

SILVIA BONA DO NASCIMENTO

**Sutura química por polietilenoglicol na  
regeneração do nervo facial em ratos  
após neurotmese**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutora em  
Ciências

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ferreira  
Bento

São Paulo

2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nascimento, Silvia Bona do  
Sutura química por polietilenoglicol na  
regeneração do nervo facial em ratos após neurotome  
/ Silvia Bona do Nascimento. -- São Paulo, 2017.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Otorrinolaringologia.  
Orientador: Ricardo Ferreira Bento.

Descritores: 1.Nervo facial 2.Polietilenoglicóis  
3.Regeneração nervosa 4.Eletrofisiologia 5.Azul de  
metileno 6.Cálcio 7.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-394/17

Disciplina é a ponte entre metas e realizações.

Jim Rohn

Aos meus pais, Socorrinha e Hoston, por me inspirarem desde muito cedo no caminho do trabalho e do estudo, da honestidade e do esforço, sem esquecer o amor.

Ao Flávio, meu amor e companhia constantes, que me apoia incondicionalmente não importa o tamanho do desafio.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, cujo apoio senti em cada passo desse trabalho, às vezes com risos altos, às vezes com broncas, e às vezes silenciosamente, proporcionando-me as condições de seguir adiante. Agradeço sobretudo por servir de inspiração para mim e toda uma geração de otorrinos, transformando a especialidade no Brasil e fora.

Ao **Prof. Dr. Rubens Vuono de Brito Neto**, meu mentor e inspiração durante a residência e mesmo depois, no ombro de quem já obtive amparo inúmeras vezes.

Ao **Dr. Robinson Koji Tsuji**, exemplo de profissional ético e competente, por todo conhecimento compartilhado e amizade.

À **Dra. Raquel Salomone**, por quem minha admiração e amizade nunca param de crescer, agradeço imensamente os *insights*, o estímulo, a disponibilidade e a amizade que nunca vacila, nem mede esforços.

À **Dra. Heloisa Juliana Zabeu Rossi Costa**, por me ajudar em todas as etapas desse estudo, desde a ideia original até a escrita da tese.

À **Dra. Anna Carolina de Oliveira Fonseca**, minha amiga e confidente, que tantas vezes me acolheu e me tranquilizou, por ser um grande estímulo na conclusão desse trabalho.

Aos amigos que fiz na residência e preceptoria de otorrinolaringologia, principalmente **Dra. Mariana Hausen Pinna, Dra. Graziela Andreotti de Souza Queiroz Martins, Dra. Andréia Felice dos Santos, Dra. Tatiana Alves Monteiro, Dra. Aline Gomes Bittencourt, Dra. Barbara Elvina Ulisses Parente Queiroz e Dra. Milene Massucci Bissoli** pelas palavras e ações incentivadoras e, principalmente, amizade e companheirismo. Cada vez que nos vemos parece que o tempo não passou.

À **Maria Márcia Alves, Maria Marileide Alves, Lucivania Lima da Silva e Adriana Raquel** pelo carinho e respeito com que me tratam, além de todo apoio e auxílio que me deram em todo o percurso até aqui.

A toda a minha família, mas principalmente minhas irmãs **Rita de Cassia Bona do Nascimento, Fabiana Bona do Nascimento, Caliandra Bona**

**Nascimento e Melissa Bona Nascimento** e irmã torta **Ana Christina Cortez Bona** que são meus apoios e minhas alegrias todo dia.

# SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| Lista de abreviaturas e siglas.....                                      |           |
| Lista de símbolos.....   |           |
| Lista de figuras.....  |           |
| Lista de tabelas.....  |           |
| Lista de gráficos.....   |           |
| Resumo.....  |           |
| Abstract.....  |           |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>01</b> |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>   | <b>05</b> |
| <b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                      | <b>06</b> |
| 3.1 O modelo animal.....   | 06        |
| 3.1.1 Anatomia, histologia e fisiologia do nervo facial de ratos.....    | 08        |
| 3.1.2 Avaliação funcional da regeneração do nervo facial de ratos.....   | 10        |
| 3.1.3 Avaliação histológica da regeneração do nervo facial de ratos..... | 12        |
| 3.2 Técnicas de reparo do nervo facial.....                              | 13        |
| 3.2.1 Técnicas cirúrgicas de reparo do nervo facial.....                 | 14        |
| 3.2.2 A sutura química.....  | 17        |

|          |  |              |
|----------|--|--------------|
| 3.2.2.1  | Conceitos de regeneração de nervos aplicados à sutura química .....        | 17           |
| 3.2.2.2  | O polietilenoglicol na fusão de membranas biológicas.....                  | 20           |
| 3.2.2.3  | O azul de metileno na fusão de membranas biológicas.....                   | 22           |
| 3.2.2.4  | O procedimento de sutura química .....                                     | 24           |
| <b>4</b> | <b>MÉTODO.....</b>   | <b>26</b>    |
| 4.1      | Desenho do estudo e aspectos éticos.....                                   | 26           |
| 4.2      | Local e amostra do estudo .....  | 26           |
| 4.3      | Delineamento experimental.....   | 27           |
| 4.4      | Avaliação da neurocondução motora.....                                     | 29           |
| 4.5      | Procedimento cirúrgico.....  | 31           |
| 4.6      | Análise histológica.....   | 33           |
| 4.7      | Análise estatística.....   | 34           |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>.....</b> |
| 5.1      | Parâmetros eletromiográficos pré-operatórios e do grupo controle (G1)..... | 35           |
| 5.1.1    | Estudo da neurocondução motora no pré-operatório.....                      | 35           |
| 5.1.2    | Estudo da neurocondução motora no grupo controle (G1).....                 | 36           |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.2 Avaliação da regeneração neural com sutura química.....  | 38        |
| 5.2.1 Comparação da neurocondução motora entre grupos após 3 semanas de pós-operatório.....          | 38        |
| 5.2.2 Comparação da neurocondução motora entre grupos após 6 semanas de pós-operatório.....          | 40        |
| 5.2.3 Avaliação histológica quantitativa da regeneração neural com 6 semanas de pós- operatório..... | 42        |
| <b>6 DISCUSSÃO.....</b>  | <b>45</b> |
| 6.1 O modelo animal.....   | 45        |
| 6.2 O modelo de lesão e reparo neural.....   | 47        |
| 6.3 A avaliação funcional.....   | 49        |
| 6.4 A avaliação histológica.....   | 56        |
| <b>7 CONCLUSÃO .....</b>   | <b>60</b> |
| <b>8 ANEXOS.....</b>   | <b>61</b> |
| 8.1 Anexo A- Parecer do Comitê de Ética.....   | 61        |
| 8.2 Anexo B- Permissão para a reprodução de figuras.....   | 62        |
| <b>9 REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>40</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|             |  |
|-------------|--|
| NF          | nervo facial   |
| PFP         | paralisia facial periférica  |
| PEG         | polietilenoglicol  |
| PAMC        | potencial de ação muscular composto  |
| ENMG        | eletroneuromiografia   |
| FMUSP       | Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo   |
| FCF- IQ/USP | Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de<br>Química da Universidade de São Paulo |
| LIM         | Laboratório de Investigação Médica   |
| USB         | entrada serial universal   |
| HP          | Hewlett- Packward  |
| CA          | Califórnia   |
| EUA         | Estados Unidos da América  |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                 |                             |
|-----------------|-----------------------------|
| mm              | milímetro                   |
| μm              | micrômetro                  |
| μm <sup>2</sup> | micrômetro quadrado         |
| ms              | milissegundo                |
| g               | grama                       |
| kg              | quilograma                  |
| mg              | miligrama                   |
| x               | vezes                       |
| /               | dividido por                |
| o               | indicador ordinal masculino |
| a               | indicador ordinal feminino  |
| ®               | marca registrada            |
| %               | por cento                   |
| nº              | número                      |
| Hz              | hertz                       |
| KHz             | quilohertz                  |
| mV              | milivolt                    |
| mAmp            | miliampere                  |
| UI              | unidade internacional       |

|                                 |                                |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Ca <sup>+2</sup>                | íon cálcio                     |
| XIII                            | treze                          |
| II                              | segunda                        |
| et al                           | e outros                       |
| NaCl                            | cloreto de sódio               |
| KCl                             | cloreto de potássio            |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | fosfato de potássio monobásico |
| MgSO <sub>4</sub>               | sulfato de magnésio            |
| NaHCO <sub>3</sub>              | bicarbonato de sódio           |
| Na                              | sódio                          |
| mOsm                            | miliosmol                      |
| μM                              | micromolar                     |
| mM                              | milimolar                      |
| CaCl <sub>2</sub>               | cloreto de cálcio              |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Fotografia evidenciando ramos mandibular (seta vermelha) e bucal do nervo facial direito de rato Wistar.....
- Figura 2-** Representação esquemática da cronologia experimental.....
- Figura 3-** Fotografia de rato sendo submetido a eletroneuromiografia do ramo mandibular do nervo facial.....
- Figura 4-** Esquema representativo do procedimento cirúrgico completo a que foram submetidos os animais.....

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Valores de latência, amplitude e duração do potencial de ação muscular composto do ramo mandibular do nervo facial de ratos Wistar submetidos à neurotmesa do ramo mandibular do nervo facial seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) no pré-operatório.....
- Tabela 2-** Tabela 2- Valores de latência, amplitude e duração do potencial de ação muscular composto de ratos Wistar submetidos à neurotmesa do ramo mandibular do nervo facial seguida de sutura simples dos cotos, no pré-operatório (t 0), e após 3 (t 3) e 6 semanas (t 6) de pós-operatório.....
- Tabela 3-** Valores de latência, amplitude e duração do potencial de ação muscular composto do ramo mandibular do nervo facial de ratos Wistar submetidos à neurotmesa do ramo mandibular do nervo facial seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) com 3 semanas de pós-operatório.....
- Tabela 4-** Valores de latência, amplitude e duração do potencial de ação muscular composto do ramo mandibular do nervo facial de ratos submetidos à neurotmesa do ramo mandibular do nervo facial

seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) com 6 semanas de pós-operatório.....

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1-** Representação dos valores de latência, amplitude e duração do potencial de ação muscular composto do ramo mandibular do nervo facial de ratos Wistar submetidos à neurotmeze do ramo mandibular do nervo facial seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) com 3 semanas de pós-operatório.....

**Gráfico 2-** Representação dos valores de latência (em ms), amplitude (em mV) e duração (em ms) do potencial de ação muscular composto do ramo mandibular do nervo facial de ratos submetidos à neurotmeze do ramo mandibular do nervo facial seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) com 6 semanas de pós-operatório.....

**Gráfico 3-** Representação do número total de axônios contidos em um campo de 10.000  $\mu\text{m}^2$  do segmento distal ao local de neurotmeze do ramo mandibular do nervo facial de ratos Wistar submetidos à secção do nervo seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) com 6 semanas de pós-operatório.....

**Gráfico 4-** Representação do menor diâmetro axonal dos axônios contidos em um campo de 10.000  $\mu\text{m}^2$  do segmento distal ao local de neurotmesa do ramo mandibular do nervo facial de ratos Wistar submetidos à secção do nervo seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) com 6 semanas de pós-operatório.....

## RESUMO

Nascimento SB. Sutura química por polietilenoglicol na regeneração do nervo facial em ratos após neurotmeze [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

**INTRODUÇÃO:** O nervo facial (NF) desempenha um papel importante em diversas funções fisiológicas do organismo e controla a musculatura da mímica facial, responsável por transmitir sentimentos e emoções. O tratamento padrão-ouro para reconstrução do NF após trauma com secção é a anastomose término-terminal com cola de fibrina, que na maioria dos casos ainda produz resultados subótimos. Por isso, objetivou-se testar o efeito de uma nova técnica de reconstrução usando um protocolo de fusão axonal por polietilenoglicol (PEG), denominada sutura química, utilizando parâmetros eletrofisiológicos e histomorfométricos. **MÉTODOS:** Ratos Wistar foram divididos em 4 grupos. Após transecção do ramo mandibular do NF, o grupo controle foi submetido a anastomose dos cotos neurais com microssuturas. O grupo 2 foi tratado com microssuturas mais a sutura química. A sutura química consistiu de lavagem dos cotos neurais com solução de Krebs hipotônica contendo azul de metileno antes das microssuturas. Depois da sutura, seguiu-se a lavagem com solução de PEG e, por último, aplicação de solução de Krebs contendo cálcio. O grupo 3 recebeu microssuturas mais a solução com azul de metileno. E o grupo 4 foi tratado com microssuturas mais a solução de PEG. Os potenciais de ação musculares compostos (PAMCs) foram avaliados no pré-operatório e após 3 e 6 semanas das intervenções. A análise histomorfométrica foi realizada após 6 semanas. **RESULTADOS:** Os animais submetidos à sutura química apresentaram maior amplitude e menor duração dos PAMCs 3 e 6 semanas após a cirurgia em comparação com todos os demais grupos; na análise histológica, apresentaram maior contagem axonal e maior diâmetro axonal. **CONCLUSÕES:** A sutura química produziu recuperação mais intensa do NF após secção e sutura quando comparada à sutura isoladamente, pela avaliação eletrofisiológica e histomorfométrica, e pode ser útil em situações clínicas nas quais haja secção seguida de reparo neural imediato.

Descritores: nervo facial; polietilenoglicóis; regeneração nervosa; eletrofisiologia; azul de metileno; cálcio; ratos Wistar

## ABSTRACT

Nascimento SB. Polyethylene glycol-fusion in facial nerve regeneration in rats after neurotmesis [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

**BACKGROUND:** The gold standard treatment for traumatic transection of the FN continues to be end-to-end anastomosis using fibrin glue, which often yields unsatisfying results. **OBJECTIVE:** To test the outcome of a novel method of polyethylene glycol (PEG)-fusion on FN transection using electrophysiological and histomorphometric parameters. **METHODS:** Wistar rats were divided into 4 groups. After FN transection, the control group was submitted to end-to-end anastomosis with microsutures. Group 2 was submitted to microsutures plus the PEG-fusion protocol. This protocol consisted in bathing nerve stumps with a calcium-free Krebs solution containing methylene blue (MB) before suturing. After suturing, the repaired nerve received a PEG solution followed by a calcium-containing Krebs solution. Group 3 received microsutures plus the MB solution and group 4 received microsutures plus the PEG solution. Compound muscle action potentials (CMAPs) were recorded before the intervention and 3 and 6 weeks afterwards. Histomorphometric analysis was done at 6 weeks time. **RESULTS:** The PEG-fusion protocol yielded larger CMAP amplitude, smaller CMAP duration at 3 and 6 weeks and a larger axon count and axon diameter. Between the other groups, no significant difference was seen. **CONCLUSION:** PEG-fusion produces better FN recovery after transection, when considering electrophysiological and histomorphometric analysis and may be of use in clinical scenarios of FN cut-severance followed by immediate repair.

Descriptors: facial nerve; polyethylene glycol; nerve regeneration; electrophysiology; methylene blue; calcium; Wistar rats

## 1 INTRODUÇÃO

O nervo facial (NF), sétimo nervo craniano, desempenha um papel importante em diversas funções do organismo. No pescoço, inerva o músculo estilo-hióide e o ventre posterior do músculo digástrico; na face, é o grande responsável pela motricidade da musculatura da mímica, abertura da válvula nasal, oclusões palpebral e bucal, além de lubrificar e proteger a córnea com o lacrimejamento. No ouvido, é responsável pela eferência do reflexo estapediano e sensibilidade da parede posterior do canal auditivo externo. Já na cavidade oral, por meio de suas fibras aferentes, responde pela sensibilidade gustativa dos dois terços anteriores da língua e pelo controle autonômico das glândulas exócrinas (1–3).

No entanto, distúrbios funcionais do NF não afetam apenas as funções fisiológicas mencionadas acima. A expressão dos sentimentos através da musculatura da mímica facial é uma das habilidades mais singulares dos seres humanos (1). Portanto, a paralisia facial implica em perda, frequentemente súbita, da expressão e da simetria facial e pode afetar também a psique do indivíduo, provocando mudanças significativas na autoimagem e na interação social, interferindo no rendimento profissional e comprometendo a qualidade de vida (4).

A paralisia facial periférica (PFP) foi descrita por Jackson e Von Doersten como a mononeuropatia aguda mais comum do ser humano (5). Não há dados estatísticos específicos do Brasil, porém, na literatura ocidental, estima-se que a incidência de PFP esteja entre 12 a 30 casos por 100.000 habitantes (6,7).

Sua etiologia mais frequente é a idiopática, sendo conhecida nesses casos como PFP de Bell (1,8–11).

Cada vez mais frequentes no cotidiano, principalmente com o aumento da violência e dos procedimentos cirúrgicos em cabeça e pescoço, os traumas diretos ao NF correspondem à segunda causa mais comum de PFP. Fraturas do osso temporal, ferimentos por armas de fogo ou brancas, lesões iatrogênicas deliberadas ou acidentais são alguns exemplos de traumas que podem causar PFP (10,12,13). Ainda, segundo Bento et al. (1985), 43% das PFP são de origem traumática, das quais 57% apresentam perda de continuidade parcial ou total do nervo (14).

