

RAQUEL SALOMONE

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

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

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento

São Paulo

2012

RAQUEL SALOMONE

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

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

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Salomone, Raquel

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 / Raquel Salomone. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Otorrinolaringologia.

Orientador: Ricardo Ferreira Bento .

Descritores: 1.Nervo facial 2.Células-tronco 3.Regeneração nervosa 4.Células de Schwann 5.Ratos, Wistar 6.Eletromiografia 7.Condução nervosa 8.Histologia comparada

USP/FM/DBD-256/12

Existirá
e toda raça então experimentará
para todo mal
A Cura “

Lulu Santos/Nelson Mota (A Cura)

Dedico ...

Ao meu esposo **Mario Ribeiro Neto**, o grande e único amor da minha vida. Meu companheiro e melhor amigo. Por tudo que te fiz passar, por todas as dificuldades que resolvemos juntos, por toda a paciência com que lidou comigo e por todo amor, apoio estrutural e emocional que recebi não só nesses últimos 4 anos , mas em todos esses 13 anos de união. Você é quem me dá forças para levantar todos os dias, me faz andar para frente além de me transformar em uma pessoa melhor a cada dia que passo ao seu lado. Tudo que eu faço é pensando em você, meu “motor de popa”. Sinto-me realmente privilegiada de ser sua esposa.

À minha avó **Elza B. Salomone** que mesmo distante sempre acreditou em mim, incondicionalmente, me apoiando, torcendo e rezando sempre que precisei, sem nunca perguntar o por quê ou para quê, somente acreditando...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **FAPESP – Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo**, por aprovar e financiar a execução deste projeto.

Ao **CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**, pela contribuição financeira por meio da bolsa de estudos e da taxa de bancada, incentivo fundamental duante o período de pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, orientador não só do doutorado, mas de toda a minha discreta carreira. Por toda a confiança que depositou em mim, pois sei que não deve ter sido fácil. Por todas as oportunidades que me proporcionou, por todas as portas que me abriu e continua abrindo. Gostaria que soubesse que meus grandes objetivos são fazer com que você nunca se decepcione e que um dia você realmente se orgulhe de ter me ajudado tanto. Você marcou e mudou a minha vida, e ainda o faz.

Ao **Prof. Dr. Rubens Vuono de Brito Neto** e ao **Dr. Robinson Koji Tsuji**, exemplos de profissionais éticos e competentes, por todo conhecimento compartilhado e auxílio em minha vida profissional. Vocês são grandes exemplos a serem seguidos.

À **Dra. Heloisa Juliana Zabeu Rossi Costa**, por todos os momentos muito bons, bons, ruins e de desespero que passamos juntas nesses 4 anos. Por me ajudar em todas as etapas desse estudo e me deixar segura nos momentos em que pensei que não iria conseguir. Agradeço por tê-la conhecido e tenho certeza que nossa amizade não terminará com a publicação desta tese.

À **Profa. Dra. Luciana A Haddad**, exemplo de profissionalismo e ética, pela essencial ajuda no estudo celular, no qual sem essa provavelmente não teria realizado meu projeto. Agradeço pelos conselhos, pelo apoio psicológico em momentos de transição da minha vida pessoal além de todos os ensinamentos que recebi. O que aprendi e conseqüentemente o crescimento que tive na realização de pesquisas nestes cinco anos ao seu lado, é para mim de um valor inestimável. Foi uma honra trabalhar com você.

Ao **Prof. Dr. Paulo Emmanuel Riskalla** por todos os ensinamentos e conselhos que recebi além de ser o grande responsável pela minha escolha pelo ramo da otologia.

Ao **Prof. Dr. Ciro Ferreira da Silva**, ao **Sr. Gaspar, Roberto Cabado Modia Jr.** e **Fernanda A. Correia Barrence** pela colaboração recebida para a conclusão do estudo histológico.

Aos **Doutores Rui Imamura, Ronaldo Frizzarini e Fabio Pinna** pelos ensinamentos fundamentais sobre a realização de trabalhos científicos recebidos nestes 4 anos.

À **Dra. Daniela B. Zanatta** do Setor de Vetores Virais (INCor), à aluna de doutorado **Deborah Azzi Nogueira**, e ao aluno de iniciação científica **Marcelo Valpeteris de Campos** do Laboratório de Genômica Funcional (IB-USP) pelo auxílio na cultura celular, transdução viral e contagem axonal.

Ao **Dr. Ricardo José Rodrigues Ferreira** que prontamente me ofereceu ajuda na parte eletroneurofisiologia quando eu mais precisei, após ter recebido várias negativas de outros colegas.

Ao **Dr. Paulo Bedê Miranda** pela amizade, apoio, confiança e principalmente pela paciência nestes últimos anos.

Aos **Doutores Perboyre Lacerda Sampaio, Flávia Lira Diniz, Antônio Carlos Cedin e Fabio Tadeu Moura Lorenzetti** pelo amparo e compreensão que recebi neste período .

A **Dra. Janaina De Rossi**, minha parceira no ambulatório de paralisia facial periférica de todas as segundas-feiras, por todos esses anos que trabalhamos juntas, pela amizade concreta que se formou, pela calma e serenidade com que me aconselhou e me apoiou nos momentos em que eu mais precisei.

Á **Dra. Anna Carolina de Oliveira Fonseca**, ex-fellow de ouvido e também parceira de ambulatório de paralisia facial, pelos conselhos, ajuda e o apoio “em todos os setores”, principalmente nesses últimos meses.

Ao meu amigo **Dr. Iulo Sérgio Barauna Filho**, por sua amizade e companherismo de todos esses anos.

Aos *fellows* e *ex-fellows* do grupo de ouvido, **Dra. Mariana Hausen Pinna**, **Dr. Sandro Sergio Muniz da Silva**, **Dr. Aquiles Figueredo Leal**, **Dra. Graziela Andreotti de Souza Queiroz Martins**, **Dra. Andréia Felice dos Santos**, **Dr. Marcelo Tepedino Jr.**, **Dra. Tatiana Alves Monteiro**, **Dra. Aline Gomes Bittencourt**, **Dra. Alessandra Kiisewettera** e **Dra. Liliane Satomi Ikari** pelas palavras incentivadoras e, principalmente, pela ajuda em todas as vezes que precisei me ausentar do ambulatório para a execução deste projeto.

Á fellow de ouvido **Dra. Ana Adelina Giantomassi Della Torre**, ás residentes de otorrinolaringologia **Dra. Beatriz Lucchetta Ramos** e **Dra. Samanta Marques Reis e Silva** e a bióloga **Patricia Camacho Ovando** pela ajuda com os animais.

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

À todos ex-chefes, ex-residentes e até hoje colegas do **Hospital CEMA**, que direta ou indiretamente, fizeram com que eu chegasse até aqui.

Às minhas primas **Profa. Ana Paula da Silva Perri** e **Adriana Galdeano Alves** pela ajuda nas correções feitas das línguas portuguesa e inglesa.

Á **Profa. Barbara Rzycki** pelo seu profissionalismo e por todas as horas de sono que a fiz perder.

As minhas “amigas-irmãs” **Doutoras Maria Cecilia Ferraz de Arruda Sarti, Fernanda Leonel Nunes, Flávia Maria Giust e Maira Motta** pelos 6 anos que passamos juntas os quais me fizeram crescer, amadurecer e me tornar uma pessoa melhor. Pela amizade que apesar da distancia e correria do dia-a-dia , permanece como se ainda dividíssemos a mesma república.

À toda a minha família, meus pais **Nivaldo Bertollucci Salomone e Nelci Galdeano Salomone** e meus irmãos **Ricardo Salomone e Renata Salomone**. Agradeço a todos por toda estrutura que recebi ao longo da minha vida para chegar até aqui.

