5	47	3,578			
Fissura	18.5	48	4,16			
Fissura	18.5	49	5,487			
Fissura	18.5	50	4,998			
Fissura	18.5	51	4,203			
Fissura	18.5	52	5,185			
Fissura	18.5	53	5,441			
Fissura	18.5	54	6,144			
Fissura	18.5	55	6,538			
Fissura	18.5	56	5,849			
Fissura	18.5	57	4,89			
Fissura	18.5	58	4,88			
Fissura	18.5	59	4,342			
Fissura	18.5	60	4,462			
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>DesvPad</i>	
fissura2	15	86,947	5,43	0,726	0,852	

Apêndice 5- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos Controle operados no DG 18,5.

GRUPO	DIA	N	PESO			
Controle	18.5	61	5,945			
Controle	18.5	62	4,313			
Controle	18.5	63	4,718			
Controle	18.5	64	5,241			
Controle	18.5	65	6,061			
Controle	18.5	66	4,189			
Controle	18.5	67	5,747			
Controle	18.5	68	5,901			
Controle	18.5	69	5,648			
Controle	18.5	70	5,661			
Controle	18.5	71	5,434			
Controle	18.5	72	5,398			
Controle	18.5	73	4,772			
Controle	18.5	74	5,012			
Controle	18.5	75	5,87			
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>DesvPad</i>	
controle2	15	58,86	5,35	0,43	0,659	

Apêndice 6- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos SHAM operados no DG 18,5.

GRUPO	DIA	N	PESO			
Sham	18.5	76	5,959			
Sham	18.5	77	3,402			
Sham	18.5	78	5,942			
Sham	18.5	79	5,373			
Sham	18.5	80	4,027			
Sham	18.5	81	5,498			
Sham	18.5	82	5,416			
Sham	18.5	83	6,252			
Sham	18.5	84	5,489			
Sham	18.5	85	5,286			
Sham	18.5	86	5,108			
Sham	18.5	87	4,542			
Sham	18.5	88	3,78			
Sham	18.5	89	5,221			
Sham	18.5	90	4,708			
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>DesvPad</i>	
sham2	15	62,29	5,19	0,69	0,828	

Apêndice 7- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos FLP operados no DG 19,5.

GRUPO	DIA	N	PESO			
Fissura	19.5	91	5,88			
Fissura	19.5	92	5,331			
Fissura	19.5	93	4,301			
Fissura	19.5	94	5,217			
Fissura	19.5	95	5,649			
Fissura	19.5	96	3,557			
Fissura	19.5	97	5,543			
Fissura	19.5	98	5,38			
Fissura	19.5	99	6,764			
Fissura	19.5	100	5,321			
Fissura	19.5	101	5,873			
Fissura	19.5	102	4,129			
Fissura	19.5	103	5,188			
Fissura	19.5	104	4,058			
Fissura	19.5	105	5,26			
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>DesvPad</i>	
Fissura3	15	58,632	5,33	0,522	0,722	

Apêndice 8- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos Controle operados no DG 19,5.

GRUPO	DIA	N	PESO			
Controle	19.5	106	5,874			
Controle	19.5	107	4,099			
Controle	19.5	108	4,886			
Controle	19.5	109	5,002			
Controle	19.5	110	6,265			
Controle	19.5	111	3,969			
Controle	19.5	112	4,917			
Controle	19.5	113	6,014			
Controle	19.5	114	6,087			
Controle	19.5	115	6,181			
Controle	19.5	116	5,663			
Controle	19.5	117	6,833			
Controle	19.5	118	4,89			
Controle	19.5	119	5,567			
Controle	19.5	120	4,902			
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>DesvPad</i>	
controle3	15	65,79	5,48	0,81	0,898	

Apêndice 9- Resultados das aferições das medidas de peso dos fetos Sham operados no DG 19,5.

GRUPO	DIA	N	PESO			
SHAM	19.5	121	4,264			
SHAM	19.5	122	5,884			
SHAM	19.5	123	4,582			
SHAM	19.5	124	5,748			
SHAM	19.5	125	5,653			
SHAM	19.5	126	4,194			
SHAM	19.5	127	4,96			
SHAM	19.5	128	5,418			
SHAM	19.5	129	4,041			
SHAM	19.5	130	5,446			
SHAM	19.5	131	5,197			
SHAM	19.5	132	3,985			
SHAM	19.5	133	4,76			
SHAM	19.5	134	5,721			
SHAM	19.5	135	4,901			
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>DesvPad</i>	
sham3	15	59,37	4,95	0,50	0,705	



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 685-1, sobre "AValiação DO MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DAS FISSURAS LABIO PALATINAS EM FETOS DE RATOS SPREAGUE-DOWLEY" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Lourenço Sbraggia / Tatiana Valéria Novais Silva está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 03 de Junho de 2004.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 685-1, entitled "CLEFT LIP STUDY IN A FETAL RAT MODEL", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on June 3, 2004.

Campinas, 03 de Junho de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