Quando acometido, o NF pode apresentar, de acordo com a classificação de Sunderland (1968), cinco graus de lesão: neuropraxia, axoniotmese, endoneurotmese, perineurotmese e epineurotmese (15). A secção completa do NF (epineurotmese ou simplesmente neurotmese) desencadeia uma série de modificações em toda a unidade motora. Essas modificações traduzem-se por diminuição do diâmetro axonal no coto proximal, com o crescimento de brotos axonais, enquanto o segmento distal invariavelmente sofre desintegração e total reabsorção por células de Schwann fagocitárias neoformadas (degeneração walleriana) (1,2).

Quando o NF sofre neurotmese, os melhores resultados funcionais são obtidos com tratamentos cirúrgicos precoces, preferencialmente com anastomose término-terminal dos cotos. Atualmente, o padrão-ouro para reconstrução de nervo facial após secção, aliando praticidade a eficiência, é o uso de cola de fibrina, conforme trabalhos prévios de Bento et al. (3,16). Ainda assim, os resultados funcionais são subótimos, mesmo na mão de cirurgiões

experientes, e, em aproximadamente 75% dos casos não ultrapassam uma gradação III na escala de House-Brackmann (16–18).

Após uma secção axonal, o restabelecimento da função de barreira do axolema é condição necessária para a sobrevivência da extremidade proximal e posterior regeneração por brotamento. Tradicionalmente, achava-se que a vedação da extremidade axonal ocorria por simples contração e colapamento da membrana, com formação de camada lipídica simples (19). Múltiplas pesquisas envolvendo seres portadores de axônios gigantes, como as minhocas, lulas e lagostins evidenciaram que, na verdade, após uma secção total do nervo, a extremidade aberta é ocluída por múltiplas vesículas oriundas da endocitose de fragmentos da própria membrana plasmática, ou, em alguns casos, produzidas a partir da delaminação da mielina. Em aproximadamente 60 min, a aglomeração dessas vesículas permite o restabelecimento da função de barreira do axolema (19–23).

O surgimento e aglomeração de tais vesículas é um processo dependente do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$ . A função do  $\text{Ca}^{+2}$  nesse contexto é de ativar uma série de proteínas e enzimas envolvidas na fusão de membranas biológicas, entre as quais se destacam as calpaínas (24,25).

Apesar dos processos acima terem sido inicialmente descobertos em seres inferiores, posteriormente ficou comprovado que esse processo reparativo manteve-se em seres filogeneticamente superiores, como os mamíferos (19,26).

Considerando isso, Bittner et al. (2012) obtiveram resultados extremamente promissores na regeneração de nervos ciáticos de ratos com a regulação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  associada a fatores antioxidantes e um promotor de fusão de membranas biológicas (o polietilenoglicol- PEG) após uma

secção aguda (neurotmesa) seguida de sutura simples imediata dos cotos neurais (26).

A técnica descrita por Bittner e colaboradores (em inglês, *PEG-fusion*), denominada doravante aqui por convenção de sutura química, tem grande potencial de utilização também no nervo facial. Na prática, as principais situações de aplicabilidade seriam secções abruptas de facial após trauma, cirúrgico ou não. As principais vantagens dessa técnica consistem em ser facilmente exequível e de muito baixo custo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO**

Comparar funcionalmente, por eletroneuromiografia (ENMG), para avaliar amplitude, latência e duração dos potenciais de ação musculares compostos (PAMCs), a regeneração do ramo mandibular do NF de ratos submetidos à neurotmesa e sutura simples com neurotmesa e sutura simples associada à sutura química precoces.

### **2.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO**

Comparar histologicamente, através de estudo quantitativo a fim de avaliar diâmetro e quantidade de axônios mielinizados, a regeneração do ramo mandibular do NF de ratos submetidos à neurotmesa e sutura simples com neurotmesa e sutura simples associada à sutura química precoces.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 O MODELO ANIMAL

Existem vários modelos animais experimentais do NF, envolvendo cobaias, camundongos, primatas não humanos, cães, gatos e ratos, dentre outros (3,27–33). Obviamente, qualquer modelo animal apenas aproxima-se do comportamento do NF submetido a condições patológicas em humanos (33). De qualquer modo, de todos esses, têm-se destacado os modelos envolvendo ratos, por apresentarem fácil manuseio e manutenção, resistência a infecções e intervenções, e baixo custo, além de parâmetros anatômicos, metabólicos e de desenvolvimento bem descritos (2,27).

É comum encontrar na literatura estudos com os nervos ciático, tibial e fibular do rato, devido ao seu fácil acesso cirúrgico, reduzida morbidade para o animal quando se estuda mais de um tronco nervoso ao mesmo tempo e mecanismos de análise funcional, histológica, anatômica e eletroneuromiográfica amplamente estudados (26,33–35). No entanto, resultados experimentais mais fidedignos podem ser obtidos com a investigação do próprio facial. Além disso, mais ainda que em outros nervos periféricos, intervenções sobre o NF são bem toleradas pelos ratos, apresentando mínima morbidade (27,36) .

Anatomicamente, uma vantagem comum a todos os roedores reside na passagem do facial abaixo e não no interior da glândula parótida, facilitando a dissecação (36). Além disso, o trajeto longo e superficial, de fácil acesso e

visualizável através da pele, do ramo mandibular do NF torna-o propício a intervenções (2,28,36).

Especificamente no rato, a principal diferença anatômica, que se constitui em desvantagem, em relação ao facial de humanos, consiste na intensa anastomose entre os ramos terminais do nervo, o que faz com que seja necessário dissecá-los e cortar as anastomoses para permitir a experimentação com ramos isolados (2,28).

Outro ponto que deve ser mencionado é a maior rapidez e intensidade da regeneração neural em ratos em relação ao homem, tornando mais difícil a comprovação de resultados de qualquer método que se proponha a potencializá-la (27,37).

Em relação ao sexo dos animais utilizados, a esmagadora maioria de experimentos publicados utiliza animais do sexo masculino. Apesar de não haver estudos conclusivos sobre a influência de hormônios gonadais na regeneração do facial, é fato conhecido que eles têm ação trófica sobre o tecido neural. Sabe-se também que o ciclo estral de ratos Wistar é de quatro dias e caracteriza-se por variações marcantes dos níveis de estradiol sérico. Dessa forma, ratos fêmeas estariam sujeitas a variações no crescimento e regeneração do facial difíceis de serem quantificadas na prática (27,38,39) .

Na prática, as lesões neurais resultantes de trauma em seres humanos mais frequentemente ocasionam secção neural completa, o que torna modelos que utilizam a secção completa do facial mais apropriados e condizentes, em oposição a modelos que utilizam lesões do tipo esmagamento (32,40).

### 3.1.1 ANATOMIA, HISTOLOGIA E FISILOGIA DO NERVO FACIAL DE RATOS

À semelhança do que ocorre em seres humanos, o NF dos ratos emerge do forame estilomastoideo na porção lateral do crânio. Assim que emerge, origina o nervo auricular posterior e, logo a seguir, o cervical posterior. Após um trajeto de aproximadamente 6 mm divide-se em seus principais ramos: temporal, zigomático, bucal, mandibular e cervical. Essa região de ramificação geralmente encontra-se superior e medial ao ramo facial posterior da veia jugular externa, única responsável pela drenagem venosa da região cefálica do rato. Dessa forma, para melhor expor a origem dos ramos terminais do NF, essa veia deve ser ligada ou cauterizada, também evitando perda sanguínea desnecessária (36).

Após sua origem, todos os ramos do facial correm abaixo da fáscia superficial que recobre os músculos faciais. O ramo mandibular então dirige-se anteriormente cruzando a metade inferior do músculo masseter. Nessa topografia, durante um trajeto de 10 a 12 mm, ele não se ramifica, é superficial e de fácil identificação (28,36) (Figura 1). Após esse comprimento, divide-se em ramos que irão inervar as fibras musculares do lábio inferior e superior (36,41).

Histologicamente, o tronco do NF de ratos Wistar é monofascicular, apresentando em torno de 4650 axônios, com mínima variação entre animais (da ordem de 5%). Dentro do tronco principal, não há separação por tecido conectivo perineural até que os ramos macroscópicos também sejam visíveis, o que difere dos seres humanos, nos quais, mesmo no tronco do facial, os axônios que irão

formar os diferentes ramos já se encontram agrupados por um perineuro comum (15,36). Tal fato pode acarretar possíveis diferenças na regeneração desse nervo entre roedores e humanos (36) .

A média do número total de axônios do ramo mandibular, por sua vez, foi de 1862 (desvio padrão de 359) em investigação realizada por Mattox e Felix (36). Segundo os mesmos autores, a densidade axonal varia de 0,18- 0,19 axônios/ $\mu\text{m}^2$  (42).



Figura 1- Fotografia evidenciando ramos mandibular (seta vermelha) e bucal do nervo facial direito de rato Wistar. Reproduzido com permissão de: Costa HJZR, Salomone R, Silva CF, Costa MP, Ramos BL, Bento RF. Quantitative histological analysis of the mandibular branch of the facial nerve in rats. Acta Cirurg Bras 2012. 27(11): 747-50.

A porção infratemporal do NF de ratos é puramente eferente e motora, à semelhança do que ocorre em seres humanos. Apenas o nervo auricular posterior, que deixa o tronco principal assim q ele emerge do forame estilomastoideo, contém axônios sensitivos (36,43).

### 3.1.2 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA REGENERAÇÃO DO NERVO FACIAL

Em 1977, Esslen e Fisch descreveram a ENMG no nervo facial de humanos, considerada até hoje o mais fidedigno e objetivo método de avaliação de prognóstico da PFP (1,3,11).

Em 1987, Mattox e Felix, no trabalho clássico que descreveu os principais parâmetros da anatomia do NF de ratos, foram pioneiros em realizar ENMG com registro dos PAMCs com eletrodos de estimulação no tronco do facial, no ramo bucal e no ramo mandibular de ratos, sem, contudo, especificar ou padronizar vários parâmetros essenciais ao exame (36).

Variáveis como idade, temperatura corporal, anatomia, tipo e localização exata dos eletrodos, intensidade e frequência de estímulos e filtros utilizados necessitam ser padronizados para gerar uniformidade na ENMG (28,44).

Além disso, para efeito de comparação de resultados de ENMG, o estímulo utilizado deve ser sempre o supramáximo, ou seja, aquele a partir do qual aumentos na intensidade não produzem aumentos no potencial de ação, garantindo, assim, que os PAMCs registrados sejam os maiores capazes de serem gerados por aquele nervo (28,30,45).

Em 2012, Salomone et al. padronizaram um modelo eletrofisiológico de avaliação da regeneração do NF em ratos que é, ao mesmo tempo, prático, pouco invasivo e de grande reprodutibilidade. Nesse modelo, eletrodos de agulha são colocados na pele, imediatamente acima do trajeto do ramo mandibular do NF de ratos, visto por transparência. O eletrodo de captação é

posicionado a 2 mm, e o de estimulação, a 22 mm do lábio inferior. O registro dos PAMCs é sempre feito com o estímulo supramáximo (28).

O grande debate que existe na avaliação do facial em ratos, hoje, é a necessidade da realização de uma avaliação funcional comportamental. Muitos esforços têm sido realizados nesse sentido por diferentes grupos (27,46).

No passado, foram propostas várias escalas de quantificação subjetiva de parâmetros comportamentais para avaliar parâmetros como a simetria facial ou a movimentação de vibrissas em ratos (27,47).

Os métodos mais recentes surgiram com o intuito de conferir mais objetividade às avaliações. Dessa forma, Hadlock et al. (2007) propuseram um método de fixação da cabeça que permite avaliação de movimento de vibrissas com auxílio de um sistema computadorizado. As desvantagens de seu método são a pouca praticidade, o risco de infecções do sistema de fixação (parafusos de titânio inseridos no crânio do animal) e a necessidade de um aparato tecnológico pouco acessível (29,46).

Em 2015, Huang et al. publicaram um método videográfico de monitorização que dispensa o uso de fixação da cabeça. Com o uso de uma câmera de vídeo e um *software* de análise de imagens, foi realizada a marcação de algumas vibrissas e seus movimentos quantificados. Além dos recursos tecnológicos necessários, o método retrocedeu em termos de objetividade, uma vez que os parâmetros analisados são marcados pelo examinador (48).

### 3.1.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA REGENERAÇÃO DO NERVO FACIAL

Amostras histoquímicas de áreas nervosas transversais podem ser quantificadas com relação ao diâmetro do axônio e da fibra, espessura e densidade da mielina, número de axônios ou densidade axonal (30,42,49–52).

Segundo Mayhew e Sharma, em troncos nervosos monofasciculares, como o ramo mandibular do facial, uma amostra randômica constituída por 8% da área total da secção de um nervo fornece dados histológicos tão precisos em relação ao número total de axônios e diâmetro médio das fibras axonais quanto avaliar a totalidade das fibras mielínicas do nervo, com a vantagem óbvia de redução significativa do tempo de medição (53).

Em 2012, Costa et al. padronizaram as medidas normais da quantidade de axônios, bem como do diâmetro axonal do ramo mandibular do NF de ratos Wistar (42). Além disso, defendem que a análise qualitativa, embora subjetiva, é uma interessante ferramenta quando aliada à análise quantitativa, dando ideia sobre a qualidade do tecido neural regenerado (42,50).

Apesar de ainda serem trabalhosos, os softwares (semi) automatizados disponíveis atualmente tem facilitado a análise morfológica. A técnica digital atual permite a contagem e medição das fibras mielinizadas a partir do software de análise de imagem (30,51).

Há muita divergência quanto ao parâmetro mais fidedigno do estudo histológico na representação da regeneração neuronal. Para Vasconcelos e Gay-Escoda, o número total de axônios é o principal a ser levado em

consideração (54). Na visão de May e Shaitkin, as variáveis fundamentais seriam o diâmetro axonal, a medida do grau de mielinização das fibras nervosas, e a espessura e o comprimento da bainha de mielina (9). Já Miyamoto defende que a medida histológica mais confiável é a densidade da mielina (52).

Por outro lado, a histologia não fornece informações sobre a função fundamental do nervo, ou seja, a condução do sinal elétrico. Existe concordância entre autores que os parâmetros histológicos não necessariamente se traduzem em melhora funcional. Outras desvantagens conhecidas são: viés relacionado à medição, que em nenhum caso é completamente automatizada; viés relacionado à amostragem, ou seja, obliquidade do plano de secção e retração das margens da fibra e outros vieses relacionados à técnica, a saber, encolhimento e distorção das células (27,42,53).

### **3.2 TÉCNICAS DE REPARO DO NERVO FACIAL**

As tentativas mais precoces de reparo de lesões de nervos periféricos de que se tem registro datam do século XIII (8). No entanto, a primeira tentativa de sucesso razoável ocorreu com Bunnell em 1927, ao realizar uma sutura término-terminal do facial intratemporal (27,55). O aumento do número de lesões neurais que ocorreu por ocasião da II Guerra Mundial estimulou grandemente a pesquisa a respeito da regeneração de nervos periféricos, no entanto, até a atualidade, nenhuma técnica conhecida traz resultados plenamente satisfatórios (2,27,56,57).

### 3.2.1 TÉCNICAS CIRÚRGICAS DE REPARO NEURAL

Especificamente em relação ao reparo cirúrgico do nervo facial, a anastomose término-terminal continua sendo o padrão ouro, podendo ser realizada por cola de fibrina ou por suturas (8,57,58). Idealmente, ela seria realizada livre de tensão e imediatamente após o dano, em cotos neurais frescos, e com o nervo situado sobre um apoio (57). Quando a distância entre os cotos é demasiada, o estiramento ocasiona rarefação do perineuro, comprometimento do suprimento vascular e aumento da atividade de fibroblastos com aumento do tecido cicatricial, todos danosos à regeneração neural, preferindo-se, nesses casos, o uso de enxerto (57,59).

A cola de fibrina, constituída de derivados do plasma que promovem a proliferação de fibroblastos, foi largamente pesquisada, desde a década de 40 (3,57,60,61).

Bento e Miniti, estudando o uso de cola de fibrina, suturas e simples aproximação espacial entre cotos neurais do nervo facial intratemporal de gatos constataram que, apesar de suturas e cola terem efeitos comparáveis em termos histológicos e funcionais, eletrofisiologicamente, a cola de fibrina foi superior a qualquer outro método usado (3). Posteriormente, os mesmos autores usaram a cola de fibrina para promover anastomose de segmentos avulsionados do NF pós-trauma em seres humanos. Nesse contexto, o uso da cola também mostrou-se um método eficaz e tecnicamente simples, superando importantes desafios da sutura, como a execução em pequenos espaços e a necessidade de um

treinamento cirúrgico específico. Isso adquire especial importância quando se considera que:

- no trajeto do nervo facial predominam espaços bastante restritos;
- muitas vezes, após traumas, o reparo tem que ser realizado por médicos sem treinamento em microcirurgia;
- é de especial interesse nos casos de trauma que o reparo neural seja ágil (16).