SUMÁRIO

Lista de Siglas

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	8
3 REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1 Modelo animal	9
3.2 Anatomia e histologia do nervo facial de ratos.....	11
3.3 Técnicas cirúrgicas de reparação do nervo facial	15
3.4 Conduítes	18
3.5 Células de Schwann	21
3.6 Células multipotentes do estroma mesenquimal	27
3.7 Caracterização celular	30
3.8 Diferenciação das células multipotentes do estroma mesenquimal	33
3.9 Avaliação funcional objetiva da regeneração neural	35
3.10 Avaliação histológica da regeneração neural	38
3.11 Células-tronco na regeneração do nervo facial	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Materiais	47
4.1.1 Seleção de animais	47
4.1.2 Vetor lentiviral	48

4.1.3 Anticorpos	
4.2 Métodos	49
4.2.1 Obtenção das células multipotentes do estroma mesenquimal da medula óssea	49
4.2.2 Transdução viral	49
4.2.3 Diferenciação celular	50
4.2.4 Imunofenotipagem das células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas e diferenciadas	52
4.2.5 Grupos de estudo	53
4.2.6 Protocolo anestésico e preparação dos animais	55
4.2.7 Protocolo cirúrgico	56
4.2.7.1 Protocolo cirúrgico do grupo A	56
4.2.7.2 Protocolo cirúrgico do grupo B	57
4.2.7.3 Protocolo cirúrgico do grupo C	59
4.2.7.4 Protocolo cirúrgico do grupo D	59
4.2.8 Sacrifício dos animais	60
4.2.9 Protocolo de avaliação funcional objetiva	60
4.2.9.1 Técnica para obtenção dos PAMCs	60
4.2.9.2 Análise da amplitude	61
4.2.9.3 Análise da latência	63
4.2.9.4 Análise da duração	63
4.2.10 Protocolo de avaliação histológica	63
4.2.10.1 Retirada do nervo facial	63
4.2.10.2 Tratamento do nervo retirado	63
4.2.10.3 Estudo histopatológico	64
4.2.10.3.1 Análise histológica qualitativa	66
4.2.10.3.2 Análise histológica quantitativa	67
4.2.11 Análise estatística	67
	68
5 RESULTADOS	
5.1 Cultura e caracterização das células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas	70

5.2 Transdução	71
5.3 Diferenciação das células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas e caracterização das células multipotentes do estroma mesenquimal diferenciadas	72
5.4 Avaliação da regeneração neural	72
5.4.1 Avaliação funcional da regeneração neural	75
5.4.1.1 Avaliação funcional da regeneração neural: pré-operatório	75
5.4.1.2 Avaliação funcional da regeneração neural: 3 ^a semana	75
5.4.1.3 Avaliação funcional da regeneração neural: 6 ^a semana	76
5.4.2 Avaliação funcional da regeneração neural: comparação entre os períodos	78
5.4.2.1 Amplitudes	81
5.4.2.2 Latência	83
5.4.2.3 Duração	83
5.5 Avaliação histológica da regeneração neural	84
5.5.1 Avaliação histológica qualitativa da regeneração neural.....	86
5.5.1.1 Segmentos proximais (P1 e P')	86
5.5.1.2 Segmentos distais (D1 e D')	86
5.5.2 Avaliação histológica quantitativa da regeneração neural	89
5.5.2.1 Segmentos proximais (P1 e P')	90
5.5.2.2 Segmentos distais (D1 e D').....	91
	92
6 DISCUSSÃO	
6.1 Modelo animal	96
6.2 Paralisia facial periférica e regeneração neural	96
6.3 Técnicas cirúrgicas de reparação neural	99
6.4 Células de Schwann	100
6.5 Células multipotentes do estroma mesenquimal da medula óssea	105
6.6 Caracterização celular	107
6.7 Período das análises	109
	111

6.8 Avaliação funcional da regeneração neural	
6.9 Resultados eletrofisiológicos	113
6.10 Resultados histológicos	116
	118
7 CONCLUSÕES	
	126
8 ANEXOS	
Anexo A - Massa corporal dos animais por grupo e incidência de mortes.....	127
Anexo B - Valores absolutos dos PAMCs no pré-operatório.....	127
Anexo C - Valores absolutos dos PAMCs do lado direito obtidos na terceira semana de pós-operatório.....	128
Anexo D – Valores absolutos dos PAMCs do lado direito obtidos na sexta semana de pós-operatório	129
Anexo E - Valores histológicos absolutos dos grupos estudados.....	130
	131
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
	132
APÊNDICE 1 – Carta da Comissão de Ética para Avaliação de Projetos de Pesquisa	

LISTA DE SIGLAS

CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
INCor	Instituto do Coração
LIM	Laboratório de Investigação Médica
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C	antes de Cristo
AD	artéria descelularizada
apud	citado por
ASB	albumina sérica bovina
bFGF	fator de crescimento fibroblástico básico
bras.	brasileiro (a)
CMEM	células multipotentes do estroma mesenquimal
CMEMi	células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas
CMEMd	células multipotentes do estroma mesenquimal diferenciadas <i>in vitro</i> que apresentam fenótipo de células de Schwann
CNTF	fator neurotrófico ciliar
CS	células de Schwann
CTA	células-tronco derivadas do tecido adiposo
d.C.	depois de Cristo
DAPI	marcador fluorescente específico para núcleo
DMSO	dimetilsulfóxido
Dr.	doutor
DW	degeneração Walleriana
ed.	edição
EMG	eletromiografia
et al.	e outros/entre outros
FBS	soro fetal bovino
GALBP	gel acelular de lâmina basal purificada
GAP-43	proteína 43 associada ao crescimento

GDNF	fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia
HB	House-Brackmann
IFU	unidades infectadas
KCl	cloreto de potássio
LV-lac	vetor lentiviral
MEM	meio de cultura mínimo
MIN	meio de indução neural
MOI	multiplicidade de infecção
NaCl	cloreto de sódio
NCAM	molécula de adesão celular neuronal
NGF	fator de crescimento do nervo
p.	página
PAN	potencial de ação do nervo
PAMC	potencial de ação muscular composto
PBS	solução de tampão fosfato
PDGF-AA	fator de crescimento derivado de plaquetas
PFP	paralisia facial periférica
Prof.	professor
rev.	revista
RNA	ácido ribonucleico
TGF	fator de transformação do crescimento
USB	entrada universal serial Bus
v.	volume

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Ampère
cm	centímetro
°C	grau Celsius
div	divisão
g	aceleração da gravidade (9,8cm/s ²)
h	hora
Hz	Hertz
kg	quilograma
kHz	quiloHertz
m/s	metro por segundo
mA	miliAmpère
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimol
mm ³	milímetro cúbico
ms	milissegundo
mV	milivolt
n ^o	número
ng	nanograma
pH	potencial hidrogeniônico
U	unidade
μ	micron (10 ⁻⁶ metros)
μL	microlitro
μm	micrometro
Ω	Ohm
-	menos/negativo
%	porcento

+	mais/positivo
<	menor que
=	igual a
>	maior que
≤	menor ou igual a
≥	maior ou igual a
±	mais ou menos
½	meio
®	registrado

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1	Modelo esquemático do conduíte de silicone utilizados nos procedimentos cirúrgicos. As setas (↔) sinalizam as distâncias e as estrelas (*) as suturas	58
Figura 2	Exame da avaliação funcional objetiva (teste de neurocondução motora)	63
Figura 3	(A) Células CMEMi ; (B) CMEMi/ <i>lacZ</i> + fixadas e tratadas em condições oxidativas, em presença do substrato X-Gal da enzima β -galactosidase, produzida pelo gene-repórter <i>lacZ</i> ; (C) CMEMi/ <i>lacZ</i> + submetidas à imunofluorescência indireta com anticorpo anti- β -galactosidase. A expressão do gene repórter e a atividade da enzima produzida, β -galactosidase, são detectadas pela coloração azul (B) indicando a reação positiva pela digestão do substrato X-gal pela β -galactosidase, ao contrário do controle negativo (A) de CMEMi não transduzidas com o vetor lentiviral que carrega o gene repórter. O ensaio de imunofluorescência com o anticorpo anti- β -galactosidase define somente que houve expressão do gene repórter naquela célula (C). Barras de escala: 50 μ m.....	71
Figura 4	(A) Imagens obtidas em fase, ao microscópio invertido Axiovert 40C® (Zeiss®, Alemanha), durante o tratamento de células CMEMi/ <i>lacZ</i> + em cultura, visando a sua diferenciação em células semelhantes às células de Schwann. Os meios de cultura (A, B e C) indicam as condições em que se encontravam as células durante o tratamento de acordo com o fluxograma em (B) e o período de incubação em cada meio quando a fotografia foi tirada está indicado em horas (h). (B) As unidades de tempo em (B) indicam a duração de cada etapa do tratamento <i>in vitro</i> . Os painéis de imagem em (A) permitem acompanhar a modificação da morfologia das células ao longo do tratamento, sobretudo quando incubadas em meio de cultura C. Neste meio, após 96 e 144 horas, observam-se processos alongados partindo do corpo celular (setas). Barras de escala: 100 μ m (meio A); 50 μ m (meios B e C).....	73