Os achados de Bento e Miniti foram corroborados por Bozrog et al. que usaram cola de fibrina para anastomose de cotos do NF produzidos por cirurgias de exérese tumoral, evidenciando facilidade de execução da anastomose no ângulo ponto-cerebelar (62).

Após revisão sistemática de literatura, Sameem et al (2011) referiram que, na maioria dos modelos animais pesquisados, a cola de fibrina isoladamente teve desempenho igual ou superior à sutura (61).

Em relação à sutura, Wilgis (1991), Matsuyama (2000), Dvali (2003) e Kim (2016), referem que as epineurais são as mais indicadas, por serem as que menos comprometem a arquitetura habitual do fascículo nervoso ou seu suprimento sanguíneo, e serem de mais fácil e rápida execução (57,59,63,64). Adicionalmente, o correto posicionamento da porção proximal e distal do nervo de forma que haja correspondência entre fascículos é primordial e pode ser auxiliada por parâmetros existentes na superfície do epineuro, como vasos sanguíneos (59,63).

Lubiatowski (2008) descreveu uma variação da técnica de sutura epineural que acelera a regeneração em nervo ciático de ratos. Em seu método,

o epineuro do coto distal é retraído em 2mm e os fascículos neurais são amputados, de forma que o epineuro excedente pode ser usado para revestir o coto proximal após sutura simples. A explicação para o incremento na regeneração seria a criação de um microambiente favorável no interior do espaço delimitado pelo epineuro do coto distal (65). Tal procedimento teria, porém, a desvantagem teórica de dificultar o acesso de qualquer substância colocada nos cotos neurais para melhorar a reparação, caso da sutura química detalhada adiante.

O número ideal de pontos simples para unir os cotos neurais não é consenso, mas diversos autores falam em não mais que 2 a 4, para minimizar reações indesejadas ao fio de sutura e formação de tecido cicatricial excessivo (26,57,59,65) . O fio mais apropriado para as suturas em nervos periféricos é o mononylon, cujo número pode variar de 8-0 a 10-0, a depender do diâmetro do nervo em questão (26,51,57,59) .

A sutura término-terminal de cotos neurais tem as desvantagens de possíveis reações de corpo estranho ao fio e dano aos axônios causado por manipulação intensa do nervo durante o processo ou pela agulha, além de não ser facilmente realizada em espaços pequenos (3,57,66). O uso da cola de fibrina supera esses entraves (3).

Dito isso, é importante frisar que as melhores técnicas de reparo neural após neurotome, na mão de cirurgiões experientes, ainda produzem resultados insatisfatórios em muitos casos, traduzidos em aproximadamente 75% dos casos, por uma gradação de, no máximo, House- Brackmann III (18). Devido a isso, mecanismos alternativos de aposição de cotos neurais avulsionados são alvo de contínua pesquisa científica.

Atualmente, o conceito vigente é que a possibilidade de uma neurorrafia sem sutura usando material totalmente biocompatível seria o ideal, mas esbarra em preocupações com a força da anastomose obtida e com possíveis reações inflamatórias (57).

### 3.2.2 A SUTURA QUÍMICA

#### 3.2.2.1 Conceitos da regeneração de nervos aplicados à sutura química e o papel do íon $\text{Ca}^{+2}$

Os mecanismos envolvidos na regeneração axonal após uma secção ou compressão aguda são objeto de estudo há mais de um século, com a publicação, em 1913, de um tratado extremamente detalhista para os padrões da época, por Ramon y Cajal (67).

Após uma secção neural aguda, a porção proximal do axônio pode sobreviver e regenerar-se através de brotos axonais, sendo visto uma expansão volumétrica associada a aumento do metabolismo celular (1,2), ao passo em que a porção distal invariavelmente degenera em mamíferos, aves e reptéis (57,68,69).

O primeiro a descrever a degeneração que ocorre como consequência da interrupção da continuidade do axolema foi Waller, em 1850, estudando o nervo hipoglosso de sapos. Como consequência, esse fenômeno ficou conhecido com degeneração walleriana (69,70). A degeneração walleriana caracteriza-se pela desintegração e reabsorção total do segmento distal por células de Schwann fagocitárias neoformadas. Na junção neuromuscular há um aumento da

liberação de acetilcolina e nas fibras musculares os núcleos tornam-se arredondados e centralizados, com aumento dos nucléolos e atrofia progressiva (1,2).

Para sobreviver, a extremidade axonal proximal precisa ser capaz de formar de forma relativamente rápida uma barreira em sua extremidade aberta, de forma a evitar mudanças tóxicas na concentração de íons e macromoléculas dentro do citoplasma. Claramente, esse processo precede qualquer esforço de regeneração por parte do axônio (19,20,67).

Outros fatores cruciais, mas mais tardios, para a regeneração neural incluem restabelecimento das funções axonais (tais como potencial de ação transmembrana e transporte de moléculas através do axolema) e reconexão às células-alvo, constituídas, no caso do facial, por células musculares da face (20).

Segundo Fishman et al. (1990), logo após uma secção aguda de axônio gigante de lula, aparecem, na extremidade axonal aberta, múltiplas vesículas que tendem a vedá-la. A origem dessas vesículas, à época, não ficou clara, mas sua formação demonstrava ser dependente do influxo de íons  $\text{Ca}^{+2}$  (71).

No começo da década de 90, Xie e Barrett publicaram um estudo realizado em cultura de neurônios hipocâmpais de rato. Após uma transecção aguda, há um acúmulo de vesículas na extremidade neural proximal, cuja formação é dependente do influxo de íons  $\text{Ca}^{+2}$ . Ainda, de acordo com as observações dos autores, o aumento da concentração extracelular de cálcio, até certo ponto, promove a formação das vesículas (25).

Lichstein et al. (1994), após experimentos com axônios gigantes de minhocas e lulas determinaram que há, após uma secção axonal, constrição da extremidade proximal aberta, permanecendo, entretanto, uma descontinuidade

do axolema. Na sequência, ocorre a oclusão dessa extremidade por dois processos: migração de numerosas vesículas formadas dentro do axoplasma e surgimento de estruturas membranosas oriundas da delaminação da mielina. Ambos os processos seriam dependentes de íons  $\text{Ca}^{+2}$ . A vedação da extremidade axonal aberta pelas vesículas pode ocorrer tão rápido quanto 60 min, mas em até 24 horas após o evento inicial, as vesículas e estruturas membranosas desaparecem para ceder lugar a uma membrana plasmática contínua. Em mais 24 horas, surgem brotos neurais a partir do axolema restabelecido (19,20).

Eventos semelhantes foram observados em axônios gigantes de lagostins, com a formação de numerosas vesículas no axoplasma que vedam as extremidades após uma ruptura aguda do axolema. Os autores defendem que as vesículas seriam oriundas do rearranjo de membranas de organelas citoplasmáticas, notadamente o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, da própria membrana plasmática e da delaminação da mielina (19).

O surgimento das vesículas responsáveis pela vedação de extremidades axonais lesionadas é um processo dependente do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$ . A função do  $\text{Ca}^{+2}$  nesse contexto é de ativar uma série de proteínas e enzimas envolvidas na fusão de membranas biológicas, entre as quais se destacam as calpaínas (19,22,24) . Dessa forma, o  $\text{Ca}^{+2}$  não só participa na formação das vesículas como também promove a adesão entre as vesículas e dessas com o axolema (22,25,26,72).

Apesar dos processos acima terem sido mais amplamente estudados em seres inferiores, existem evidências suficientes para estabelecer que esse processo reparativo manteve-se em seres filogeneticamente superiores, como

os mamíferos, graças a experimentos realizados com neurônios de ratos em cultura, modelos de células neuronais de mamíferos ou nervo o ciático de ratos (22,71–74).

Segundo Yoo et al. (2004), experimentos com um modelo de célula neuronal de mamíferos (B104, derivada de neuroblastoma de ratos) permitem afirmar que, após um período de tempo variável de 20-60 min, axônios seccionados degeneram mesmo proximalmente se são incapazes de estabelecer uma barreira no plasmalema. Nesse processo, o  $\text{Ca}^{+2}$  teria funções antagonicas: estimular calpaínas e outras proteases, que, ao mesmo tempo em que promovem a fusão de vesículas e estruturas membranosas para restabelecer a continuidade do axolema, também funcionam como gatilhos para reações promotoras de morte neuronal particularmente se esse incremento no  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular ocorrer nas proximidades do corpo celular. Dessa forma, se a secção neural ocorre longe do corpo celular, o influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  através da descontinuidade da membrana resultante não é suficiente para aumentar significativamente a concentração do íon nas suas proximidades, e as chances de sobrevivência do neurônio são maiores. Com essas descobertas, afirmam que está explicado o motivo de secções axonais que ocorrem nas proximidades do corpo celular mais frequentemente levarem à morte neuronal (75).

### 3.2.2.2 O polietilenoglicol na fusão de membranas biológicas

O polietilenoglicol (PEG) é um poliéter sintético, biodegradável, solúvel em água e em muitos solventes orgânicos, representado pela fórmula química da figura 2 (76).

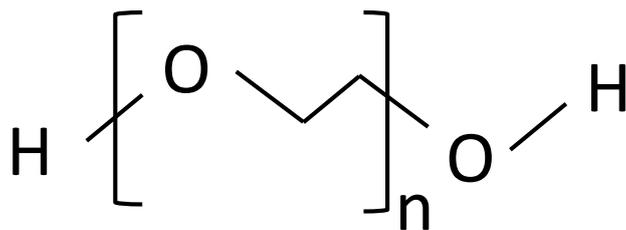


Figura 2- Fórmula química do polietilenoglicol

Desde a década de 70, a capacidade do PEG de promover a fusão de membranas biológicas tem sido amplamente utilizada em culturas de células para processos de hibridização (21,77–80).

Quando utilizado em fusão celular, o PEG apresenta as vantagens de ser capaz de unir células pertencentes a organismos muito diversos, de espécies ou até mesmo reinos diferentes, com mínima toxicidade (77).

Na década de 90, estudos envolvendo o mecanismo de ação do PEG propuseram que a desidratação provocada pelo polímero, que recruta água do ambiente, desestabiliza a fase aquosa das membranas lipídicas vicinais, e causa mesclagem de seus elementos. Por ocasião da reidratação, as partículas constituintes do plasmalema são reorganizadas, agora, unidas (77,80,81).

Wojcieszyn et al. (1983) propuseram que, no processo de fusão lipídica, o PEG age duplamente: primeiro, promovendo o contato próximo entre as membranas plasmáticas; segundo, levando à desestabilização dessas membranas, de forma que, no processo de reorganização, acabam sofrendo mesclagem com conseqüente união de seus elementos lipídicos (77).

A partir de 1986, Bittner e colaboradores comunicaram a fusão bem-sucedida de axônios gigantes de minhocas e lagostins usando PEG. No caso

dos axônios de minhoca, após secção, as extremidades avulsionadas exibiram fusão com alta taxa de sucesso (80-100%) (21,82).

Em 1999, Shi et al. publicaram estudo no qual comprovam seccionamento de axônios da medula espinhal de cobaias in vitro, seguida de fusão dos cotos axonais pelo PEG, com restauração do potencial de ação. Pela primeira vez, esse efeito foi observado em axônios de mamífero (81).

Ademais, o efeito do PEG de aproximar e vedar cotos axonais avulsionados é muito rápido (ocorrendo em até 1s), e ocorre por mecanismo independente da concentração de  $Ca^{+2}$  (67).

Luo e colaboradores identificaram que o PEG, ao promover a fusão precoce de membranas axonais, tem ação anti-inflamatória, diminuindo a produção dos radicais livre de oxigênio que se segue à lesão neural. O acúmulo dos radicais livres é um dos promotores da degeneração da fibra neural consequente à neurotmesa. Logo, além de promover a fusão axonal, o PEG cria um microambiente favorável à regeneração (83).

### 3.2.2.3 O papel do azul de metileno na fusão de membrana biológicas

O azul de metileno (AM) foi primeiro sintetizado na Alemanha em 1876 para desempenhar a função de corante na indústria têxtil. Em 1891, foi estabelecido que o composto também era capaz de corar e inativar alguns micro-organismos, sendo empregado com sucesso no tratamento da malária. Ao longo dos anos, suas aplicações na medicina tornaram-se vastas, podendo ser citados

o tratamento da metemoglobinemia e da encefalopatia por ifosfamida, o uso como ferramenta diagnóstica para marcação de tecidos, como trajetos fistulosos, por exemplo, e o uso como corante em preparações histológicas, dentre muitas outras (84).

A forma reduzida do AM é designada de leucoAM e apresenta-se sob a forma de um pó transparente. Junto com o AM, o leucoAM forma um conjunto de oxirredução, que se difunde livremente pelas membranas celulares na forma reduzida, e é oxidado dentro do citoplasma para a forma do AM, incapaz de atravessar a membrana plasmática (84).

Spaeth et al (2012) demonstraram que o evento de transecção neuronal estimula a oxidação citosólica. Até certo ponto, essa oxidação promove a fusão das vesículas que irão reparar o dano da membrana plasmática, conforme já discutido. Por interferir com esse processo, antioxidantes como AM e metionina são capazes de retardar a fusão de vesículas necessária ao restabelecimento da função de barreira do plasmalema (67).

Dessa forma, após uma secção neural aguda realizada em células derivadas de neuroblastoma ou do nervo ciático de ratos, a imersão em solução de Krebs livre de  $\text{Ca}^{+2}$  adicionada de azul de metileno foi capaz de retardar o processo de fusão vesicular associada à vedação da extremidade neuronal aberta (67). Para esse efeito, provavelmente concorreram não só a deprivação de  $\text{Ca}^{+2}$  como também as propriedades antioxidantes do AM.

### 3.2.2.4 O procedimento de sutura química

Em 2012, Bittner et al publicaram o primeiro experimento em que, unindo os conhecimentos moleculares adquiridos com a investigação da regeneração axonal às conhecidas propriedades do PEG sobre a fusão de membranas biológicas, estabeleceram um método capaz de promover a recuperação funcional imediata de nervos ciáticos de ratos submetidos a lesões do tipo secção ou compressão seguida de avulsão (26) .

Nesse estudo, o nervo ciático dos animais do grupo que recebeu o tratamento integral era submetido imediatamente aos seguintes procedimentos após a injúria:

- aplicação de solução de Krebs sem  $\text{Ca}^{+2}$  contendo azul de metileno ou melatonina;
- sutura simples dos cotos com mononylon 10-0;
- aplicação de solução de PEG;
- aplicação de solução de Krebs contendo  $\text{Ca}^{+2}$ .

Em relação aos animais do grupo controle, os animais tratados com a fusão por PEG (*PEG-fusion*), aqui denominada de sutura química, exibiram uma recuperação funcional mais rápida, mantendo-se até 12 semanas após o procedimento (26,72).

Nesse contexto, a depleção de cálcio no meio extracelular pela lavagem com solução de Krebs isenta de  $\text{Ca}^{+2}$  antes das suturas com fio funcionaria como inibidora da formação de vesículas e da vedação do axolema enquanto estavam sendo realizadas as suturas término-terminais (26,67). O azul de metileno

também teria agido como inibidor da agregação das vesículas, conforme demonstrado em experimentos prévios *in vitro* (67,85).

Após as suturas, a aplicação de solução de PEG promoveria a fusão das membranas dos segmentos neurais proximal e distal já aproximadas pelos fios de sutura. A seguir, a adição de solução contendo  $\text{Ca}^{+2}$  restauraria a concentração do íon a níveis adequados para permitir a formação de vesículas que então vedariam quaisquer aberturas remanescentes no axolema (26,67,85).

## **4 MÉTODO**

### **4.1 DESENHO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS**

Trata-se de estudo experimental, prospectivo, com animais.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob o número 414/12 em 27 de fevereiro de 2013 (Anexo 1).

Os ratos não sofreram ferimentos ou procedimentos desnecessários, respeitando-se as normas éticas postuladas pelo Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP (86).

### **4.2 LOCAL E AMOSTRA DO ESTUDO**

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM 32) e no Laboratório de Habilidades Cirúrgicas da Otorrinolaringologia da FMUSP.

Foram utilizados 32 ratos machos da raça Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos, pesando entre 250- 300g no início do estudo, fornecidos e mantidos pelo Centro de Bioterismo da FMUSP. Ao longo de todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo 3 indivíduos, em ambientes com temperatura e umidade controlados e, exceto pelo jejum pré-operatório de 4

horas, receberam água e ração à vontade, trocadas diariamente na ocasião da limpeza das gaiolas.

#### **4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

No tempo zero (t 0), todos os animais foram anestesiados e submetidos à avaliação neurofisiológica através do teste de neurocondução motora do ramo mandibular do nervo facial.

Após o exame de eletroneuromiografia, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos contendo 8 animais cada, sendo:

**Grupo 1 (G1):** Ratos submetidos à dissecação do ramo mandibular do nervo facial direito, seguida de secção a 20 mm da rima labial e sutura simples término-terminal dos cotos como mononylon 10-0, segundo técnica descrita por Bittner et al. (2012), com 3 pontos de sutura em cada nervo.

**Grupo 2 (G2):** Ratos submetidos à dissecação do ramo mandibular do nervo facial direito, seguida de sutura semelhante ao grupo 1, acrescida de sutura química, com PEG e AM, segundo técnica descrita por Bittner et al. (2012).

**Grupo 3 (G3):** Ratos submetidos à dissecação do ramo mandibular do nervo facial direito, seguida de secção a 20 mm da rima labial e sutura semelhante ao grupo 1, acrescida de solução de AM.

**Grupo 4 (G4):** Ratos submetidos à dissecação do ramo mandibular do nervo facial direito, seguida de secção a 20 mm da rima labial e sutura semelhante ao grupo 1, acrescida de solução de PEG.

Passadas 3 e 6 semanas dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos novamente à avaliação funcional por teste de condução nervosa. Ao final das 6 semanas, após a ENMG, os NFs operados foram colhidos para a análise histológica e os animais foram sacrificados por injeção intracardíaca de KCl a 10% enquanto estavam anestesiados.

Na figura 3 está representada a cronologia do experimento.

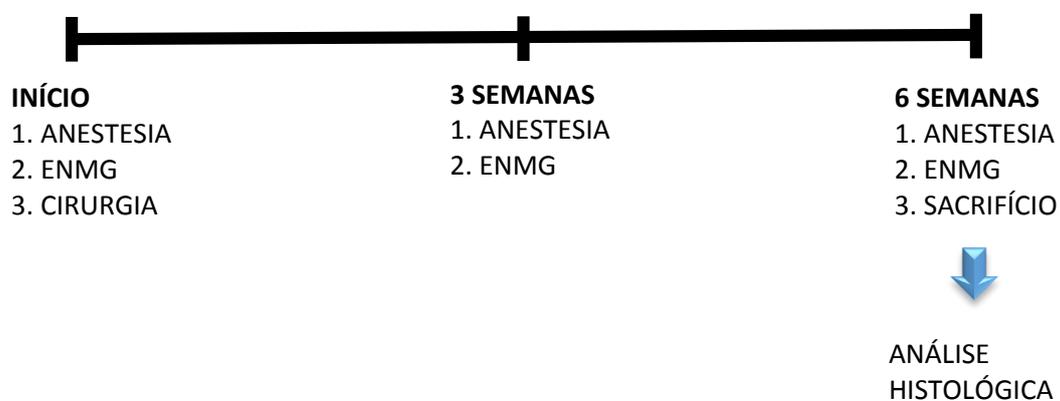


Figura 3- Representação esquemática da cronologia experimental.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA NEUROCONDUÇÃO MOTORA

A avaliação de neurocondução motora utilizada seguiu o protocolo descrito anteriormente por Salomone et al (2012), empregando a ENMG (28).

A saber, após anestesia com a aplicação intraperitoneal de hidrato de cloral a 10% (400mg/kg), os animais receberam dipirona (50mg/kg) e penicilina cristalina (50.000UI/kg) também intraperitonealmente. A seguir, foram posicionados em decúbito lateral direito e submetidos à antissepsia do sítio de interesse com solução de gluconato de clorexidina degermante a 2% (Riohex<sup>®</sup>, São José do Rio Preto, SP, Rioquímica). Seguiu-se a tricotomia da região correspondente ao ramo mandibular do nervo facial direito com lâmina de bisturi n<sup>o</sup> 23, individual e descartável.

A técnica utilizada para obtenção dos potenciais de ação musculares compostos consistiu no uso de um eletromiógrafo portátil Neurosoft<sup>®</sup> (Ivanovo, Russia) modelo Neuro-MEP-Micro<sup>®</sup> (Neurosoft<sup>®</sup>; Ivanovo, Russia) acoplado a um computador portátil HP (HP, Hewlett-Packward, Palo Alto, CA, EUA) modelo Pavillion dv5<sup>®</sup> por uma entrada universal serial (USB).

Para o registro dos potenciais de ação muscular compostos (PAMCs), foram utilizados eletrodos de agulha subdérmicos, parcialmente revestidos, medindo 12mm de comprimento e 0,35mm de diâmetro da marca Spes Medica<sup>®</sup> (Spes Medica Sri<sup>®</sup>, Battipagha, Italia<sup>®</sup>). O eletrodo de captação foi locado a uma distância de 2 mm da comissura labial e do lábio inferior e o de estimulação, a uma distância de 20 mm do eletrodo de captação, diretamente sobre o ramo mandibular, conforme pode ser visualizado na figura 4.

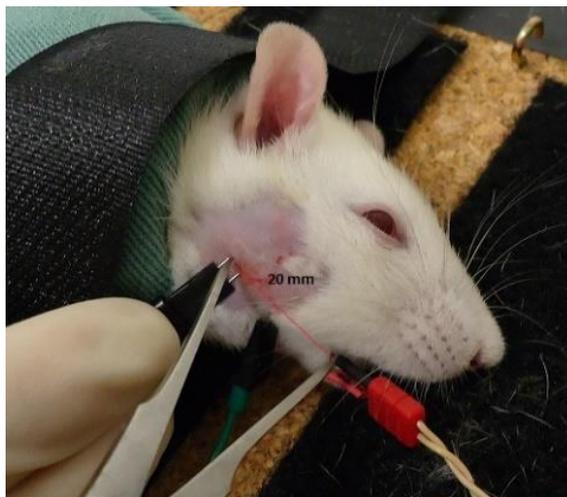


Figura 4 - Fotografia de rato sendo submetido a eletroneuromiografia do ramo mandibular do nervo facial. Reproduzido com permissão de: Salomone R, Costa HJZR, Rodrigues JRF, Reis e Silva SM, Orando PC, Bento RF. Assesment of a neurophysiological model of the mandibular branch of the facial nerve in rats by electromyography. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2012. 121(3): 179-84. Copyright © [2012] (Sage Publishing).

O eletromiógrafo foi configurado (filtro passa alto 10Hz, filtro passa baixo 10 KHz, filtro notch desligado, margem de entrada do sinal de 60mV e taxa de amostragem de 10KHz) e a visualização e análise dos PAMCs, realizados com o software Neuro- MEP Net<sup>®</sup> versão 2.4.23.0 (Neurosoft<sup>®</sup>; Ivanovo, Russia). Na primeira ENMG de cada animal, no t 0, foi aplicado o estímulo de 1,5 mA e depois estímulos múltiplos de 0,5 mA, até ser identificado o estímulo supramáximo. As ENMGs subsequentes foram realizadas sempre com o estímulo supramáximo identificado para cada animal. A amplitude, em mV e a latência e duração, em ms, dos PAMCs produzidos pelo estímulo supramáximo foram documentados a cada avaliação.

Com o propósito de evitar contaminações das respostas elétricas por alterações anatômicas, foram excluídos os animais que apresentaram ramos do nervo mandibular para o lábio superior, ramos do nervo bucal para o lábio inferior e/ou ramos interligando esses ramos.

## 4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

No t 0 de cada experimento, após a ENMG, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico experimental ainda sob anestesia. Todos os grupos foram submetidos a uma incisão de 20mm na região previamente tricotomizada, na mesma direção do trajeto do ramo mandibular do facial direito, com lâmina de bisturi. A incisão ficou aberta por um afastador de pálpebras ortostático durante o procedimento, realizado sob visão com microscópio óptico (Carl Zeiss Surgical GmbH®, Oberkochen, Germany) com lente de 250 mm e aumento de 16x. Procedeu-se à dissecação por planos até a exposição da glândula parótida e identificação dos ramos bucal e mandibular do nervo facial. Em todos os animais, o ramo mandibular foi submetido à secção transversal com lâmina de bisturi n° 23 a 10mm do ponto de onde emerge da parótida. Para o restabelecimento da continuidade do ramo mandibular do facial, os diferentes grupos receberam os tratamentos descritos a seguir:

- Os animais pertencentes ao G1 foram submetidos apenas à sutura simples com mononylon 10-0 (3 pontos de sutura por nervo, no perineuro).

- Os animais do G2 foram submetidos à aplicação de solução de Krebs pobre em  $Ca^{+2}$  (composição em mM: 0,5 EGTA, 99 NaCl, 5 KCl, 1,2  $KH_2PO_4$ , 1,3  $MgSO_4$ , 26  $NaHCO_3$ , 10 ascorbato de Na, 10 dextrose, pH de 7,35 e 319 mOsm em água bidestilada), contendo 100  $\mu M$  de azul de metileno, sobre o nervo, antes da reaproximação dos cotos com suturas (à semelhança do grupo 1), por um período de 3 min. Após as suturas, foi aplicada solução hipotônica 500 mM de PEG (peso molecular médio de 400) em água bidestilada por 2 min. A seguir, foi aplicada solução de Krebs isotônica contendo  $Ca^{+2}$  (composição em mM: 124

NaCl, 5 KCl, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 MgSO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 ascorbato de Na, 10 dextrose, 2 CaCl<sub>2</sub>, pH de 7,35 e 351 mOsm em água bidestilada) por período de 3 min.

- Os animais do G3 foram submetidos à aplicação de solução de Krebs pobre em Ca<sup>+2</sup> (composição em mM: 0,5 EGTA, 99 NaCl, 5 KCl, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 MgSO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 ascorbato de Na, 10 dextrose, pH de 7,35 e 319 mOsm em água bidestilada), contendo 100 µM de azul de metileno, sobre o nervo antes da reaproximação dos cotos com suturas (à semelhança do grupo 1), por um período de 3 min.

- Os animais do G4 foram submetidos à sutura simples com mononylon (à semelhança do grupo 1) seguida da aplicação sobre o nervo com pipeta de solução hipotônica de 500 mM de PEG em água bidestilada por 2 min.

Terminadas as suturas (físicas e químicas), as incisões cutâneas foram fechadas com fio Mononylon Ethicon® 4-0 (Ethicon®- Johnson & Johnson®).

Todos os reagentes utilizados no preparo das soluções foram oriundos da Sigma- Aldrich® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

O procedimento cirúrgico está representado esquematicamente na figura 4.

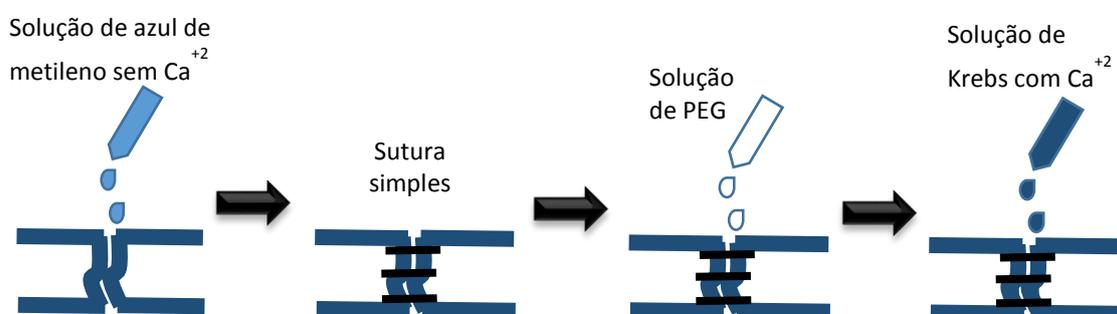


Figura 4. Esquema representativo do procedimento cirúrgico completo a que foram submetidos os animais do grupo 2.

## 4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para análise histomorfológica, após o sacrifício dos animais foi colhido um segmento do nervo mandibular de aproximadamente 5mm imediatamente distal ao ponto de secção e sutura do nervo. A porção mais proximal deste segmento foi marcada com borda reta ao passo em que a mais distal foi cortada com borda oblíqua para possibilitar sua identificação. Após sua remoção, esses segmentos foram tratados com ósmio a 2%, desidratados com etanol, infiltrados com óxido de propileno e incluídos com resina Epoxi® até sua polimerização. Finalizadas estas etapas, os segmentos neurais foram cortados transversalmente (0,5µm de espessura) e corados com azul de toluidina a 1%.

Para a documentação dos nervos, as lâminas dos segmentos neurais foram fotografadas (Nikon® modelo Coolpix E 955®) sob visualização em microscópio óptico com aumento de 400x (um campo de 10.000µm<sup>2</sup>). Posteriormente as imagens foram transportadas para o computador portátil e analisadas por meio do software SigmaScan Pro 5.0® (SPSS Science®, Chicago, USA).

A análise fotográfica avaliou a quantidade total de axônios mielinizados em uma área parcial do nervo (10.000µm<sup>2</sup>) e a maturação da mielina por meio da média das medidas do menor valor do diâmetro externo (incluindo a bainha de mielina) contido em uma área de 10.000µm<sup>2</sup>, sempre excluindo as fibras contíguas com as margens.

## 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra baseou-se em estudos anteriores que avaliaram a regeneração do nervo facial de ratos submetido a outros tratamentos (30,51,87).

As variáveis quantitativas (latência, duração e amplitude dos PAMCs e número e diâmetro axonal) foram expressas como média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo dentro dos grupos e nos momentos de pré-operatório (t 0), 3 semanas (t 3) e 6 semanas (t 6) após a intervenção. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a esfericidade foi verificada por meio do teste de esfericidade de Mauchly. Para as comparações das medidas entre os grupos foram utilizados a ANOVA e o teste de Kruskal-Wallis, conforme a normalidade dos dados. A ANOVA de medidas repetidas e o teste de Friedman foram utilizados para verificar o comportamento das variáveis nos diferentes momentos. Posteriormente, diferenças entre os grupos ou entre tempos dois a dois foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney ou teste t de Student, ajustados pela correção de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **5 RESULTADOS**

Os animais foram divididos em grupos ficando 8 animais em cada grupo. Um animal do G3 e um do G4 tiveram que ser excluídos do experimento por anomalias anatômicas do ramo mandibular do NF. Três animais morreram por complicações anestésicas, um de cada um dos seguintes: G1, G3 e G4. Dessa forma, ao fim dos experimentos, restaram 7 animais no G1, 8 animais no G2 e 6 animais no G3 e no G4. Em nenhum grupo houve evidências de infecção de sítio cirúrgico, úlceras neurodistróficas ou de falha em ganhar peso, o que poderia traduzir dificuldade de mastigação pelo comprometimento da musculatura mastigatória.

Em relação à intensidade da corrente elétrica utilizada para produzir o estímulo supra-máximo, os valores de todos os animais situaram-se na faixa de 1,5 a 3,5 mA e não houve diferença entre grupos ( $p= 0,9592$ ).

### **5.1 PARÂMETROS ELETROMIOGRÁFICOS PRÉ-OPERATÓRIOS E DO GRUPO CONTROLE (G1)**

#### **5.1.1 ESTUDO DA NEUROCONDUÇÃO MOTORA NO PRÉ-OPERATÓRIO**

Os valores absolutos das variáveis amplitude, latência, duração e intensidade de estimulação dos PAMCs obtidos no pré-operatório para todos os grupos estão descritos na tabela 1. Observa-se pelo exposto que não houve diferença estatística entre os valores dessas variáveis, no início do experimento.

|                | Média | Desvio-<br>padrão | Mediana | Mínimo | Máximo | p                 | p<0,05<br>vs* |
|----------------|-------|-------------------|---------|--------|--------|-------------------|---------------|
| LATÊNCIA (ms)  |       |                   |         |        |        | 0,79 <sup>υ</sup> |               |
| G1             | 1,06  | 0,15              | 1,01    | 0,90   | 1,32   |                   | -             |
| G2             | 1,21  | 0,24              | 1,05    | 0,90   | 1,69   |                   | -             |
| G3             | 1,03  | 0,12              | 1,02    | 0,87   | 1,22   |                   | -             |
| G4             | 1,05  | 0,17              | 1,07    | 0,74   | 1,22   |                   | -             |
|                |       |                   |         |        |        |                   | -             |
| AMPLITUDE (mV) |       |                   |         |        |        | 0,18 <sup>Ω</sup> |               |
| G1             | 5,07  | 1,78              | 4,14    | 3,67   | 8,10   |                   | -             |
| G2             | 6,07  | 1,27              | 6,18    | 3,95   | 7,73   |                   | -             |
| G3             | 5,87  | 2,15              | 6,62    | 2,61   | 8,30   |                   | -             |
| G4             | 3,99  | 1,27              | 3,49    | 2,67   | 5,86   |                   | -             |
|                |       |                   |         |        |        |                   | -             |
| DURAÇÃO (ms)   |       |                   |         |        |        | 0,18 <sup>υ</sup> |               |
| G1             | 4,06  | 0,98              | 4,07    | 2,67   | 5,11   |                   | -             |
| G2             | 3,92  | 0,51              | 3,81    | 3,20   | 4,89   |                   | -             |
| G3             | 3,48  | 0,33              | 3,52    | 3,04   | 3,97   |                   | -             |
| G4             | 4,25  | 0,42              | 4,34    | 3,71   | 4,71   |                   | -             |

Tabela 1- Valores de latência, amplitude e duração do potencial de ação muscular composto do ramo mandibular do nervo facial de ratos Wistar submetidos à neurotmeze do ramo mandibular do nervo facial seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) no pre-operatório. <sup>υ</sup> Teste de Kruskal-Wallis; <sup>Ω</sup>Anova; \* Testes post hoc ajustados pela correção de Bonferroni.