Figura 5	<p>Imunofluorescência indireta de células CMEMd/<i>lacZ</i>+ que foram submetidas ao tratamento completo visando à diferenciação <i>in vitro</i> em células semelhantes a células de Schwann. A marcação dupla foi realizada utilizando-se o anticorpo anti-β-galactosidase, com detecção por Alexa488 (verde, painéis A, D e G) e anticorpos para proteínas com expressão em precursores de células de Schwann (Oct-6, painel B), células de Schwann precursoras e imaturas ($p75^{NTR}$, painel E) e células de Schwann maduras (S100, painel H), com detecção por Alexa 568, em vermelho. Os painéis C, F e I definem a sobreposição das imagens, respectivamente entre os painéis A e B; D e E; e G e H. As imagens sobrepostas mostram que as células com expressão da proteína codificada pelo gene-repórter (β-galactosidase) é a mesma que expressa os marcadores para célula de Schwann, uma vez concluído o tratamento <i>in vitro</i>. Nos painéis G-I, observa-se que a morfologia celular modificou, apresentando um corpo celular mais estrelado e longos processos, característicos de células da glia, corroborando o fenótipo de célula de Schwann madura, indicado pela expressão de S100. Imagens obtidas do agrupamento de seções z do microscópio confocal LSM410 (Zeiss, Alemanha). Barras de escala: 25μm (A-C e G-I); 50μm (D-F).....</p>	74
Gráfico 1	<p>Amplitudes dos PAMCs do lado direito obtidas no pré-operatório, 3^a e 6^a semanas (<i>Teste de Mann-Whitney</i> ajustado pela <i>Correção de Bonferroni</i> com <i>alfa de Bonferroni = 0,008512</i>).....</p>	79
Gráfico 2	<p>Duração dos PAMCs do lado direito obtidos no pré-operatório, 3^a e 6^a semanas (<i>Teste de Mann-Whitney</i> ajustado pela <i>Correção de Bonferroni</i> com <i>alfa de Bonferroni = 0,008512</i>)</p>	80
Gráfico 3	<p>Latência dos PAMCs do lado direito obtidos no pré-operatório, 3^a e 6^a semanas (<i>Teste de Kruskal-Wallis</i>; $p < 0,05$).....</p>	81
Figura 6	<p>Exemplos de PAMCs do lado direito dos grupos A, B, C e D nos três períodos estudados. A coluna 1 representa os PAMCs obtidos no pré-operatório : (A) grupo A; (B) grupo B; (C) grupo C; (D) grupo D. A coluna 2 representa os PAMCs obtidos na 3^a semana: (E) grupo A; (F) grupo B; (G) grupo C; (H) grupo D. A coluna 3 representa os PAMCs obtidos na 6^a semana: (I) grupo A; (J) grupo B; (K) grupo C e (L) grupo D.....</p>	85

Figura 7	Cortes histológicos transversais de 1µm corados com azul de toluidina 1% dos seguimentos proximais (P1 e P') e distas (D1 e D') obtidos através da visualização por microscópio óptico em aumento de 400x, representando uma área de 3,000µm ² (Barra de escala=30µm). A primeira coluna (esquerda) representa os segmentos proximais: (A) grupo A; (B) grupo B; (C) grupo C; (D) grupo D e (N) nervo normal. A segunda coluna (direita) representa os segmentos distais: (E) grupo A; (F) grupo B; (G) grupo C; (H) grupo D; (M) nervo normal	88
Gráfico 4	Comparação da média do diâmetro axonal em uma área parcial (9.000µm ²) (<i>Teste de Mann-Whitney</i> ajustado pela <i>Correção de Bonferroni</i> com <i>alfa de Bonferroni</i> = 0,005116).....	92
Gráfico 5	Comparação do número de axônios em uma área parcial (9,000µm ²) (<i>Teste de Mann-Whitney</i> ajustado pela <i>Correção de Bonferroni</i> com <i>alfa de Bonferroni</i> = 0,005116).....	93
Gráfico 6	Comparação da densidade axonal (número de axônios mielinizados/área parcial 9.000µm ²) (<i>Teste de Mann-Whitney</i> ajustado pela <i>Correção de Bonferroni</i> com <i>alfa de Bonferroni</i> = 0,005116).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição e comparação dos valores das variáveis: amplitude, latência, duração e intensidade de estimulação dos PAMCs obtidos no pré-operatório.....	76
Tabela 2	Descrição e comparação dos valores das variáveis: amplitude, latência e duração dos PAMCs do lado direito obtidos na 3ª semana	77
Tabela 3	Descrição e comparação dos valores das variáveis: amplitude, latência e duração dos PAMCs do lado direito obtidos na 6ª semana.....	78
Tabela 4	Comparação, por período, das variáveis amplitude, latência e duração dos PAMCs do lado direito	82
Tabela 5	Descrição e comparação dos valores dos números, diâmetros e densidades axonais dos segmentos proximais e distais dos grupos estudados	91
Tabela A	Descrição, por grupo e por animal, dos valores da massa corporal inicial, final, suas variações e médias	127
Tabela B	Quantidade e incidência de mortes, por período, em cada grupo	127
Tabela C	Valores absolutos das variáveis: intensidade de estímulo, amplitude, latência e duração dos PAMCs obtidos no pré-operatório	128
Tabela D	Valores absolutos das variáveis de amplitude, latência e duração dos PAMCs obtidos do lado direito, na terceira semana do pós-operatório.....	129
Tabela E	Valores absolutos das variáveis de amplitude, latência e duração dos PAMCs obtidos do lado direito, na sexta semana do pós-operatório.....	130
Tabela F	Valores absolutos da quantidade de axônios, diâmetro e densidade axonal dos grupos estudados.....	131

RESUMO

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** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: O nervo facial desempenha um papel importante em diversas funções fisiológicas no organismo, no entanto, distúrbios funcionais desse nervo podem também afetar a psique do indivíduo, provocando mudanças significativas na autoimagem, interferindo no rendimento profissional e piorando a qualidade de vida. Lesões graves do nervo facial (neurotmeses) mesmo quando tratadas precocemente apresentam resultados funcionais pobres. Com a recente descoberta das células-tronco, as células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas (CMEMi) ou diferenciadas em células com fenótipo de células de Schwann (CMEMd) podem ser uma alternativa melhor para o tratamento de lesões graves do nervo facial.

OBJETIVOS: Avaliar a melhora funcional e histológica do ramo mandibular do nervo facial após neurotmesa e implantação das CMEMi e CMEMd.

MÉTODOS: Em 48 ratos *Wistar* realizou-se a neurotmesa do ramo mandibular direito do nervo facial com a formação de um hiato de 3mm e a tubulização (conduíte de silicone) da região do nervo lesada. Foram criados quatro grupos de acordo com o método de reparo: conduíte de silicone vazio (grupo A, grupo controle); conduíte de silicone com gel acelular (grupo B); conduíte de silicone com gel acelular e CMEMi (grupo C), e conduíte de silicone com gel acelular e CMEMd (grupo D). Um quinto grupo, grupo N, foi criado a partir de segmentos do nervo normal para a avaliação histológica. Os resultados funcionais foram avaliados com o estudo de condução nervosa e os histológicos por avaliação qualitativa e quantitativa dos segmentos proximais e distais.

RESULTADOS: Na avaliação funcional, após 6 semanas, os grupos C e D apresentaram amplitudes maiores que os grupos A e B ($p < 0,001$). O grupo C apresentou duração menor que os grupos A, B e D ($p < 0,001$). Na avaliação qualitativa dos segmentos proximais, houve pouca diferença entre os grupos, já nos segmentos distais, as diferenças dos grupos A e B em relação aos grupos C e D foram bem evidentes, no entanto, em ambos os segmentos, o grupo C foi o que mais se aproximou do nervo normal. Na avaliação histológica quantitativa do segmento proximal, não houve diferença no número total e na densidade axonal entre os grupos ($p \geq 0,169$), somente nos diâmetros axonais dos grupos A e B quando comparados ao nervo normal ($p < 0,001$). No segmento distal, o número e a densidade axonal do grupo C foram maiores que os do grupo A e B ($p = 0,001$) e iguais as do grupo D ($p = 0,711$), porém, em todos os grupos, número e a densidade axonal foram menores que do grupo N ($p \leq 0,003$). Não houve diferença na

média dos diâmetros entre os grupos operados ($p \geq 0,007$), somente quando comparados com o grupo N ($p < 0,001$).

CONCLUSÕES: As CMEMi assim como as CMEMd beneficiaram a regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos *Wistar*, contudo, as CMEMi apresentaram resultados funcionais e histológicos melhores que as CMEMd.

Descritores: Nervo Facial, Células-Tronco, Regeneração Nervosa, Células de Schwann, Ratos, *Wistar*, Eletromiografia, Condução Nervosa, Histologia Comparada.

ABSTRACT

Salomone R. **Regeneration of the mandibular branch of rats' facial nerve regeneration after implanting undifferentiated mesenchymal stromal multipotent cells and differentiated Schwann-like cells *in vitro*** [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

INTRODUCTION: Facial nerve performs an important function in different physiological activities in the organism, however, functional disturbances of such nerve may also attack a person's mind, causing expressive changes in their self-image, interfering in professional life and aggravating their quality of life. Severe lesions in the facial nerve (neurotmesis) present poor functional results even when early treated. With recent discovering of the stem cells, undifferentiated multipotent stem cell (uMSC) from mesenchymal stroma or differentiated to Schwann cell-like (dMSC) can be a better perspective to treat severe lesion of the facial nerve.

OBJECTIVES: The objective of this study is to evaluate the functional and histological improvement of the mandibular branch after neurotmesis and implantation of the uMSC and dMSC.