### 5.1.2 ESTUDO DA NEUROCONDUÇÃO MOTORA NO GRUPO CONTROLE (G1)

Os valores absolutos das variáveis amplitude, latência, duração e intensidade de estimulação dos PAMCs obtidos para o grupo controle (G1) nos três momentos de aferição estão descritos na tabela 2.

|                | Média | Desvio-padrão | Mediana | Mínimo | Máximo | p                   | p<0,05 vs* |
|----------------|-------|---------------|---------|--------|--------|---------------------|------------|
| LATÊNCIA (ms)  |       |               |         |        |        | 0,489 <sup>‡</sup>  |            |
| t 0            | 1,27  | 0,15          | 1,19    | 0,90   | 2,08   |                     | -          |
| t 3            | 1,51  | 0,20          | 1,38    | 0,77   | 2,75   |                     | -          |
| t 6            | 1,59  | 0,21          | 1,44    | 0,82   | 2,50   |                     | -          |
| AMPLITUDE (mV) |       |               |         |        |        | 0,002 <sup>†</sup>  |            |
| t 0            | 2,76  | 1,51          | 3,10    | 1,01   | 4,99   |                     | t 3, t 6   |
| t 3            | 0,84  | 0,35          | 0,74    | 0,39   | 1,39   |                     | t 0        |
| t 6            | 1,21  | 0,76          | 1,07    | 0,60   | 2,87   |                     | t 0        |
| DURAÇÃO (ms)   |       |               |         |        |        | <0,001 <sup>‡</sup> |            |
| t 0            | 3,54  | 0,23          | 3,87    | 2,67   | 4,17   |                     | t 3, t 6   |
| t 3            | 5,85  | 0,44          | 6,17    | 4,11   | 7,02   |                     | t 0        |
| t 6            | 5,22  | 0,44          | 5,02    | 3,67   | 6,96   |                     | t 0        |

Tabela 2- Valores de latência, amplitude e duração do potencial de ação muscular composto de ratos Wistar submetidos à neurotmesa do ramo mandibular do nervo facial seguida de sutura simples dos cotos, no pré-operatório (t 0), e após 3 (t 3) e 6 semanas (t 6) de pós-operatório. <sup>†</sup>Teste de Friedman; <sup>‡</sup>Anova de Medidas Repetidas; \* Testes post hoc ajustados pela correção de Bonferroni.

No grupo controle, não se verificou alteração significativa da latência dos PAMCs quando medidos no tempo zero (antes da intervenção) e após 3 e 6 semanas da intervenção.

Já em relação à amplitude do potencial de ação, verificou-se uma queda significativa de seu valor após o procedimento de neurotmesa seguida de sutura simples dos cotos, que manteve-se até 6 semanas após (p=0,002). A duração do potencial de ação, por sua vez, aumentou de forma significativa entre o pré-operatório e 3 e 6 semanas de pós-operatório (p< 0,001).

## 5.2 AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO NEURAL COM SUTURA QUÍMICA

Os possíveis efeitos da sutura química sobre a regeneração neural após a secção neural aguda foram avaliados através de dois métodos objetivos: um funcional (estudo da neurocondução motora) e um histológico quantitativo.

### 5.2.1 COMPARAÇÃO DA NEUROCONDUÇÃO MOTORA ENTRE GRUPOS APÓS 3 SEMANAS DE PÓS-OPERATÓRIO

Após 3 semanas da intervenção, a eletroneuromiografia mostrou que a latência dos PAMCs entre os grupos G1, G2, G3 e G4 não sofreu variações significativas ( $p= 0,451$ ).

No mesmo período, porém, foi possível observar uma diferença significativa entre as amplitudes e duração dos PAMCs entre grupos.

No tocante à amplitude, o grupo G2 exibiu queda menor da amplitude em comparação a todos os demais grupos (G2 x G1,  $p<0,0001$ ; G2 x G3,  $p= 0,0018$ ; G2 x G4,  $p=0,0009$ ). Não houve diferença estatística entre os valores da amplitude entre os grupos G1, G3 e G4 com 3 semanas de pós-operatório.

A duração dos PAMCs também variou entre grupos no t 3. Em G2, a duração foi significativamente menor que em G1, G3 e G4 ( $p= 0,0006$ ). Nesse contexto, os grupos G1, G3 e G4 não exibiram diferença entre si. Os resultados no t 3 estão expostos na tabela 3 e no gráfico 1.

|                | Média | Desvio-<br>padrão | Mediana | Mínimo | Máximo | p                    | p<0,05 vs* |
|----------------|-------|-------------------|---------|--------|--------|----------------------|------------|
| LATÊNCIA (ms)  |       |                   |         |        |        | 0,695 <sup>Ω</sup>   |            |
| G1             | 1,59  | 0,65              | 1,53    | 0,96   | 2,75   |                      | -          |
| G2             | 1,38  | 0,50              | 1,15    | 0,87   | 2,20   |                      | -          |
| G3             | 1,42  | 0,41              | 1,41    | 0,96   | 2,10   |                      | -          |
| G4             | 1,84  | 0,63              | 1,89    | 0,82   | 2,50   |                      | -          |
| AMPLITUDE (mV) |       |                   |         |        |        | <0,0001 <sup>Ω</sup> |            |
| G1             | 1,02  | 0,32              | 1,04    | 0,56   | 1,39   |                      | G2         |
| G2             | 3,17  | 0,91              | 3,11    | 2,05   | 4,81   |                      | G1,G3,G4   |
| G3             | 1,50  | 0,52              | 1,60    | 0,87   | 2,31   |                      | G2         |
| G4             | 1,36  | 0,51              | 1,29    | 0,90   | 2,23   |                      | G2         |
| DURAÇÃO (ms)   |       |                   |         |        |        | 0,0006 <sup>Ω</sup>  |            |
| G1             | 5,85  | 1,15              | 6,17    | 4,11   | 7,02   |                      | G2         |
| G2             | 3,98  | 0,40              | 3,92    | 3,39   | 4,58   |                      | G1,G3,G4   |
| G3             | 5,60  | 0,67              | 5,79    | 4,58   | 6,29   |                      | G2         |
| G4             | 5,53  | 0,84              | 5,75    | 4,42   | 6,62   |                      | G2         |

Tabela 3- Valores de latência, amplitude e duração do potencial de ação muscular composto do ramo mandibular do nervo facial de ratos Wistar submetidos à neurotmesa do ramo mandibular do nervo facial seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) com 3 semanas de pós-operatório. <sup>Ω</sup>Anova; \* Testes post hoc ajustados pela correção de Bonferroni.

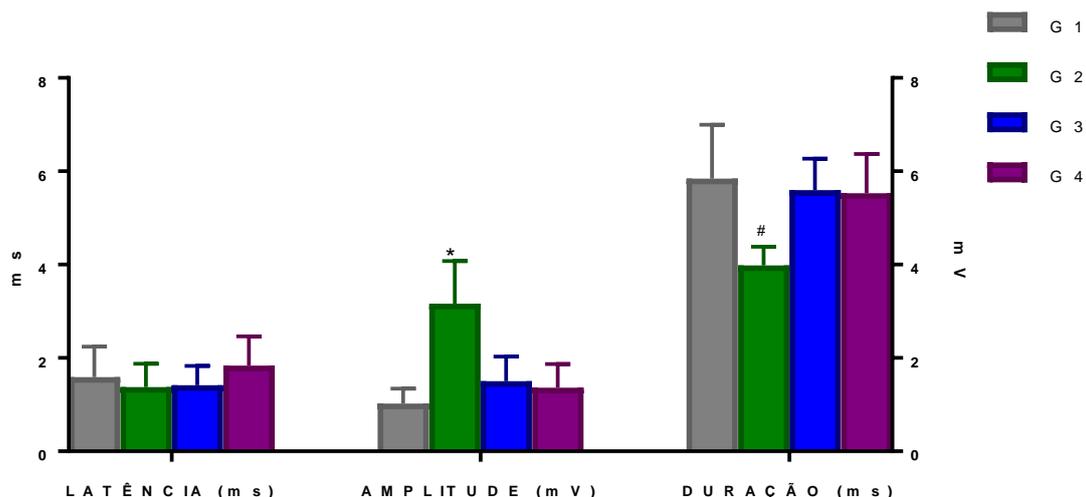


Gráfico 1- Representação dos valores de latência, amplitude e duração do potencial de ação muscular composto do ramo mandibular do nervo facial de ratos Wistar submetidos à neurotmese do ramo mandibular do nervo facial seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) com 3 semanas de pós-operatório. \* $p < 0,0001$ , # $p = 0,0006$  (Anova).

## 5.2.2 COMPARAÇÃO DA NEUROCONDUÇÃO MOTORA ENTRE GRUPOS APÓS 6 SEMANAS DE PÓS-OPERATÓRIO

Decorridas 6 semanas do procedimento de neurotmese e sutura, a eletroneuromiografia mostrou que a latência dos PAMCs entre os grupos G1, G2, G3 e G4 não sofreu variações significativas ( $p = 0,7607$ ).

Porém, novamente a amplitude e a duração dos PAMCs entre grupos variou de forma significativa.

O grupo G2 apresentou amplitude significativamente maior em comparação a todos os demais grupos (G2 x G1,  $p = 0,0002$ ; G2 x G3,  $p = 0,0085$ ;

G2 x G4,  $p=0,0184$ ). Não houve diferença estatística entre os valores da amplitude entre os grupos G1, G3 e G4 com 6 semanas de pós-operatório.

O grupo G2 também manteve duração do PAMC significativamente inferior aos demais grupos, no t 6 (G2 x G1,  $p= 0,0062$ ; G2 x G3,  $p= 0,0005$ , G2 x G4,  $p=0,0043$ ). Nesse contexto, novamente os grupos G1, G3 e G4 não exibiram diferença entre si. Os resultados no t 6 estão expostos na tabela 4 e no gráfico 2.

|                | Média | Desvio-padrão | Mediana | Mínimo | Máximo | p                   | p<0,05 vs* |
|----------------|-------|---------------|---------|--------|--------|---------------------|------------|
| LATÊNCIA (ms)  |       |               |         |        |        | 0,8588 <sup>Ω</sup> |            |
| G1             | 1,30  | 0,35          | 1,35    | 0,82   | 1,88   |                     | -          |
| G2             | 1,29  | 0,37          | 1,18    | 0,95   | 2,10   |                     | -          |
| G3             | 1,23  | 0,20          | 1,18    | 1,03   | 1,56   |                     | -          |
| G4             | 1,40  | 0,45          | 1,19    | 0,97   | 2,10   |                     | -          |
| AMPLITUDE (mV) |       |               |         |        |        | 0,0006 <sup>Ω</sup> |            |
| G1             | 1,42  | 0,70          | 1,14    | 0,87   | 2,87   |                     | G2         |
| G2             | 3,40  | 0,80          | 3,32    | 2,31   | 4,91   |                     | G1,G3,G4   |
| G3             | 2,16  | 0,63          | 2,06    | 1,33   | 2,93   |                     | G2         |
| G4             | 2,13  | 0,95          | 2,19    | 0,86   | 3,10   |                     | G2         |
| DURAÇÃO (ms)   |       |               |         |        |        | 0,0053 <sup>Ω</sup> |            |
| G1             | 5,22  | 1,17          | 5,02    | 3,67   | 7,02   |                     | G2         |
| G2             | 3,82  | 0,32          | 3,85    | 3,31   | 4,58   |                     | G1,G3,G4   |
| G3             | 5,29  | 0,81          | 5,48    | 4,23   | 6,29   |                     | G2         |
| G4             | 4,71  | 0,62          | 4,80    | 3,85   | 6,62   |                     | G2         |

Tabela 4- Valores de latência, amplitude e duração do potencial de ação muscular composto do ramo mandibular do nervo facial de ratos submetidos à neurotinese do ramo mandibular do nervo facial seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) com 6 semanas de pós-operatório. <sup>Ω</sup>Anova; \* Testes post hoc ajustados pela correção de Bonferroni.

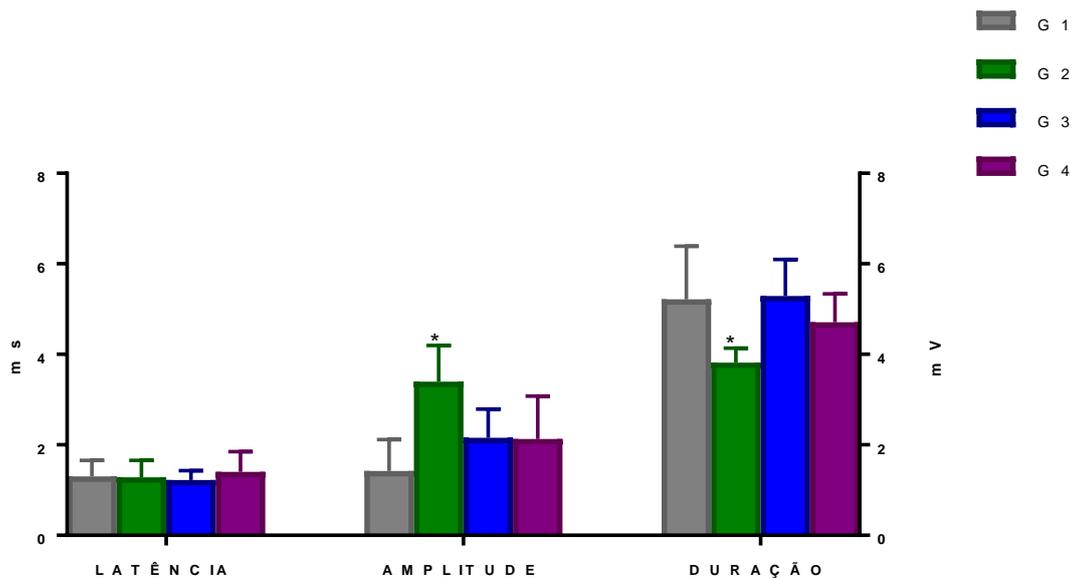


Gráfico 2- Representação dos valores de latência (em ms), amplitude (em mV) e duração (em ms) do potencial de ação muscular composto do ramo mandibular do nervo facial de ratos submetidos à neurotinese do ramo mandibular do nervo facial seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) com 6 semanas de pós-operatório. \* $p < 0,0001$  (Anova).

### 5.2.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUANTITATIVA DA REGENERAÇÃO NEURAL COM 6 SEMANAS DE PÓS-OPERATÓRIO

Na avaliação histológica, o número total de axônios numa área de  $10.000\mu\text{m}^2$  foi maior no G2 em comparação com G1, G3 e G4, que por sua vez, não exibiram diferença entre si. Da mesma forma, a média dos menores diâmetros axonais foi maior no G2 quando comparado aos demais grupos. Novamente, não houve diferença significativa entre G1, G3 e G4. Os resultados descritos estão expostos na tabela 5 e gráficos 3 e 4.

|                        | Média | Desvio-padrão | Mediana | Mínimo | Máximo | p                    | p<0,05 vs* |
|------------------------|-------|---------------|---------|--------|--------|----------------------|------------|
| <b>No DE AXÔNIOS</b>   |       |               |         |        |        | <0,0001 <sup>Ω</sup> |            |
| G1                     | 126,7 | 9,78          | 124     | 115    | 141    |                      | G2         |
| G2                     | 174,1 | 9,02          | 171,5   | 163    | 189    |                      | G1,G3,G4   |
| G3                     | 130   | 6,42          | 129,5   | 122    | 141    |                      | G2         |
| G4                     | 122,7 | 5,75          | 121     | 117    | 133    |                      | G2         |
| <b>DIÂMETRO AXONAL</b> |       |               |         |        |        | <0,0001 <sup>Ω</sup> |            |
| G1                     | 2,62  | 0,06          | 2,61    | 2,53   | 2,72   |                      | G2         |
| G2                     | 3,24  | 0,05          | 3,24    | 3,19   | 3,32   |                      | G1,G3,G4   |
| G3                     | 2,59  | 0,09          | 2,57    | 2,51   | 2,72   |                      | G2         |
| G4                     | 2,64  | 0,06          | 2,64    | 2,59   | 2,75   |                      | G2         |

Tabela 5- Numero de axônios (por campo de 10.000 $\mu\text{m}^2$ ) e menor diâmetro axonal médio do ramo mandibular do nervo facial de ratos *Wistar* submetidos à neurotmese seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) com 6 semanas de pós-operatório. <sup>Ω</sup>Anova; \* Testes post hoc ajustados pela correção de Bonferroni.

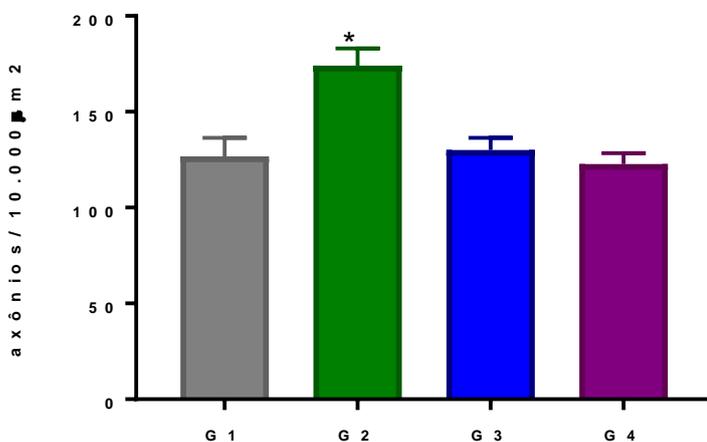


Gráfico 3- Representação do número total de axônios contidos em um campo de 10.000  $\mu\text{m}^2$  do segmento distal ao local de neurotmese do ramo mandibular do nervo facial de ratos *Wistar* submetidos à secção do nervo seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle- G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) com 6 semanas de pós-operatório. \*p<0,0001 (Anova).

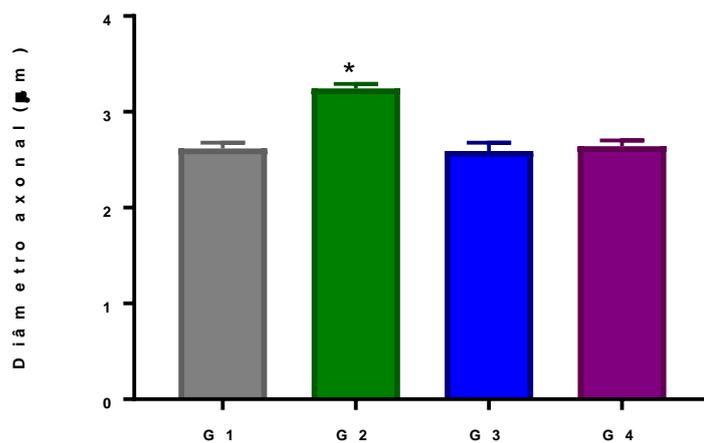


Gráfico 4- Representação do menor diâmetro axonal dos axônios contidos em um campo de 10.000  $\mu\text{m}^2$  do segmento distal ao local de neurotmeze do ramo mandibular do nervo facial de ratos Wistar submetidos à secção do nervo seguida de sutura simples dos cotos (grupo controle-G1), ou seguida de sutura simples mais sutura química (G2) ou sutura simples mais azul de metileno (G3) ou sutura simples mais polietilenoglicol (G4) com 6 semanas de pós-operatório. \* $p < 0,0001$  (Anova).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 O MODELO ANIMAL

Há muita controvérsia em torno do modelo animal mais adequado para estudos de regeneração do NF. O rato tem manuseio fácil e de baixo custo, é resistente a infecções e tolera bem os efeitos da PFP unilateral. Tais vantagens já eram amplamente conhecidas na literatura (28,36) e foram verificadas na prática durante os experimentos. De fato, com a antibioticoprofilaxia realizada (Penicilina G cristalina aplicada intraperitonealmente ao início do experimento) e cuidados simples de antisepsia, nenhum animal desenvolveu infecção de sítio cirúrgico. Além disso, todos os animais, após a cirurgia que surtiu como efeito óbvio a paralisia do ramo mandibular do NF unilateral, mantiveram o ganho contínuo de peso, como também já havia sido constatado em experimentos prévios (2,50,88).

Além das vantagens já expostas, deve ser destacada a anatomia do ramo mandibular do NF dos ratos, detentor de um segmento extratemporal bastante longo e puramente motor, com padrão de ramificação pouco variável entre indivíduos, e que cursa convenientemente abaixo da parótida e não em seu interior, facilitando a dissecação (2,36,43). Ademais, a quantidade de axônios no interior desse ramo é relativamente constante e independe da idade e peso do animal (36,43). Outra vantagem reside na semelhança estrutural com o nervo facial de humanos, que também contém fascículos, ao contrário do tronco do NF dos ratos (36,42,51).

Em 2012, estudos de Salomone et al padronizaram um método objetivo, simples, acessível e de grande reprodutibilidade para avaliar a regeneração do nervo facial baseado no ramo mandibular de ratos Wistar (28).

Todos esses fatores mencionados acima concorreram para a escolha do rato como animal a ser estudado e do ramo mandibular do NF como objeto de estudo.

Utilizaram-se exclusivamente ratos do sexo masculino, como forma de garantir que os resultados fossem livres de possíveis interferências de hormônios gonadais e, assim, mais homogêneos. De fato, apesar de não haver estudos conclusivos sobre o mecanismo de ação dos hormônios gonadais na regeneração do facial, é fato conhecido que eles têm ação trófica sobre o tecido neural (27,38,39,89). Além disso, várias publicações prévias atestam a influência do sexo dos animais sobre seu desempenho na regeneração neural. Hamsters fêmeas exibem regeneração mais rápida dos motoneurônios do NF que machos, após lesão de esmagamento (39). A testosterona já foi implicada, em ratos machos, em uma recuperação mais rápida, mas não mais intensa, sobre a função motora do NF após lesão de esmagamento. Em ratos fêmeas, esse mesmo efeito é bem mais sutil (89). Testosterona, di-hidrotestosterona e estrógeno são capazes de acelerar a recuperação funcional após lesão por esmagamento do tronco do NF em ratos (90). Sabe-se também que o ciclo estral de ratos Wistar é de quatro dias e caracteriza-se por variações marcantes dos níveis de estradiol sérico. Dessa forma, possivelmente ratos fêmeas estariam sujeitas a variações no crescimento e regeneração neurais difíceis de serem quantificadas na prática (27,38,39).

A taxa de mortalidade dos animais foi de 9,38%, compatível com a previamente descrita por Salomone et al (2013) (51).

Deve ser salientado que, apesar da necessidade de testar uma nova técnica em modelos animais previamente à sua aplicação em seres humanos, há que se ter reserva em transpor os resultados, principalmente considerando modelos de regeneração neural, que, mesmo em mamíferos, como ratos e gatos, é mais veloz e intensa que em seres humanos (3,27).

## **6.2 O MODELO DE LESÃO E REPARO NEURAL**

O trauma de NF é a segunda causa mais comum de PFP em nosso meio (91) e em séries de casos internacionais (10), fato que advoga em prol de estudar modelos de regeneração neural após lesão traumática, como esse. Em mais da metade dos casos de PFP traumática ocorre secção total (neurotmese) ou parcial do nervo (1,8,17), com prognóstico pior em termos de recuperação funcional se comparada a lesões do tipo esmagamento (18).

Optou-se, também, por produzir lesão neural através de um corte transversal, perpendicular ao maior eixo do nervo. Nesse sentido, o modelo adotado também assemelha-se à situação real, visto que, mesmo que o trauma produza fragmentos irregulares, faz-se habitualmente a regularização das bordas dos cotos para produzir fragmentos com melhor encaixe, facilitando sua sutura e coaptação (92). Embora alguns autores defendam que, ao seccionar cotos neurais para eliminar fragmentos irregulares e favorecer a sutura, façam-se cortes oblíquos, aumentando a área de contato entre os cotos (93), eles são de execução trabalhosa e dificilmente obtém-se fragmentos de bordas

completamente paralelas (92). Por esse argumento, optou-se por seccionar o nervo de forma transversal.

O fato de ter sido escolhido um modelo de secção seguido de reparo imediato tem vantagens, mas também limitações. Neurotmesa seguida de reparo imediato imita a situação real de cirurgias nas quais o nervo é vítima de lesão cortante de origem iatrogênica. Nesse caso, o ideal é o reparo imediato do NF, com anastomose término-terminal livre de tensão (94–96), à semelhança do modelo aqui adotado.

Cirurgias nas quais o NF sofre um corte programado, com vistas a uma ressecção parcial, seguida de reconstrução imediata, também assemelham-se ao método aqui investigado. As cirurgias de neurinoma do facial são um bom exemplo. A principal diferença, nesse contexto, reside na opção frequente pelo uso de enxertos para garantir a aposição livre de tensão (12,92,94), situação que não foi investigada por esse estudo.

Por outro lado, é comum a ocorrência de lesões traumáticas do facial dentro de um quadro mais amplo de politrauma. Se esse for o caso, o tratamento da PFP é frequentemente adiado até que o paciente tenha sido estabilizado. Além disso, são necessários, ao planejamento cirúrgico de abordagem do nervo, estudos de imagem e eletrofisiológicos. Portanto, em uma situação clínica real, transcorrem habitualmente alguns dias do trauma até que o NF possa ser abordado (10,12). Esse estudo, por sua vez, focou na regeneração após avulsão do nervo seguida de sutura imediata dos cotos. Como será detalhado adiante, o mecanismo de ação proposto pressupõe que as extremidades axonais estejam abertas e a degeneração walleriana ainda não tenha ocorrido. Seus resultados não podem, portanto, ser automaticamente

transpostos para situações em que o reparo neural acontece horas ou dias após o trauma agudo ao nervo.

Além disso, a regeneração neural em lesões do tipo secção seguida de sutura é dependente da habilidade do cirurgião responsável pela anastomose (97). No presente experimento, todos os animais foram operados pelo mesmo cirurgião, após treinamento específico, o que elimina esse fator de confusão.

A técnica cirúrgica ideal para o reparo neural após neurotmeze é a aproximação sem tensão das extremidades. Caso seja por microsuturas, elas devem ser simples, situadas no perineuro, e executadas com mononylon 8-0 a 10-0 (18,26,92), como realizado nos presentes experimentos. Os trabalhos que investigaram a regeneração do NF com suturas em animais com frequência adotaram método similar (37).

### **6.3 A AVALIAÇÃO FUNCIONAL**

Estudos de regeneração neural em ratos exigem um método padronizado de avaliação. Em humanos, a ENMG do NF foi inicialmente descrito por Olsen em 1975 como preditor da recuperação funcional após paralisia de Bell (98). Atualmente, segue como preditor mais fidedigno da recuperação funcional após PFP (99).

Desde os estudos no NF de ratos de Mattox e Felix (1987) o método eletrofisiológico tem obtido destaque como método objetivo. À época, esses autores estimularam o NF de ratos em vários locais (tronco, ramos mandibular e bucal) e captaram o potencial de ação nos lábios superior e inferior, sem contudo, estabelecer as medidas exatas da distância dos eletrodos aos marcos

anatômicos, ou fixar a intensidade da corrente do estímulo. Quando a distância entre os eletrodos é variável, produz falta de padronização nos parâmetros do PAMC que dependem da distância, a saber, latência e duração. Variações na intensidade do estímulo, por sua vez, implicam em alterações na amplitude dos PAMCs (2,36). Ao utilizar o estímulo supramáximo, ou seja, o menor estímulo que despolariza todos os axônios, obtém-se o registro mais intenso (o PAMC de maior amplitude) que aquele conjunto de axônios é capaz de transmitir (2). Byrne et al (2005) utilizaram um método eletrofisiológico e o estímulo supramáximo para avaliar a regeneração do NF, sem, contudo, fixar local preciso para inserção dos eletrodos (100). No presente estudo, a avaliação funcional foi efetuada fixando a intensidade do estímulo como a supramáxima e padronizando a localização dos eletrodos, de acordo com o método descrito em 2012 por Salomone et al, o que se acredita ser imprescindível para a uniformidade e comparação dos resultados entre os animais. A intensidade dos estímulos supramáximos encontrada foi semelhante em todos os grupos (variando de 1,5 a 3,5 mA) e condizente com aquela encontrada anteriormente na literatura (28).

Ainda em relação ao método de registro dos PAMCs pode-se afirmar que a exclusão dos animais que apresentavam alterações anatômicas (1 animal do G3 e um do G4 apresentaram ramificações do ramo bucal para o lábio inferior) e a dissecação e retirada de grande extensão do ramo bucal do NF contribuíram para o registro eletroneuromiográfico fidedigno, e foram realizadas também em concordância com técnica anterior descrita por Salomone et al. (28).

Os animais foram submetidos a ENMG para avaliação da regeneração neural 3 e 6 semanas após a intervenção. A depender do tipo de lesão imposta ao NF, o período de recuperação pode ser extremamente variável, sendo menor

no caso de lesões por compressão, maior se houver neurotmeose com aproximação dos cotos neurais (como no método utilizado) e maior ainda caso haja neurotmeose e hiato entre as duas extremidades neurais (37). De acordo com Szal e Miller (1975), o retorno da atividade elétrica neuronal após neurotmeose e sutura término-terminal em coelhos ocorre em um mês (101). Sabe-se também que, em ratos, em torno do 10<sup>o</sup> dia após a lesão, os brotos axonais oriundos do coto proximal invadem o coto distal, estabelecendo um ritmo de crescimento de 1-3 mm/dia (27,37). De acordo com esses dados, e como a secção ocorreu a uma distância de 20 mm do ponto onde é locado o eletrodo de captura do PAMC, 6 semanas é tempo hábil para o crescimento axonal até a placa motora.

Talvez a maior crítica ao método utilizado seja a falta de um parâmetro comportamental na avaliação funcional da regeneração neural. Muitas escalas para aferição funcional comportamental do NF usando critérios como a movimentação e/ou simetria de vibrissas, o fechamento ocular, o reflexo de piscamento e a simetria labial já foram propostas (2,27,41,87,89,102). Todas elas, porém, tem em comum a subjetividade e variabilidade entre avaliadores. As tentativas já publicadas de tornar mais objetivos parâmetros de avaliação comportamental, como a documentação em vídeo ou o uso de sensores a laser para detectar movimentos de olhos ou vibrissas, via de regra têm importantes desvantagens: a interferência de movimentos cefálicos nas aferições e o custo e a complexidade tecnológica envolvidos (46,48,103,104).

Em relação aos resultados da avaliação funcional, no pré-operatório não houve diferença estatística entre grupos em relação à latência, amplitude ou duração dos potenciais de ação. Além disso, os valores médios desses três

parâmetros no momento do pré-operatório são compatíveis com resultados anteriormente publicados por Salomone et al (2012) evidenciando a alta reprodutibilidade do método (28,30).

O grupo controle (G1) exibiu, conforme esperado, decréscimo significativo da amplitude entre t 0 e t 3sem, que se manteve até t 6sem. Da mesma forma, o aumento da duração do potencial de ação ocorreu entre t 0 e t 3sem e se manteve na avaliação subsequente. Esses resultados estão de acordo com experimentos prévios de Salomone et al (2012), Costa et al (2013) e Salomone et al (2013) (28,30,51).

No grupo controle, porém, a neurotmeze não produziu aumento estatístico da latência. Tal fato pode ser explicado porque a latência, que pode ser definida como o tempo decorrido do estímulo até o início do potencial de ação, é uma medida do espaço de tempo que a corrente elétrica demora para percorrer a fibra nervosa até a placa motora, e é mantido mesmo na presença de um pequeno número de fibras íntegras (105). No t 3sem, é de se esperar que alguns axônios tenham regenerado e alcançado a placa motora, produzindo latência próxima dos valores do pré-operatório. Além disso, no ramo mandibular do NF de ratos, a distância entre o local do estímulo e captação é pequena, porque o nervo é curto, o que predispõe a apenas leves variações na latência (2,105).

Os animais submetidos ao tratamento de sutura química aliada à sutura convencional exibiram maior amplitude e menor duração dos potenciais dos PAMCs em relação aos demais grupos. Em conjunto, esses achados sugerem que no G2 os axônios exibem mais integridade e funcionalidade após a intervenção que os demais grupos. Uma explicação possível para isso é que as substâncias envolvidas na sutura química são capazes de acelerar a

regeneração axonal. De fato, tanto o AM como o PEG mostraram *in vitro* e *in vivo*, serem antioxidantes e estimuladores da regeneração neural (76,84). Mas, se esse fosse o caso, pelo menos um dos grupos tratados com AM ou PEG separadamente deveria exibir melhor regeneração que o controle, o que não ocorreu.