METHODS: The neurotmesis of the right mandibular branch of the facial nerve with a 3mm gap formation and tubulization (silicone tubing) of the wounded nerve area was performed in 48 Wistar rats. Four groups were divided according to the restoration method: empty silicone tubing (group A, control group); silicone tubing with non-cell gel (group B); silicone tubing with non-cell gel and uMSC (group C) and silicone tubing with non-cell gel and dMSC (group D). A fifth group (N) was created from the normal nerve segments to perform histological evaluation. The nerve conduction study evaluated the functional results; quantity and quality evaluation of the distal and proximal segment evaluated the histological results.

RESULTS: After six weeks, regarding functional evaluation, groups C and D presented larger amplitude than groups A and B ($p < 0.001$). Group C presented lesser duration than groups A, B and D ($p < 0.001$). There was little difference among the groups in the quality evaluation of the proximal segments; on the other hand, the differences in groups A and B in relation to groups C and D were quite expressive in the distal segments. However, group C, in both segments, was the one that came closer to the normal nerve. Regarding quantity histological evaluation of the proximal segment, there was no difference in the total number and in the axonal density among the groups ($p \geq 0.169$); there was difference only in the axonal diameters in groups A and B when compared to normal nerve ($p < 0,001$). Regarding distal segment, axonal density and number, in group C, were higher than in group A and B ($p = 0.001$) and the same as in group D ($p = 0,711$), but number and axonal density were lesser than in group N ($p \leq 0,003$). There was no

difference in the diameter average among the operated groups ($p \geq 0.007$), when only compared to group N ($p < 0.001$).

CONCLUSION: Both uMSC and dMSC benefited regeneration of the mandibular branch of the facial nerve in Wistar rats, although uMSC presented better functional and histological results.

Descriptors: Facial Nerve; Stem cells; Nerve Regeneration; Schwann cells; Rats, Wistar; Electromyography; Neural Conduction; Histology, Comparative.

1 INTRODUÇÃO

“A expressão dos sentimentos pela face é uma das habilidades mais singulares do ser humano, o que torna a perda dos movimentos dessa musculatura bastante angustiante” como cita Salomone (2011).

O nervo facial, sétimo par craniano, desempenha um papel importante em diversas funções do organismo e apresenta uma anatomia bastante complexa. 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 (fibras parassimpáticas pré-ganglionares). No ouvido, é responsável pela eferência do reflexo estapediano e sensibilidade da parte 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 do controle autonômico das glândulas exócrinas (Bento et al., 1985; Bento, Miniti, 1989; Sweet, 1994; May, Schaitkin, 2000; Fontes et al., 2005; Salomone et al., 2011).

Os distúrbios funcionais do nervo facial não causam apenas as alterações fisiológicas mencionadas acima. A perda súbita da expressão e da simetria facial na vigência da paralisia facial pode afetar também a psique do indivíduo, provocando mudanças significativas na autoimagem e na

interação social, interferindo no rendimento profissional e piorando a qualidade de vida (Miniti et al., 1996; Guntinas-Lichius et al., 2007).

Quando acometido, o nervo facial pode apresentar, de acordo com a classificação de Sunderland (Sunderland, 1978), cinco graus de lesão: neuropraxia, axoniotmese, endoneurotmeose, perineurotmeose e epineurotmeose, e essas três últimas resultam da subdivisão do grupo de neurotmeose descrito primeiramente por Seddon, em 1943. Na neuropraxia ocorre um bloqueio neural fisiológico por causa do aumento transitório da pressão intraneural que causa uma mudança da osmolaridade intracelular e altera a condução do impulso elétrico. Na axoniotmeose ocorre a diminuição do retorno venoso, com formação de edema e diminuição do fluxo de nutrientes; já na endoneurotmeose a pressão intraneural não regride, e causa necrose dos tubos endoneurais. A perineurotmeose e a epineurotmeose resultam da transecção total ou parcial do nervo e são consideradas lesões graves (May et al, 2000).

A secção do nervo facial (neurotmeose) desencadeia uma série de modificações em toda a unidade motora. O corpo celular sofre uma espécie de cromatólise não degenerativa denominada “alteração reativa”, com expansão do volume por aumento do metabolismo celular (Nissl, 1892). Já no seguimento proximal ocorre a chamada degeneração traumática, com a diminuição do diâmetro dos axônios (Kreutzberg, 1995) e crescimento de brotos axonais (May et al., 2000). O seguimento distal sofre a chamada “degeneração Walleriana” (DW), caracterizada pela desintegração e reabsorção total deste segmento por células de Schwann (CS) fagocitárias

neoformadas (Sunderland, 1978). 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 (Hess et al., 1970; Ontell, 1974).

A paralisia facial periférica (PFP), descrita por Jackson e Von Doersten (1999) como a mononeuropatia aguda mais comum, tem a denominada idiopática, também conhecida como PFP de “Bell”, como etiologia mais frequente (Bento et al., 1985, Bento, 1988, Bento, Miniti, 1989, May, Schaitkin, 2000, Bento et al., 2008; Salomone, 2011).

Cada vez mais frequentes no cotidiano, principalmente com o aumento da violência e dos acidentes automobilísticos, os traumas de cabeça e pescoço correspondem à segunda causa mais comum de PFP (May, Schaitkin, 2000), sendo o nervo facial o par craniano mais comumente acometido nestes tipos de traumas (Turner, 1944). Fraturas do osso temporal, ferimentos por armas de fogo/brancas, lesões iatrogênicas deliberadas/acidentas são alguns exemplos de traumas que podem causar PFP (Bento et al., 1985, Bento, 1988, Bento, Miniti, 1989, Bento et al., 2008; Salomone, 2011). Ainda, segundo Bento et al. (1985), 57% dos casos de PFP traumática apresentam perda de continuidade parcial ou total do nervo.

O tratamento da PFP depende de alguns fatores como tempo de instalação, etiologia, local e grau de comprometimento do nervo (Salomone, 2011). Quando o nervo facial sofre neurotme, principalmente nos traumas onde há secção total ou parcial do nervo, a recuperação espontânea não é

esperada e os melhores resultados são obtidos com tratamentos cirúrgicos precoces (McGovern, 1970; May, Schaitkin, 2000). Apesar de resultados funcionais pobres (Lundborg et al., 1982; Yanagihara, 1982; McKennan, Chole, 1992; May, Schaitkin, 2000; Hall, 2005; Millest, 2005; Grosheva et al., 2008a, b; Satar et al., 2009; Cho et al., 2010), a sutura término-terminal tem sido a técnica cirúrgica mais eficiente e utilizada na reparação da neurotmeose (Millesi, 1977; Yanagihara, 1982; Bento, 1988; McKennan, Chole, 1992; May, Schaitkin, 2000; Keilhoff, Fansa, 2011). Contudo, nos casos em que essa técnica não pode ser executada, seja por dificuldade cirúrgica, anatômica e/ou por perda de continuidade do nervo, os enxertos autólogos, heterólogos e a tubulização surgem como opções (Millesi, 1977; Fields et al., 1989; Zhang et al., 2000).

A técnica cirúrgica de tubulização é usada principalmente nos casos em que existe perda de grande extensão do nervo e permite que o broto axonal cresça direcionado ao segmento distal, assim como sua mielinização (Doolabh et al., 1996; Battiston et al., 2005). Os conduítes utilizados na tubulização podem ser de origem biológica ou sintética, contendo ou não substâncias adicionais, como fatores de crescimento e/ou medicações. Estes conduítes já foram largamente estudados e seus benefícios estão bem sedimentados (Fields et al., 1989; Battiston et al., 2005; Wang et al., 2011). Contudo, mesmo com os avanços nas técnicas de microcirurgia reparadora com ou sem o uso de conduítes, os resultados funcionais permanecem longe do ideal (Lundborg, 1982; Yanagihara, 1982; McKennan, 1992; Vaughan, Richardson, 1993; Ferreira et al., 1994; May, Schaitkin, 2000;

Hall, 2005; Guntinas-Lichius et al., 2007; Shieh et al., 2007; Grosheva et al., 2008a, b; Satar et al., 2009; Cho et al., 2010) e a ocorrência da “síndrome pós-paralítica” (paresias, sincinesias, alterações de reflexo e tônus) segue como sequela inevitável (Kimura et al., 1975; Bento, Miniti, 1993; Kerrebijn, Freeman, 1998; May, Schaitkin, 2000; Guntinas-Lichius et al., 2007; Sun et al., 2001b).

A regeneração é um fenômeno básico da vida e o tecido nervoso não é uma exceção; porém, os neurônios, por serem células muito especializadas, apresentam regeneração mais complexa e difícil se comparada a células de outros tecidos (Dong, Yi, 2010).