A segunda explicação possível, apoiada por descobertas de Bittner et al. (2012), sugere que a lavagem com a solução de Krebs livre de  $Ca^{+2}$  (que, portanto, depleta a concentração de  $Ca^{+2}$  no meio) e o AM, agindo como antioxidante no axoplasma, inibem a fusão das vesículas lipídicas que vedariam a extremidade axonal. A seguir, a sutura convencional aproxima espacialmente as extremidades axonais abertas, deixando-as em contato próximo, e a aplicação do PEG promove a fusão entre os componentes lipídicos do axolema. Por último, a reposição de  $Ca^{+2}$  ao meio, durante o banho com a solução de Krebs rica em  $Ca^{+2}$ , estimula a vedação de pequenas aberturas remanescentes no axolema, restabelecendo no ato a integridade e a condutibilidade axonais (26). Importante frisar que, nesse mecanismo de ação proposto, a sequência dos passos da sutura química é fundamental. A fusão pelo PEG só é possível se as extremidades forem mantidas abertas durante todo o tempo da execução da sutura. A depleção do  $Ca^{+2}$  do meio e o azul de metileno, agindo como antioxidante no citoplasma, garantem a inibição da produção e migração das vesículas que, caso contrário, dariam início ao processo de vedação das extremidades axonais abertas.

Esse ano, duas publicações independentes reforçaram a ideia de que o PEG é capaz de induzir, *in vivo*, fusão de extremidades axonais, promovendo retorno de sua continuidade morfológica e funcional. Em modelo animal de

transecção espinhal total em ratos, a aplicação tópica de PEG no sítio da lesão, imediatamente após sua indução, resultou em recuperação funcional comportamental e retorno, após 15 dias, dos potenciais evocados somatossensoriais a níveis de pré-operatório (106).

Bamba et al (2017) demonstraram, em modelo de secção seguida de sutura de nervo ciático de ratos, que a aplicação de PEG, numa técnica semelhante à sutura química utilizada aqui, promove retorno imediato do PAMC quando o restabelecimento da continuidade axonal é realizada 1, 8 e 24 h após a neurotmese. Esse achado também apoia a ideia que a sutura química é capaz de restaurar a continuidade axonal imediata. Embora, obviamente, seja impossível haver fusão uma a uma das extremidades axonais proximais e distais ao ponto de lesão, aparentemente o número de fibras restauradas é suficiente pra gerar o potencial de ação e promover recuperação funcional bem superior a dos animais submetidos à sutura convencional (107).

Dessa forma, apesar de não haver evidências inequívocas de que, nesse modelo de neurotmese do facial, o mecanismo de ação da sutura química envolve a fusão imediata das extremidades axonais avulsionadas, com o restabelecimento precoce de suas propriedades de condutibilidade, certamente essa é uma explicação coerente.

Em experimento realizado com transecção do nervo ciático e de neurônios hipocampais de ratos, foi visto que a eficácia da fusão por PEG não foi comprometida pela variação da concentração de  $Ca^{+2}$  do meio (67) . De fato, de acordo com a explicação dada para o sucesso da sutura química, a concentração de cálcio do meio não age sobre a eficácia do PEG de promover a fusão de membrana por si e sim, inibe o início do processo de vedação da membrana por

vesículas que, esse sim, depende do  $\text{Ca}^{+2}$  para ocorrer. No modelo adotado, a secção neural produz pequena retração dos cotos (da ordem de 1-2 mm) com perda do contato entre eles, sendo necessário que a fusão por PEG seja precedida da sutura convencional. Logo, a depleção da concentração do íon  $\text{Ca}^{+2}$  no meio é necessária para conter a formação de vesículas pelo período de tempo necessário à realização da sutura. Deixar de interferir na concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  no meio, mantendo só o tratamento com PEG, como no grupo G4, compromete a eficácia da regeneração neural.

Adicionalmente, existe a hipótese que o AM e o PEG, agindo como antioxidantes, também possam ser responsáveis por efeitos neuroprotetores, promovendo aumento da sobrevivência de axônios que tiveram sua continuidade restabelecida ou até mesmo daqueles que, apesar de não terem sido fusionados com sucesso com suas extremidades distais avulsionadas, ainda tinham potencial de brotar e regenerar-se. Especificamente o PEG exibe, ainda, em modelos animais de seccionamento da medula espinhal, efeito anti-inflamatório local (72,83). Novamente, mesmo que haja esse pequeno benefício adicional do AM e/ou do PEG, sozinho ele é insuficiente para explicar os resultados vistos, já que não foram verificadas diferenças entre os grupos tratados apenas com AM ou PEG e os controles.

Deve ser frisado também que, de acordo com as explicações já expostas, o sucesso da sutura química depende da aposição meticulosa das extremidades axonais avulsionadas, e, portanto, estaria altamente relacionada à experiência cirúrgica (107). Dependendo de uma sutura convencional (com todos seus inconvenientes, como potencial dano aos axônios pela agulha, reação inflamatória ao fio e tempo e espaço necessários à sua execução) para ser bem-

sucedida constitui uma notável desvantagem da sutura química frente à cola de fibrina (16). Em contrapartida, a cola de fibrina ainda tem custo elevado em nosso meio. Portanto, estudos futuros são necessários para comparar os dois métodos.

#### **6.4 A AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA**

Apenas parâmetros histológicos quantitativos foram investigados. Optou-se por não avaliar parâmetros qualitativos a fim de conferir maior objetividade aos resultados. De fato, a contagem e o diâmetro axonal são considerados parâmetros objetivos da regeneração neural (2,18,101). Sendo assim, os grupos de animais foram avaliados em relação à contagem axonal total em um campo de  $10.000 \mu\text{m}^2$  e em relação à média do menor diâmetro dos axônios, incluindo a bainha de mielina, medida da mielinização das fibras.

Em estudo com o ramo bucal do NF de ratos submetidos à neurotome e sutura, Satar et al. estabeleceram que após 1 mês não há mais evidência histológica de degeneração walleriana (108).

Borin et al. estabeleceram que a contagem de axônios, após neurotome e sutura término-terminal dos cotos do NF, cresce gradualmente, atingindo valores próximos aos normais em torno de 7 semanas depois, e ultrapassa os valores da normalidade em torno de 9 semanas, quando há intenso brotamento axonal, atestando o esforço regenerativo do nervo (27). Nesse sentido, a momento da avaliação histológica é crucial. Como a capacidade regenerativa neural dos ratos ultrapassa a dos seres humanos, esperar até o processo regenerativo completar-se não é interessante por provavelmente reduzir a influência dos tratamentos administrados sobre o resultado aferido e afastar o

modelo animal da realidade vista nos seres humanos (37,109). Por esse motivo, acha-se que 6 semanas é tempo adequado para a realização do estudo histológico proposto.

Sendo assim, 6 semanas após os tratamentos, o grupo submetido a sutura química associada a sutura convencional exibiu diferença em relação a todos os demais, apresentando maior número de fibras axonais e maior diâmetro médio das fibras, medida indireta do grau de mielinização.

A relação entre a contagem axonal com o grau de regeneração funcional do NF depois de trauma é controversa. Estudos prévios de regeneração neural associam a recuperação funcional ao aumento do número de axônios (27,110). Banks et al. referem que 8 meses após secção e sutura do NF de ratos, ainda há maior número de axônios em cortes histológicos em relação ao habitual. No entanto, apesar desse intenso processo de brotamento axonal, funcionalmente o nervo não recupera sua capacidade plena, provando que mais axônios, se não dirigidos às fibras musculares efetoras específicas, não resultam em ganho funcional proporcional (37). Em estudo feito em ratos diabéticos para induzir PFP pela injeção do vírus da herpes tipo 1, 10 e 17 dias após a inoculação, a redução da amplitude dos potenciais de ação correlacionou-se com a redução do número de axônios (111). O mesmo fenômeno pode ser visto nesse estudo, em que os grupos mais severamente afetados pela redução da amplitude dos PAMCs (G1, G3 e G4) também tiveram menor contagem axonal.

Em modelo de secção seguida de sutura do nervo ciático, a sutura simples com mononylon associada ao PEG promoveu também aumento da contagem axonal em comparação com a sutura convencional isoladamente, avaliada 7 dias após a intervenção (107).

Em relação ao diâmetro médio das fibras axonais, o grupo G2 exibiu diâmetro maior que os demais. Uma vez que o diâmetro maior fala a favor da melhor mielinização das fibras e correlaciona-se com transmissão mais rápida e sincrônica do potencial elétrico, é de se esperar que esse grupo tenha tido a menor duração do potencial de ação (112), o que de fato ocorreu.

Deve ser frisado, ainda, que o PEG é um material extremamente barato e atóxico nas concentrações utilizadas para a fusão axonal, não estando relacionado, nessa pesquisa ou em outras já publicadas, a alterações inflamatórias no sítio de aplicação (26,107).

## 7 CONCLUSÃO

A técnica apresentada como sutura química, quando usada concomitantemente à sutura convencional com mononylon, foi capaz de mostrar melhores resultados na regeneração do ramo mandibular do nervo facial em ratos, quando comparada à sutura convencional isolada. Esse efeito se traduziu, nos estudos eletrofisiológicos, em uma maior amplitude e menor duração do potencial de ação muscular composto. Na avaliação histológica, foi visto um aumento da contagem axonal associado a um maior diâmetro médio dos axônios.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Salomone R. Paralisia Facial Periférica. In: Bento RF, Voegels RL, Sennes LU, Pinna FR, Jotz GP, editors. *Otorrinolaringologia baseada em sinais e sintomas*. 1st ed. São Paulo: Fundação Otorrinolaringologia; 2011. p. 55–67.
2. Salomone R. Regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos após a implantação de células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas e diferenciadas in vitro que apresentam fenótipo de células de Schwann. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2012.
3. Bento RF, Miniti A. Comparison between fibrin tissue adhesive, epineural suture and natural union in intratemporal facial nerve of cats. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1989;465:1–36.
4. Guntinas-Lichius O, Hundeshagen G, Paling T, Angelov DN. Impact of different types of facial nerve reconstruction on the recovery of motor function: an experimental study in adult rats. *Neurosurgery*. 2007;61(6):1275–6.
5. Matsumine H, Takeuchi Y, Sasaki R, Kazama T, Kano K, Matsumoto T, et al. Adipocyte-Derived and Dedifferentiated Fat Cells Promoting Facial Nerve Regeneration in a Rat Model. *Plast Reconstr Surg*. 2014;134(4):686–97.
6. Tiemstra JD, Khatkhate N. Bell's palsy: Diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2007;76(7).
7. Morris AM, Deeks SL, Hill MD, Midroni G, Goldstein WC, Mazzulli T, et al. Annualized incidence and spectrum of illness from an outbreak investigation of Bell's palsy. *Neuroepidemiology*. 2002;21(5):255–61.
8. Bento RF. Contribuição para o estudo da anastomose do nervo facial. Comparação entre o adesivo tecidual fibrínico e a sutura epineural. Estudo em gatos. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1988.
9. May M, Schaitkin BM. *The Facial Nerve*. Thieme; 2000. 877 p.
10. Hohman MH, Hadlock TA. Etiology, diagnosis, and management of facial palsy: 2000 patients at a facial nerve center. *Laryngoscope*. 2014. p. E283–93.
11. Gantz BJ, Roche JP, Redleaf MI, Perry BP, Gubbels SP. Management of Bell's palsy and Ramsay Hunt Syndrome. In: Brackmann DE, Shelton C, Arriaga MA, editors. *Otologic Surgery*. 4a ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2016. p. 287–98.
12. Hohman MH, Bhama PK, Hadlock TA. Epidemiology of iatrogenic facial nerve injury: A decade of experience. *Laryngoscope*. 2014;124(1):260–5.
13. Lupo JE, Jenkins HA. Traumatic Facial Palsy. In: Brackmann D, Shelton C, Arriaga MA, editors. *Otologic Surgery*. 4a ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2016. p. 299–313.
14. Bento RF, Miniti A, Ruocco JR. Traumatic Peripheral Facial Palsy Diagnosis. In: Portmann M, editor. *Facial Nerve*. New York: Masson; 1985. p. 299–303.
15. Sunderland S. *Nerves and nerve injuries*. 1a ed. New York: Churchill Livingstone; 1968.

16. Bento R, Miniti A. Anastomosis of the intratemporal facial nerve using fibrin tissue adhesive. *Ear Nose Throat J.* 1993;72(10):663-.
17. Bento RF, Salomone R, Brito R, Tsuji RK, Hausen M. Partial lesions of the intratemporal segment of the facial nerve: Graft versus partial reconstruction. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2008;117(9):665–9.
18. Spector JG. Neural repair in facial paralysis: clinical and experimental studies. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1997;254 Suppl:S68-75.
19. Eddleman CS, Ballinger ML, Smyers ME, Godell CM, Fishman HM, Bittner GD. Repair of plasmalemmal lesions by vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(9):4745–50.
20. Lichstein JW, Ballinger ML, Blanchette AR, Fishman HM, Bittner GD. Structural changes at cut ends of earthworm giant axons in the interval between dye barrier formation and neuritic outgrowth. *J Comp Neurol.* 1999;416(2):143–57.
21. Krause T, Bittner G. Rapid morphological fusion of severed myelinated axons by polyethylene glycol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:1471–5.
22. Fishman HM, Bittner GD. Vesicle-mediated restoration of a plasmalemmal barrier in severed axons. *News Physiol Sci.* 2003;18:115–8.
23. Luo J, Borgens R, Shi R. Polyethylene glycol immediately repairs neuronal membranes and inhibits free radical production after acute spinal cord injury. *J Neurochem.* 2002;83(2):471–80.
24. Godell CM, Smyers ME, Eddleman CS, Ballinger ML, Fishman HM, Bittner GD. Calpain activity promotes the sealing of severed giant axons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(9):4751–6.
25. Xie XY, Barrett JN. Membrane resealing in cultured rat septal neurons after neurite transection: evidence for enhancement by Ca(2+)-triggered protease activity and cytoskeletal disassembly. *J Neurosci.* 1991;11(10):3257–67.
26. Bittner GD, Keating CP, Kane JR, Britt JM, Spaeth CS, Fan JD, et al. Rapid, effective, and long-lasting behavioral recovery produced by microsutures, methylene blue, and polyethylene glycol after completely cutting rat sciatic nerves. *J Neurosci Res.* 2012;90(5):967–80.
27. Borin A, Toledo RN de, Faria SD de, Testa JRG, Cruz OLM. Behavioral and histologic experimental model of facial nerve regeneration in rats. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006;72(6):776–85.
28. Salomone R, Costa HJZR, Rodrigues JRF, Reis E Silva SM, Orlando PC, Bento RF. Assessment of a neurophysiological model of the mandibular branch of the facial nerve in rats by electromyography. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2012;121(3):179–84.
29. Hadlock T, Kowaleski J, Mackinnon S, Heaton JT. A novel method of head fixation for the study of rodent facial function. *Exp Neurol.* 2007;205(1):279–82.
30. Costa HJZR, Ferreira Bento R, Salomone R, Azzi-Nogueira D, Zanatta DB, Paulino Costa M, et al. Mesenchymal bone marrow stem cells within polyglycolic acid tube observed in vivo after six weeks enhance facial nerve regeneration. *Brain Res.* 2013;1510:10–21.
31. Hu J, Zhou L, Ma Z. Delayed repair of facial nerve trauma: an experimental study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 2013;133(7):772–8.
32. Griffin JW, Pan B, Polley M a., Hoffman PN, Farah MH. Measuring nerve

- regeneration in the mouse. *Exp Neurol*. 2010;223(1):60–71.
33. Angius D, Wang H, Spinner RJ, Gutierrez-Cotto Y, Yaszemski MJ, Windebank AJ. A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds. *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2012;33(32):8034–9.
  34. Shimizu S, Kitada M, Ishikawa H, Itokazu Y, Wakao S, Dezawa M. Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359(4):915–20.
  35. Bozkurt A, Scheffel J, Brook GA, Joosten EA, Suschek C V., O'Dey DM, et al. Aspects of static and dynamic motor function in peripheral nerve regeneration: SSI and CatWalk gait analysis. *Behav Brain Res*. Elsevier B.V.; 2011;219(1):55–62.
  36. Mattox DE, Felix H. Surgical anatomy of the rat facial nerve. *The American journal of otology*. 1987. p. 43–7.
  37. Banks CA, Knox C, Hunter DA, Mackinnon SE, Hohman MH, Hadlock TA. Long-term functional recovery after facial nerve transection and repair in the rat. *J Reconstr Microsurg*. 2015;31(3):210–6.
  38. Vilela MG, Júnior JLS, Castro e Silva JG. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *Femina*. 2007;35:667–70.
  39. Kinderman NB, Jones KJ. Axotomy-induced changes in ribosomal RNA levels in female hamster facial motoneurons: differential effects of gender and androgen exposure. *Exp Neurol*. 1994;126.
  40. Bento RF, Brito R de. Traumatismo do osso temporal. In: Caldas Neto S, Mello Junior JF, Martins RHG, Costa SS da, editors. *Tratado de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cervicofacial*. 2nd ed. São Paulo, SP: Roca; 2011. p. 340–5.
  41. Hadlock TA, Heaton J, Cheney M, Mackinnon SE. Functional recovery after facial and sciatic nerve crush injury in the rat. *Arch Facial Plast Surg*. 2005;7(1):17–20.
  42. Costa HJZR, Salomone R, Silva CF da, Costa MP, Ramos BL, Bento RF. Quantitative histological analysis of the mandibular branch of the facial nerve in rats. *Acta Cirúrgica Bras*. 2012;27(11):747–50.
  43. Semba K, Egger MD. The facial “motor” nerve of the rat: control of vibrissal movement and examination of motor and sensory components. *J Comp Neurol*. 1986 May 8;247(2):144–58.
  44. Nobrega J, Manzano G. *Manual de eletroneuromiografia e potenciais evocados cerebrais para a prática clínica*. São Paulo: Atheneu; 2007.
  45. Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral Sprouting Occurs following End-to-Side Neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114(1):129–37.
  46. Heaton JT, Kowaleski JM, Bermejo R, Zeigler HP, Ahlgren DJ, Hadlock TA. A system for studying facial nerve function in rats through simultaneous bilateral monitoring of eyelid and whisker movements. *J Neurosci Methods*. 2008;171(2):197–206.
  47. Faria SD, Testa JRG, Borin A, Toledo RN. Standardization of techniques used in facial nerve section and facial movement evaluation in rats. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2006;72(3):341–7.
  48. Huang JT, Wang GD, Wang DL, Liu Y, Zhang XY, Zhao YF. A novel videographic method for quantitatively tracking vibrissal motor recovery

- following facial nerve injuries in rats. *J Neurosci Methods*. Elsevier B.V.; 2015;249:16–21.
49. Rushton W. A theory of the effects of fibre size in medullated nerves. *J Physiol*. 1951;115:101–22.
  50. Costa HJZR. Estudo sobre a regeneração pós-traumática do nervo facial em coelhos. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa da Universidade de São Paulo; 2003.
  51. Salomone R, Bento RF, Costa HJZR, Azzi-Nogueira D, Ovando PC, Silva CF, et al. Bone marrow stem cells in facial nerve regeneration from isolated stumps. *Muscle Nerve*. 2013;48(3):423–9.
  52. Miyamoto H. Introduction of axon packing density for histological quantitative assessment of peripheral nerve regeneration. *Hiroshima J Anesth*. 1985;21(1):3–17.
  53. Mayhew TM, Sharma AK. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J Anat*. 1984;139 ( Pt 1:59–66.
  54. Vasconcelos BC, Gay-Escoda C. Facial nerve repair with expanded polytetrafluoroethylene and collagen conduits: an experimental study in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58(11):1257–62.
  55. Glicenstein J. Histoire de la paralysie faciale. *Ann Chir Plast Esthet*. Elsevier Masson SAS; 2015;60(5):347–62.
  56. Lee LN, Lyford-Pike S, Boahene KDO. Traumatic Facial Nerve Injury. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2013. p. 825–39.
  57. Kim J. Neural Reanimation Advances and New Technologies. *Facial Plast Surg Clin NA*. Elsevier Inc; 2016;24(1):71–84.
  58. Bento R, Brito Neto RV. Gunshot Wounds to the Facial Nerve. *Otol Neurotol*. 2004. p. 1009–13.
  59. Matsuyama T, Mackay M, Midha R. Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2000;40:187–99.
  60. Gencer ZK, Özkiriş M, Saydam L, Dağlioğlu YK, Sakallioğlu Ö, Kuyucu Y, et al. The Comparison of Histological Results of Experimentally Created Facial Nerve Defects Repaired by 2 Different Anastomosis Techniques. *J Craniofac Surg*. 2014;25(2):652–6.
  61. Sameem M, Wood TJ, Bain JR. A systematic review on the use of fibrin glue for peripheral nerve repair. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(6):2381–90.
  62. Grayeli AB, Mosnier I, Julien N, El Garem H, Bouccara D, Sterkers O. Long-term functional outcome in facial nerve graft by fibrin glue in the temporal bone and cerebellopontine angle. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2005;262(5):404–7.
  63. Wilgis E. Techniques of epineural and group fascicular repair. In: Gelberman R, editor. *Operative nerve repair and reconstruction*. 1st ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1991. p. 287–93.
  64. Dvali L, Mackinnon S. Nerve repair, grafting, and nerve transfers. *Clinics in Plastic Surgery*. 2003. p. 203–21.
  65. Lubiatuski P, Unsal F, Nair D, Ozer K, Siemionow M. The epineural sleeve technique for nerve graft reconstruction enhances nerve recovery. *Microsurgery*. 2008;28:160–7.
  66. Levinthal R, Brown W, Rand R. Comparison of fascicular, interfascicular and epineural suture techniques in the repair of simple nerve lacerations.

- J Neurosurg. 1977;47(5):744–50.
67. Spaeth CS, Robison T, Fan JD, Bittner GD. Cellular mechanisms of plasmalemmal sealing and axonal repair by polyethylene glycol and methylene blue. *J Neurosci Res.* 2012;90(5):955–66.
  68. Bittner G. Long term survival of anucleate axons and its implications for nerve regeneration. *Trends Neurosci.* 1991;14:188–93.
  69. Maggi SP, Lowe JB, Mackinnon SE. Pathophysiology of nerve injury. *Clin Plast Surg.* 2003;30(2):109–26.
  70. Waller A. Experiments on the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Phil Trans R Soc London.* 1850;140:423–7.
  71. Fishman H, Tewari K, Stein P. Injury-induced vesiculation and membrane redistribution in squid giant axon. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1023:421–35.
  72. Bittner GD, Sengelaub DR, Trevino RC, Peduzzi JD, Mikesh M, Ghergherehchi CL, et al. The curious ability of polyethylene glycol fusion technologies to restore lost behaviors after nerve severance. *J Neurosci Res.* 2015;230(August 2015):207–30.
  73. Reddy A, Caler E V., Andrews NW. Plasma membrane repair is mediated by Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell.* 2001;106(2):157–69.
  74. Ghergherehchi CL, Bittner GD, Hastings RL, Mikesh M, Riley DC, Trevino RC, et al. Effects of extracellular calcium and surgical techniques on restoration of axonal continuity by polyethylene glycol fusion following complete cut or crush severance of rat sciatic nerves. *J Neurosci Res.* 2016 Mar 5;94(3):231–45.
  75. Yoo S, Bottenstein JE, Bittner GD, Fishman HM. Survival of mammalian B104 cells following neurite transection at different locations depends on somal Ca<sup>2+</sup> concentration. *J Neurobiol.* 2004;60:137–53.
  76. Kong X Bin, Tang QY, Chen XY, Tu Y, Sun SZ, Sun ZL. Polyethylene glycol as a promising synthetic material for repair of spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2017;12(6):1003–8.
  77. Wojcieszyn JW, Schlegel RA, Lumley-Sapanski K, Jacobson K. Studies on the mechanism of polyethylene glycol-mediated cell fusion using fluorescent membrane and cytoplasmic probes. *J Cell Biol.* 1983;96(1):151–9.
  78. O’Lague PH, Huttner SL. Physiological and morphological studies of rat pheochromocytoma cells (PC12) chemically fused and grown in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(3):1701–5.
  79. Davidson R, O’Malley K, Wheeler T. Polyethylene glycol-induced mammalian cell hybridization: effect of polyethylene glycol molecular weight and concentration. *Somatic Cell Genet.* 1976;2:271–80.
  80. Knutton S. Studies of membrane fusion. III. Fusion of erythrocytes with polyethylene glycol. *J Cell Sci.* 1979;36:61–72.
  81. Shi R, Borgens RB, Blight AR. Functional reconnection of severed mammalian spinal cord axons with polyethylene glycol. *J Neurotrauma.* 1999;16(8):727–38.
  82. Bittner GD, Ballinger ML, Raymond MA. Reconnection of severed nerve axons with polyethylene glycol. *Brain Res.* 1986;367(1–2):351–5.
  83. Luo J, Borgens R, Shi R. Polyethylene glycol improves function and reduces oxidative stress in synaptosomal preparations following spinal

- cord injury. *J Neurotrauma*. 2004;21(8):994–1007.
84. Oz M, Lorke DE, Hasan M, Petroianu GA. Cellular and molecular actions of methylene blue in the nervous system. *Med Res Rev*. 2011;31(1):93–117.
  85. Spaeth C, Boydston E, Figard L, Zuzek A, Bittner G. A model for sealing plasmalemmal damage in neurons and other eukaryotic cells. *J Neurosci*. 30:15790–157800.
  86. Neves SMP, Mancini Filho J, Menezes EW. *Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ / USP*. Usp. 2013. 234 p.
  87. Guntinas-Lichius O, Irintchev A, Streppel M, Lenzen M, Grosheva M, Wewetzer K, et al. Factors limiting motor recovery after facial nerve transection in the rat: Combined structural and functional analyses. *Eur J Neurosci*. 2005;21(2):391–402.
  88. Bento RF, Salomone R, Nascimento SB, Ferreira RJR, Silva CF, Costa HJZR. Mandibular branch of the facial nerve in wistar rats: New experimental model to assess facial nerve regeneration. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2014;18(3):277–82.
  89. Hetzler LET, Sharma N, Tanzer L, Wurster RD, Leonetti J, Marzo SJ, et al. Accelerating functional recovery after rat facial nerve injury: Effects of gonadal steroids and electrical stimulation. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;139(1):62–7.
  90. Sharma N, Coughlin L, Porter RG, Tanzer L, Wurster RD, Marzo SJ, et al. Effects of electrical stimulation and gonadal steroids on rat facial nerve regenerative properties. 2009;27:633–44.
  91. Bento RF, Miniti A, Ruocco JR. Traumatic Peripheral Facial Palsy Diagnosis. In: Portmann M, editor. *Facial Nerve*. Mason; 1985. p. 299–303.
  92. Cruz Filho NÁ, de Aquino JEP, de Oliveira LF. Facial nerve grafting and end-to-end anastomosis in the middle ear - Tympanic cavity and mastoid. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2013;79(4):441–5.
  93. Fisch U, Dobie RA, Gmür A, Felix H. Intracranial facial nerve anastomosis. *The American journal of otology*. 1987. p. 23–9.
  94. Danner CJ. Facial Nerve Paralysis. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2008. p. 619–32.
  95. Dew LA, Shelton C. Iatrogenic facial nerve injury: prevalence and predisposing factors. *Ear Nose Throat J*. 1996;75(11):724–9.
  96. Green JD, Shelton C, Brackmann DE. Surgical management of iatrogenic facial nerve injuries. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 1994;111(5):606–10.
  97. Ochi M, Noda M, Nakamitsu K, Deie M, Ikuta Y, Maki Y, et al. Promotion of sciatic nerve regeneration in rats by a new neurotrophic pyrimidine derivative MS-430. *Gen Pharmacol*. 1995;26(1):59–64.
  98. Olsen PZ. Prediction of Recovery in Bell's Palsy. *Acta Neurol Scand*. 1975;52(s61):1–119.
  99. Engstrom M, Jonsson L, Grindlund M, Stalberg E. House-Brackmann and Yanagihara Grading Scores in Relation to Electroneurographic Results in the Time Course of Bell's Palsy. *Acta Otolaryngol*. 2009;118(6):783–9.
  100. Byrne PJ, Stuart RM, Fakhry C, Lehar M, Flint PW. An electrophysiologic model for functional assessment of effects of neurotrophic factors on facial nerve reinnervation. *Arch Facial Plast Surg*. 2005;7(2):114–8.

101. Szal G, Miller T. Surgical repair of facial nerve branches. An analysis of different sheathing and suturing techniques. *Arch Otolaryngol.* 1975;101(3):160–5.
102. Neiva FC, Borin A, Cinini S, Mello LE a. ., Cruz OLM, Testa JRG. Experimental model of facial paralysis by nerve compression in primates (*Callithrix sp.*): A new model of facial paralysis in small nonhuman primates. *Acta Otolaryngol.* 2012;132(11):1239–42.
103. Attiah MA, de Vries J, Richardson AG, Lucas TH. A Rodent Model of Dynamic Facial Reanimation Using Functional Electrical Stimulation. *Front Neurosci.* 2017;11(April):1–8.
104. Mendez A, Seikaly H, Biron VL, Zhu LF, Côté DWJ. Brief electrical stimulation after facial nerve transection and neuroorrhaphy: a randomized prospective animal study. *J Otolaryngol - Head Neck Surg. Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery;* 2016;45(7):1–7.
105. Liveson J, Dong M. Laboratory reference for clinical neurophysiology. Philadelphia, PA: Oxford University Press; 1992.
106. Ren S, Liu ZH, Wu Q, Fu K, Wu J, Hou LT, et al. Polyethylene glycol-induced motor recovery after total spinal transection in rats. *CNS Neurosci Ther.* 2017;23(8):680–5.
107. Bamba R, Riley DC, Kim JS, Cardwell NL, Pollins AC, Shack RB, et al. Evaluation of a Nerve Fusion Technique With Polyethylene Glycol in a Delayed Setting After Nerve Injury. *J Hand Surg Am. Elsevier Inc;* 2017;1–7.
108. Satar B, Karahatay S, Kurt B, Ural AU. Repair of Transected Facial Nerve With Mesenchymal Stromal Cells : Histopathologic Evidence of Superior Outcome. *Laryngoscope.* 2009;119(November):2221–5.
109. Brenner MJ, Moradzadeh A, Myckatyn TM, Tung THH, Mendez AB, Hunter DA, et al. Role of timing in assessment of nerve regeneration. *Microsurgery.* 2008;28(4):265–72.
110. Lewin S, Utley D, Cheng E, Verity A, Terris D. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope.* 1997;107(7):992–9.
111. Esaki S, Yamano K, Kiguchi J, Katsumi S, Keceli S, Okamoto H, et al. Diabetic Mice Show an Aggravated Course of Herpes-Simplex Virus–Induced Facial Nerve Paralysis. *Otol Neurotol.* 2012;33(8):1452–7.
112. Salomone R. Regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos após a implantação de células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas e diferenciadas in vitro que apresentam fenótipo de células de Schwann Regeneração do ramo mandibular do nervo facial. Universidade de São Paulo; 2012.

# APÊNDICES

## APÊNDICE A- PARECER DO CONSELHO DE ÉTICA



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27/02/2013, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **414/12** intitulado: **“AVANÇOS EM TÉCNICAS DE REPARO DO NERVO FACIAL”** que utilizará **80** animais da espécie **ratos Wistar**, apresentado pelo **Departamento de OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA**

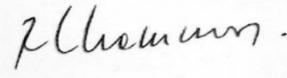
Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

**Pesquisador (a) Responsável: Heloisa Juliana Zabeu Rossi Costa**  
**Pesquisador (a) Executante: Heloisa Juliana Zabeu Rossi Costa**

CEP-FMUSP, 05 de Março de 2013.



**Dr. Eduardo Pompeu**  
**Coordenador**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**



**Prof. Dr. Roger Chammas**  
**Coordenador**  
**Comitê de Ética em Pesquisa**

# APÊNDICE B- PERMISSÃO PARA REPRODUÇÃO DE FIGURAS

18/09/2017

Print

---

**Subject:** RE: permission to reprint photographs from an article

---

**From:** permissions (US) (permissions@sagepub.com)

---

**To:** silviabona@yahoo.com;

---

**Date:** Thursday, September 14, 2017 12:46 PM

---

Hello Silvia,

Thank you for your request. I am happy to report that you can consider this email as permission to use the material as detailed below in your upcoming thesis. Please note that this permission does not cover any 3rd party material that may be found within the work. You must properly credit the original source, SAGE Publications.

Please contact us for any further usage of the material and good luck on your thesis!

All the Best,

Yvonne

--

Yvonne McDuffee

*Rights Coordinator*

SAGE Publications Inc.

2455 Teller Road

Thousand Oaks, CA 91320

[www.sagepublishing.com](http://www.sagepublishing.com)

Los Angeles | London | New Delhi

Singapore | Washington DC | Melbourne

The natural home for authors, editors & societies

**From:** Silvia Bona [mailto:silviabona@yahoo.com]  
**Sent:** Thursday, September 14, 2017 7:32 AM  
**To:** permissions (US) <permissions@sagepub.com>; Silvia Nascimento <silviabona@yahoo.com>  
**Subject:** permission to reprint photographs from an article

Greetings!

My name is Silvia Nascimento. I am a doctoral student currently working with the authors of an article published in Annals of Otolaryngology and Rhinology in the year 2012, named Raquel Salomone and Ricardo Ferreira Bento, my mentor.

I'm writing to ask permission to reproduce the photographs from their article in my written thesis, in the background section. That means I won't be claiming that I made the pictures, but the original authors will have full credit and they will not be published in any other places.

I'm sending the complete reference of the article for your analysis and I appreciate the time taken in considering this.

Many thanks,

Silvia

Article: Assessment of a neurophysiological model of the mandibular branch of the facial nerve in rats by electromyography. Ann Otol Rhinol Laryngol 2012. 121(3): 179-84