No sistema nervoso periférico, ao contrário do sistema nervoso central, o sucesso da regeneração neural depende do suporte dado pelas CS, formando as chamadas bandas de Bürgner, mielinizando as fibras axonais neo-formadas, produzindo fatores neurotróficos, moléculas de adesão, citocinas e/ou estruturas juncionais (Martini, 1994; Dubey, 1999; May, Schaitkin, 2000; Hall, 2001; Dezawa et al., 2001; Dezawa, 2002). No entanto, a proliferação de CS endógenas, provenientes dos segmentos, é insuficiente para suprir a demanda necessária no processo de regeneração neural, tornando importante uma complementação exógena (Sulaiman, Gordon, 2000; Dezawa, 2002; Wang et al., 2011). Com o objetivo de suprir esta demanda, diversas fontes alternativas de CS têm sido estudadas, como células-tronco do folículo capilar (Amoh et al., 2005), células-tronco derivadas do tecido adiposo (Santiago et al., 2009; Summa et al., 2010; Sun

et al., 2001a, b), células-tronco da crista neural (Aquino et al., 2006), células-tronco embrionárias (Lin et al., 2008a, b) entre outras.

O enxerto de nervo autólogo, além de ser uma alternativa cirúrgica, também é uma possível fonte de CS, porém usá-lo apresenta algumas desvantagens como: dificuldade de cultura e baixa proliferação *in vitro*, limitação do número de nervos periféricos disponíveis, além de cicatrizes e da inevitável seqüela neural na área doadora (Nishiura et al., 2004; Zhang et al., 2008; Yang et al., 2008; Shi et al., 2009; Dong, Yi, 2010). Já as CS originárias de nervos heterólogos sofrem rejeição, tornando necessária a imunossupressão do tecido receptor (Chen et al., 2006a, b). Todos esses fatores corroboram para a criação de outras possíveis fontes de CS.

As células do estroma da medula óssea são sabidamente células-tronco multipotentes (Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999) e satisfazem os requisitos para um transplante ideal de células: fácil acesso, rápida expansão *in vitro* e imunogenicidade baixa (Pittenger et al., 1999; Uccelli et al., 2006; Wang et al., 2011). Além disso, quando devidamente cultivadas, as células-tronco mesenquimais, cuja denominação correta é células multipotentes do estroma mesenquimal (CMEM), possuem a capacidade de se diferenciar em células de várias linhagens, inclusive ectodérmica, e expressar o fenótipo de CS, tornando-se uma alternativa excelente para aquisição de CS exógenas (Prockop, 1997; Woodburg et al., 2000; Zhang et al., 2004).

Diante do exposto acima, a terapia regenerativa com células-tronco, recém descoberta, foi o estímulo para testar a hipótese seguinte: As células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas e/ou diferenciadas *in vitro* que apresentam o fenótipo de células de Schwann são uma alternativa real para o tratamento de lesões graves do nervo facial?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Avaliar por meio de potenciais de ações musculares compostos obtidos com o teste de neurocondução motora (eletro-neuromiografia), a regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos, após neurotome e implantação de células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas e diferenciadas *in vitro* que apresentam fenótipo de células de Schwann.

2.2 Objetivos secundários

Avaliar diferentes aspectos histológicos qualitativos (quantidade de fascículos, arranjo axonal e neoangiogênese) e quantitativos (diâmetro, quantidade e densidade dos axônios mielinizado) da regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos, após neurotome e implantação de células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas e diferenciadas *in vitro* que apresentam fenótipo de células de Schwann.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Modelo animal

Szal e Miller (1975), Aldskogius et al. (1980) e Spector et al. (2000) referem que por causa de seu longo trajeto intra-ósseo, a resposta regenerativa do nervo facial não é semelhante a de outros nervos periféricos.

De acordo com inúmeros autores, o nervo ciático de ratos é um dos modelos animais mais utilizados para o estudo experimental da regeneração do nervo periférico por causa de sua longa extensão e facilidade de acesso (Lundborg, Longo, 1982; Seckel et al., 1984; De Medinaceli, Seaber, 1989; Buttemeyer et al., 1995; Lewin et al., 1997; Mohammad et al., 2000; Dezawa et al., 2001; Murakami et al., 2003; Keilhoff et al., 2006; Yang et al., 2011, Dadon-Nachum et al., 2011).

Segundo Mattox e Felix (1987) o nervo ciático divide-se em fascículos logo após emergir do *sacrum*, podendo causar alterações nos resultados funcionais e histológicos.

Segundo Mattox e Felix (1987), Borin et al. (2006) e Salomone et al. (2012) todos os modelos animais utilizados para o estudo da regeneração do nervo facial apresentam vantagens e desvantagens. Esses autores referem que animais grandes como porcos, ou médios como gatos, coelhos e cobaias apresentam dificuldade de manuseio, manutenção, custo alto,

resistência baixa e tolerabilidade anestésica baixa além de não resistirem a paralisia facial periférica bilateral.

Bento (1988) comparou o adesivo tecidual fibrinítico e a sutura epineural na coaptação do nervo facial em gatos em razão da semelhança anatômica do nervo facial desse animal com a o do ser humano, além do mínimo efeito traumático que a ação cirúrgica provoca sobre o nervo na região mastóidea no referido felino.

Barrs (1991) utilizou porcos em sua pesquisa sobre o tempo ideal para o reparo do trauma do nervo facial em razão do extenso seguimento vertical mastóideo que esse animal possui.

Kinderman e Jones (1994) estudaram as mudanças induzidas pela axotomia nos níveis de ácido ribonucleico (RNA) ribossômico dos neurônios motores do nervo facial de *hamsters* do gênero feminino e concluíram que a regeneração dos motoneurônios do nervo facial sofre influência do ciclo hormonal feminino.

Costa (2003) realizou estudo experimental sobre a regeneração pós-traumática do nervo facial em coelhos em função da conhecida e típica reação microbiológica pós-traumática que ocorre no nervo facial desses animais, além da semelhança anatomo-topográfica com o do ser humano.

Borin et al. (2006) em seu estudo comportamental e histológico da regeneração do nervo facial em ratos, referiu-se aos ratos Wistar como “animais amplamente utilizados no estudo do nervo facial” pois são de fácil aquisição e manejo, toleram bem a paralisia facial mesmo essa sendo

bilateral, possibilitam alojamento em gaiolas coletivas, bem como apresentam facilidade de anestesia e resistência a infecções.

3.2 Anatomia e histologia do nervo facial de ratos

Donaldson (1924), em seu livro exibe todos os parâmetros metabólicos e de crescimento de ratos.

Os autores Greene (1955), Wingerd (1988) e Gheorghe (2001) em seus livros descrevem detalhadamente a anatomia dos ratos utilizados em pesquisas experimentais.

Anatomicamente, o nervo facial de ratos Wistar emerge do forame estilomastoídeo, na parte lateral do crânio. O primeiro ramo, auricular posterior, é responsável pela inervação da musculatura auricular e emerge logo após este forame, o que dificulta acessá-lo sem retirar parte do osso temporal (Greene, 1955; Hebel, Stromberg, 1976; Mattox, Felix, 1987).

De acordo com Greene (1955), Hebel e Stromberg (1976) e Mattox e Felix (1987) o tronco do nervo facial, seguimento que vai desde o ramo auricular posterior até o início de sua bifurcação cervical e cervical posterior, mede aproximadamente 6mm e é facilmente visualizado ântero-inferiormente, passa entre o músculo *tapezius* e o canal auditivo externo. As artérias occipital e póstero-auricular passam abaixo do ponto médio deste segmento e são separadas do nervo por uma fásia muito fina.

Greene (1955), Guntinas-Lichius et al. (2005) e Grosheva et al. (2008b) descrevem o ramo mandibular do nervo facial que se bifurca em sua extremidade final e resulta em ramos terminais apenas para o músculo do lábio inferior.

O rato não possui veia jugular interna, por isso toda a drenagem venosa da cabeça ocorre por tributárias da veia jugular externa, a qual passa lateral à maioria dos ramos (Greene, 1955; Hebel, Stromberg, 1976; Mattox, Felix, 1987).

Os ramos temporal e zigomático podem emergir tanto do tronco do nervo facial quanto do ramo bucal e não são muito utilizados em estudos experimentais, pois possuem um padrão complexo de anatomia, e se interlaçam com tributárias da veia jugular externa, além de posicionados próximos aos olhos (Greene, 1955; Hebel, Stromberg, 1976; Mattox, Felix, 1987).

De acordo com Hebel e Stromberg (1976), e Mattox e Felix (1987) o segundo ramo do nervo facial, cervical posterior, é o menor e primeiro ramo da divisão. O ramo cervical, terceiro ramo do nervo facial, é o mais posterior e inferior dos ramos, passa na parte inferior da veia jugular externa. O quinto ramo, o bucal, segue entre os músculos *masseter* e *temporalis* e passa abaixo do olho e seguindo em direção ao nariz.

Hebel e Stromberg (1976), Dörfel (1982), Semba e Egger (1986), Mattox e Felix (1987) e Hadlock et al. (2005) referem que as divisões finais do ramo mandibular de ratos Wistar inervam tanto fibras musculares do lábio inferior

quanto do superior.

Dörfl (1982), Klein e Rhoades (1985), Semba e Egger (1986) citam que a porção infratemporal do nervo facial de ratos é puramente motora assemelhando-se a outros nervos periféricos.

Segundo Semba e Egger (1986) o padrão de ramificação do nervo facial de ratos não difere entre os roedores e assemelha-se bastante ao dos gatos, cachorros e outros mamíferos.

Mattox e Felix (1987) referem que as respostas dos estudos da regeneração do nervo facial de ratos podem não refletir exatamente a situação clínica humana na qual a regeneração dos nervos têm menos escolha de direção do crescimento, uma vez que tenham entrado em fascículos.

Mattox e Felix (1987) realizaram um estudo sobre a anatomia cirúrgica do nervo facial de ratos Wistar no qual descrevem algumas vantagens de sua utilização como similaridade anatômica com os de muitos outros mamíferos não primatas, ramos periféricos que repousam sobre a fáscia que recobre os músculos da face, no tecido subcutâneo, facilitando sua visualização e dissecação.

Ainda, de acordo com Mattox e Felix (1987) o nervo facial de ratos, assim como em outros roedores, passa abaixo, e não através da glândula parótida, ajudando seu deslocamento e individualização. Esses autores descrevem o ramo mandibular do rato Wistar, como “o mais óbvio dos ramos”, facilmente identificado que cruza a parte baixa da porção central do

músculo masseter. Com extensão de 15mm, suas possíveis ramificações iniciam-se somente após 10-12mm, e permitem a realização de cirurgias e alinhamento do enxerto sem alterar os resultados funcionais e histológicos. Além disso, os autores citam que histologicamente, o tronco do nervo facial de ratos *Wistar* é monofascicular, apresentando em média 4650 (± 256) axônios.

O ramo mandibular apresenta 1862 axônios e uma pequena variação (± 359), o que ajuda na utilização de poucos animais por experimento. A quantidade total de axônios em cada feixe não varia mais que 5%, e a média da diferença da quantidade dos axônios entre os lados é de 15%, e não ultrapassa 33%. Seus fascículos, de 3 a 5, são envoltos por tecido conectivo perineural e só são visualizados microscopicamente após a identificação macroscópica (Mattox, Felix, 1987).

Segundo alguns autores, nos ratos, os axônios dos nervos periféricos podem formar pontes de até 10 mm (Labrador et al., 1988, Lundborg et al., 1994; Evans, 2000; Grosheva et al., 2008a, b).

May e Schaitkin (2000) descrevem que em humanos, o diâmetro dos axônios do nervo facial medem entre 3 μ m e 20 μ m e a distância entre os nódulos de Ranvier varia de 0,1mm a 1,8mm.

Segundo Costa et al. (2012) em estudo sobre a histologia do ramo mandibular do nervo facial de ratos relatam que a densidade parcial média dos axônios dos segmentos distais e proximais foram, respectivamente 0,18 \pm 0,02 e 0,19 \pm 0,02 axônios/ μ m². Os autores não observaram diferenças

estatisticamente significativas entre os lados ($p=0,248$; $p=0,533$) e nem entre os segmentos proximais e distais ($p=0,859$; $p=0,182$). Além disso, referem que a área estudada (9.000m^2) corresponde a mais de 90% do nervo total.

3.3 Técnicas cirúrgicas de reparação do nervo facial

Bunke e McLean (1971) especificam que a agulha usada em técnica cirúrgica de reparação do nervo facial deve ser curva e do tamanho 6 para não interferir nos resultados da sutura neural.

Hueter, em 1873 (apud Bento, 1988), foi o primeiro a obter algum sucesso na reparação cirúrgica de um nervo (Hueter, 1873; Bento, 1988).

Conforme os relatos de Szal e Miller (1975), não se pode usar fios de sutura maiores que 10-0 na realização da sutura neural por causa do tamanho dos fascículos do nervo facial.

A sutura término-terminal é considerada a técnica “padrão ouro” de reparação neural desde 1873 (Millesi, 1977; Yanagihara, 1982; Bento, 1988; McKennan, Chole, 1992; May, Schaitkin, 2000; Keilhoff, Fansa, 2011).

Autores como Bunelli (1978) e Bento (1988) referem que a primeira descrição de um ato cirúrgico sobre um nervo data do século XIII e foi realizado por Saliceto.

Crumley (1980) menciona que os melhores resultados em coaptações do nervo facial foram obtidos com suturas perineurais que utilizavam fio

mononylon 10-0.

Segundo Lundborg (1982), Yanagihara (1982), McKennan (1992), May et al. (2000), Hall (2005), Millest (2005), Grosheva et al. (2008 a, b), Satar et al. (2009) e Cho et al. (2010) os resultados funcionais obtidos com a sutura término-terminal permanecem insatisfatórios até os dias atuais.

De acordo com Barrs et al. (1984), Liu et al. (2007) e Satar et al. (2009), quando é realizada por mãos experientes, os resultados da sutura término-terminal não ultrapassam o grau III da escala House-Brackmann (HB).

Conforme Weiss (1944) (*apud* Le Beau, 1988) na tubulização, um espaço curto deixado entre os cotos seria benéfico para a regeneração, pois permitiria a formação de um coágulo neste local. Estudos histológicos do autor mostraram que, sob tensão, o coágulo produz filamentos de fibrina orientados de forma linear, além de outros materiais, de modo a colmatar as extremidades cortadas e ajudar no crescimento dos cones de forma adequada. Pesquisas recentes com a técnica de microscopia eletrônica confirmaram que a matriz não celular do material, que é condensada a partir de fluidos secretados para dentro do tubo, forma uma espécie de “andaime”, essencial para o desenvolvimento de elementos primários, necessários para a regeneração neural do segmento rompido (Le Beau et al., 1988).

Fileds (1989) define a técnica de tubulização como a “introdução das extremidades proximal e distal de um nervo seccionado em uma estrutura tubular, que pode ou não conter substâncias e/ou outros adjuntos para fins

experimentais ou para promover a cura”. Ele também afirma que na tubulização pode ser necessária a realização de sutura, o que corrobora para ancoramento do nervo ao tubo ou para manter os segmentos proximal e distal do nervo em justaposição. Esse autor ainda relata que a vantagem da aplicação dessa sutura nas extremidades dos tubos está na preservação da correspondência entre os fascículos do segmento proximal e distal.

A tubulização apresenta algumas vantagens como proteção contra compressão, orientação mecânica das fibras em crescimento, confinamento dos fatores neurotróficos, redução da invasão de células do tecido conjuntivo, direcionamento longitudinal dos vasos intraneurais, diminuição da formação de neuromas, além de dificultar o deslocamento e/ou rotação dos segmentos do nervo. Outra vantagem é a de proporcionar um meio de administração e coleta de substâncias, fornecendo uma câmara experimental *in vivo*, que pode ser usada para estudos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos da regeneração nervosa. (Fileds, 1989)

De acordo com Spector (1991), a técnica cirúrgica de tubulização evoluiu espontaneamente no meio do século XX.

Para Doolabh et al. (1996), Battiston et al. (2005) a técnica de tubulização é indicada nos casos em que há perda de grande extensão de nervo, e permite que o broto axonal cresça direcionado ao segmento distal, bem como que ocorra sua mielinização.

Autores como Millesi (2000), Zhang et al. (2008), Ladak et al. (2011), Sun et al. (2001) e Keilhoff e Fansa (2011) indicam o enxerto autólogo para

casos em que há perda de contiguidade do nervo, e não é possível realizar a sutura término-terminal; também serve como fonte endógena de CS.

Segundo Dezawa (2002), Hu et al. (2005), Yang et al. (2008), Shi et al. (2009), Fang et al. (2010), Wang et al. (2011) e Keilhoff e Fansa (2011) o uso de enxerto autólogo apresenta inúmeras desvantagens, como escassez de fonte doadora, resultados insuficientes, além de trazer sequelas neurais inevitáveis ao doador.

Galeno, em 200 a.C. (apud Costa, 2003), foi o primeiro a relatar a possibilidade de regeneração de um nervo lesado.

Costa (2003) descreve que Argino, em 600 d.C., foi o primeiro a realizar uma neurorrafia.

Calyan (2006) cita que, quando é necessário usar enxerto autólogo para a reparação cirúrgica do nervo facial, os resultados funcionais variam entre IV-III da escala House-Brackmann.

Segundo Keilhoff e Fansa (2011) o uso de aloenxertos é restrito, pois em geral são rejeitados e requerem imunossupressão contínua.

3.4 Conduítes

Glück, em 1880, foi o primeiro a usar um conduíte (dreno cirúrgico) de osso, na tentativa de reparar um nervo dividido, porém, não obteve sucesso.

Em 1881, Glück experimentou usar conduítes de outros materiais como: tiras de couro dinamarquês, feixes de categute, fragmentos de músculo e pele.

Vanlair (1882) instituiu uma série de estudos experimentais utilizando drenos cirúrgicos de osso descalcificado para reparar descontinuidades de nervos ciáticos de cães, que mediam 3cm, e constatou substituição do tecido ósseo por fibras regeneradas distais à lesão.

Von Büngner (1891, 1893) utilizou artéria braquial e Notthaft (1893) artéria aorta de coelhos na tentativa de reparação neural.

Weiss (1944) descreveu 20 tipos diferentes de revestimento do sítio da sutura, usados entre 1880 e 1943. Entre eles havia pergaminhos, penas e tântalo.

Segundo Weiss (1944), Ducker e Hayes (1968) e Szal e Miller (1975) conduítes com espessura de 0,066-0,005 polegadas, por causa de sua elasticidade, associam-se com a diminuição de neuromas.

Autores como Campbell e Luzio (1964), Hirasawa e Marmor (1967), e Ducker e Hayes (1968) relatam que tubos muito curtos não conseguem permanecer na posição do sítio de reparação. Por outro lado, envoltórios muito extensos, que medem 8-9mm (Campbell, Luzio, 1964), 10mm (Hirasawa, Marmor, 1967) e 40mm (Ducker, Hayes, 1968), podem interferir no suprimento sanguíneo causando necrose, diminuição na condução neural ou desconexão das fibras axonais.

As dimensões do tubo podem afetar significativamente a regeneração

do nervo, independente de que material esse condúite é produzido. Por isso, o tubo de silicone deve ser relativamente curto e largo para que as condições sejam favoráveis ao crescimento neural (Ducker, Hayes, 1968).

De acordo com Ducker e Hayes (1968) tubos muito finos podem colabar e estenosar.

O diâmetro dos condúites de silicone deve ser duas vezes e meia a três vezes mais largo que o diâmetro do nervo seccionado, para permitir a formação de edema sem que haja lesão estrutural (Ducker, Hayes, 1968).

Ducker e Hayes (1968) concluíram que o tubo de silicone seria o melhor material para a reparação de nervos periféricos após estudarem a reparação de lesões do nervo periférico de cães e chimpanzés, e compararem os envoltórios de silicone com Millipore® (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), além de demonstrarem que os tubos de silicone são bem tolerados em chimpanzés, mesmo após 3 anos da implantação.

Szal e Miller (1975) descrevem que veias e tubos de silicone, usados durante a coactação neural, interferem na regeneração dos segmentos e causam a diminuição do crescimento axonal por causa da diminuição do espaço e possíveis estenoses.

Segundo Chiu et al. (1982), Fields et al. (1989) e Spector (1991), o tubo de silicone é inerte, elástico e transparente; por isso é o condúite artificial mais utilizado.

Fields et al. (1989) citam a utilização de condutas confeccionadas com diversos tipos de materiais como: aço inoxidável, traqueia, ágar, peritônio, caseína, colágeno, *dura mater*, epineuro, fáscia, gordura, gaze, gelatina, vidro, magnésio, mesotélio, fibra de celulose, policarbonatos, poliéster, polietileno e policloreto de vinil, entre outros.

3.5 Células de Schwann

Em 1939, Theodor Schwann foi o primeiro a descrever as CS, que, em homenagem a esse fisiologista de origem alemã, receberam seu sobrenome.

As CS dão suporte ao nervo lesado, por isso, o transplante destas células contribui para um melhor resultado regenerativo se comparado à simples liberação de fatores de crescimento (Hall, 1978; Ide, 1996; Fansa et al., 1999; Bhatheja, Field, 2006; Madduri, Gander, 2010; Muir, 2010; Schmitte et al., 2010; Keilhoff et al., 2011).

Segundo Windebank et al. (1985), a expressão do gene responsável pela mielinização reflete diretamente a capacidade das CS em produzir mielina. Ainda, segundo esses autores, se o diâmetro do axônio regenerado for menor que $0,7\mu\text{m}$ ou a interação entre axônio e CS formadora de mielina não for estabelecida, o processo de mielinização não ocorrerá.

Os autores Fawcett e Keynes (1990), Hall et al. (2001) e Dezawa et

al. (2002) referem-se à mielinização como o que determina a qualidade da regeneração axonal e, por consequência, a recuperação funcional.

No início do processo de regeneração, uma CS envolve vários axônios; já no final, cada CS envolve apenas um axônio (Fawcett, Keynes, 1990; Hall et al., 2001; Dezawa et al., 2002).

Fawcett e Keynes (1990), Torigoe et al. (1996), May e Schaitkin (2000) e Hall et al. (2001) descrevem como principais características da degeneração Walleriana a proliferação e a ativação das CS remanescentes dentro do segmento distal, o que resulta na formação de cordões de CS.

Segundo Guenard et al. (1992), Caddick et al. (2006), Chen et al. (2006 a, b), Lin et al. (2008b) e Cho et al. (2010), o grande obstáculo ao utilizar as CS na prática clínica está em conseguir quantidade suficiente de CS autólogas, pois as CS alogênicas sofrem rejeição imunológica.

As CS também são responsáveis por formação das junções comunicantes e de oclusão, as quais servem como locais de aderência e ligação mecânica, estabilizam o contato e facilitam o tráfego de substâncias entre o axônio em regeneração e as CS, e tornam estável a interação entre estas células (Dermietzel, Spray, 1993; Dezawa et al., 1998; Dezawa, Adachi-Usami, 2000). Segundo Dezawa (2002), as junções comunicantes formam uma linha direta para o tráfego de pequena, porém importante, quantidade de fatores intracelulares.

Bolin e Shooter (1993) descrevem a relação reguladora íntima existente entre as CS e os axônios. Axônios desmielinizados enviam sinais

que agem regulando os genes que controlam a diferenciação e a proliferação da CS. Em contrapartida, as CS enviam sinais que regularizam a expressão gênica e os sinais intracelulares dos axônios. Quando esta relação estreita axônio-CS é prejudicada por uma lesão e subsequente degeneração Walleriana, as CS rapidamente diminuem a expressão do gene de mielinização e aumentam as afinidades dos receptores de neurotrofina p75, proteína 43 associada ao crescimento (GAP-43), além de desdiferenciarem-se e dividirem-se (Hall et al., 2001).

Muitos autores sugerem que as CS sejam um dos componentes mais importantes do processo de regeneração do nervo periférico (Martini, 1994; Bunge, 1994; Ide, 1996; Dubey et al., 1999; Dezawa et al., 2001; Hall et al., 2001; Dezawa, 2002; Mosahebi et al., 2003; Bhatheja, Field, 2006; Cui, 2006; Cui et al., 2008; Lin et al., 2008a, b; Webber, Zochodne, 2010; Madduri, Gander, 2010; Krekoski et al., 2001; Hall et al., 2001; Wang et al., 2011).

Os processos de degeneração Walleriana e posterior regeneração neural são acompanhados pela proliferação e ativação das CS, as quais produzem vários tipos de fatores neurotróficos, moléculas de adesão, estruturas juncionais e citocinas, além de remover os restos de mielina e formar as chamadas bandas de Büngner (colunas que servem tanto como orientação para o crescimento axonal quanto para produzir e estocar moléculas de adesão) (Martini et al., 1994; Bunge, 1994; Ide, 1996; Dubey et al., 1999; May, Schaitkin, 2000; Hall et al., 2001; Dezawa et al., 2002; Mosahebi et al., 2003; Nishiura et al., 2004; Bhatheja, Field., 2006; Cui.,

2006; Lin et al., 2008a, b; Zhou et al., 2008; Webber, Zochodne, 2010; Madduri, Gander, 2010; Cho et al., 2010; Krekoski et al., 2001).

As CS desnervadas expressam uma longa gama de moléculas de adesão celular que atuam via receptores de membrana como as moléculas de adesão celular neuronal (NCAM), L1-N-cadherin e integrinas (α -1, α -6- β -1 e β 1-integrina) (Martini, 1994; Ide, 1996). Algumas dessas moléculas podem também ser encontradas nos cones de crescimento axonal e na interface das CS, por um longo período durante a regeneração neural, mediando e anexando as membranas basais dos axônios a estas células (Martini, 1994; Ide, 1996; Mahanthappa et al., 1996). Algumas moléculas extracelulares produzidas pelas CS, como fibronectina, laminin γ , tenacin e merosin/laminin-2, também são reconhecidas por auxiliarem os axônios lesados a se anexarem e se estenderem. (Agius, Cochard, 1998; Chernousov, Carey, 2000). Ocorrida a reinervação, as CS cessam sua divisão e diminuem a expressão destas moléculas (Hall et al., 2001; Dezawa, 2002).

Von Bartheld (1998), Abe et al. (2001) e Hall (2001) acreditam que os fatores neurotróficos sejam a chave para a regularização e modulação da sobrevivência neuronal. Segundo esses autores, as CS produzem vários tipos de fatores tróficos e receptores, incluindo neurotrofinas, fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator de transformação do crescimento (TGF), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF), os quais atuam via receptor de membrana, contribuindo para a regeneração axonal.

May e Schaitkin (2000) e Dezawa (2002) e descrevem que após uma lesão, o nervo periférico inicia uma conhecida cascata de eventos celulares e moleculares nos seguimentos proximal, distal e no local da lesão, evidenciando a direta e dinâmica participação das CS no processo de degeneração e regeneração neural.

De acordo com Garbay et al. (2000), Dombrowski et al. (2006) e Wang et al. (2011), os principais eventos da regeneração do nervo periférico são a extensão axonal e sua mielinização, que requerem o envolvimento longitudinal do axônio por CS.

Autores como Millesi (2000), Zhang et al. (2008), Ladak et al. (2011), Sun et al. (2001) e Keilhoff e Fansa (2011) indicam o enxerto autólogo para casos em que há perda de contiguidade do nervo, e não é possível realizar a sutura término-terminal; o enxerto autólogo também serve como fonte endógena de CS.

Próximo ao local da lesão, os danos ocorridos nos axônios influenciam na via de sinalização intracelular, que induz a expressão de vários genes relacionados à emergência de células, incluindo c-fos e c-jun (Soares et al., 2001), os quais estão relacionados com a formação dos cones de crescimento. Os cones usam os túneis formados pelas CS como orientação para o crescimento das fibras (Mahanthappa et al., 1996; May et al., 2000; Dezawa et al., 2002).

No local de lesão e no seguimento distal, inicia-se a chamada degeneração Walleriana. No início deste processo os axônios degenerados

e a bainha de mielina são fragmentados e fagocitados pelas CS e por macrófagos originários de outros locais (Dezawa et al., 2002). Esses autores ainda referem que as CS são capazes de reconstruir a mielina após a indução da regeneração axonal.

De acordo com Dedkov et al. (2002), as CS que perdem o contato com o nervo diminuem progressivamente a habilidade de ajudar no processo de regeneração neural.

Segundo Dezawa et al. (2002), após uma lesão, as CS nativas, já totalmente diferenciadas, mudam rapidamente sua estrutura e suas características, tornando-se indiferenciadas e iniciando sua proliferação.

Boyd e Gordon (2003), Shi et al. (2009) e Barras et al. (2009) relatam que o GDNF é crucial para a manutenção e sustentação do neurônio motor do nervo facial e que, com a permanência da denervação, as CS perdem a capacidade de secretar este fator.

Shi et al. (2009) afirma que as CS são de cultivo difícil e apresentam proliferação *in vitro* baixa.

Keilhoff e Fansa (2011) refere-se a possibilidade da regeneração neural ser limitada não apenas pelas CS, mas também por cicatrizes, fibras incompatíveis ou crescimento aberrante das fibras regeneradas.

3.6 Células multipotentes do estroma mesenquimal

A presença de células-tronco não hematopoiéticas na medula óssea foi sugerida, primeiramente, pelas observações realizadas pelo patologista Alemão Cohnheim, em 1867 (apud Prockop, 1997). Goujon (1869, apud Sell, 2003) foi o primeiro a documentar a presença de células mesenquimais progenitoras na medula óssea.

Em 1924, o morfolologista russo Alexander A. Maximow (apud Sell, 2003) identificou no mesenquima um tipo singular de célula, a qual se diferenciava em diversos tipos de células sanguíneas.

No ano de 1963, os cientistas Ernest A. McCulloch e James Til citados por Prockop (1997) revelaram a natureza clonal das células da medula óssea. Alguns anos mais tarde, Friedenstein et al. (1970a, b) publicaram dois ensaios *ex vivo*, analisando o potencial de clonagem das células multipotentes da medula.

A primeira apresentação formal de células-tronco residentes na medula óssea foi publicada por Owen, em 1978. Contudo, somente em 1997, Prockop (1997) conseguiu isolar e demonstrar a diferenciação das células da medula óssea em osteoblastos, condroblastos, adipócitos e mioblastos.

Owen (1978) descreve células-tronco como células que possuem a capacidade de dividir-se, dando origem a células semelhantes às suas progenitoras. Segundo Beresford (1989), célula-tronco é um tipo especial de célula que tem a capacidade única de se autorrenovar e dar origem a células

especializadas. Caplan (1991) define células-tronco como células que apresentam três características: autorrenovação, habilidade de se diferenciar em outros tipos celulares e capacidade *in vivo* de reconstruir um tecido novo.

Caplan (1991) e Gimble et al. (2008) definem células-tronco mesenquimais como células-tronco não hematopoiéticas multipotentes presentes em vários tecidos adultos.

Em 1992, Reynolds e Weiss (1992) isolaram células do *striatum* do cérebro de um rato adulto capazes de se dividir, crescer e multidiferenciar-se, o que derrubou a teoria tradicional de que as células neurais não são capazes de se regenerar.

De acordo com Prockop (1997), as células-tronco mesenquimais são elementos do tecido conjuntivo que fornecem suporte estrutural e funcional para hematopoese e que, recentemente, foram reconhecidas como células progenitoras capazes de diferenciar-se em tecidos.

Segundo Pittenger et al. (1999), Hori et al. (2003) e Uccelli et al. (2006a, b) as células-tronco mesenquimais apresentam imunogenicidade baixa, e são capazes de sobreviver em ambientes não imunes.

Woodburg et al. (2000), Cuevas et al. (2002), Barcelos et al. (2003) Gomillion e Burg (2006), Cho et al. (2010) e Sun et al. (2001a, b) relatam que as CMEM indiferenciadas, assim como as diferenciadas, são capazes de secretar fatores neurotróficos, proporcionando um microambiente favorável para a sobrevivência das células neurais, estimulando e apoiando o crescimento, a maturação e a diferenciação das CS.

De acordo com Shi et al. (2001), Dezawa et al. (2004) Dezawa et al. (2005) e Gimble et al. (2008), as células-tronco mesenquimais produzem citocinas como a IL-6, a qual sabiamente atua no processo de regeneração de fibras nervosas.

Para Muschler e Midura (2002) células-tronco são células em repouso que apresentam duas propriedades: capacidade de divisão assimétrica e autorrenovação. Essa divisão assimétrica é a capacidade de uma célula-tronco, depois de ativada por um estímulo sofrer uma divisão na qual uma célula permanece em repouso (estado original de repouso igual ao da célula-mãe), e a outra origina uma célula denominada progenitora, que tem a capacidade de se proliferar e posteriormente diferenciar-se, formando tecidos maduros.

Dezawa (2002) refere que as células-tronco mesenquimais estão diretamente associadas à formação de mielina das fibras regeneradas dentro do enxerto.

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (2005) atualmente recomenda que se use o termo “células multipotentes do estroma mesenquimal” para as células aderentes ao substrato plástico, isoladas da medula óssea e que, frequentemente, são rotuladas como células-tronco mesenquimais.

Dezawa (2006) refere que, além das células-tronco das células hematopoiéticas, a medula óssea contém outro tipo de célula com fenótipo de células-tronco, as chamadas “stem-like cells”, as quais são precursoras

das células não hematopoiéticas. Essas células, inicialmente, foram reconhecidas como células aderentes ao substrato plástico ou unidade de colônia formadora de fibroblastos e, só recentemente, como células-tronco mesenquimais ou do estroma da medula óssea (Prockop, 1997; Horwitz et al., 2005).

Gnecchi e Melo (2009), Colter et al. (2000) e Keilhoff e Fansa (2011) relatam que as técnicas de colheita e expansão das CMEM são simples, de fácil reprodutibilidade e não apresentam restrições na aquisição. Além disso, as CMEM são capazes de interagir e sobreviver em diferentes tecidos hospedeiros.

Grosheva et al. (2008 a, b) sugere que as CMEM promovem um enorme suporte trófico, o qual provocaria o crescimento excessivo de ramos colaterais advindos de vários axônios no local da lesão e, conseqüentemente, uma poli-inervação das placas motoras.

Keilhoff e Fansa (2011), em seu trabalho de revisão, publicado em uma revista experimental, concluem que a terapia com células-tronco tornou-se uma esperança real e não apenas uma “promessa vazia”.

3.7 Caracterização celular

Os marcadores de superfície utilizados para células-tronco mesenquimais indiferenciadas não são específicos, pois são expressos em

células musculares, mesenquimais, epiteliais e também endoteliais. Por isso, alguns autores consideram células-tronco quando as células são positivas para CD29, CD 73, CD44, CD71, CD90 (Thy-1), CD105, CD106 ou CD166 e negativas para os marcadores da linhagem hematopoiética como CD11b, CD14, CD19, CD 79 α , CD31, CD34, CD38, CD45, CD80, CD86 e etc. (Haynesworth et al., 1992; Joyner et al., 1997; Flores-Figueroa et al., 2005; Chen et al., 2006a, b; Calyan et al., 2006; Lin et al., 2008a, b; Gimble et al., 2008; Wang et al., 2011; Kohyama et al., 2011).

As células-tronco podem ser caracterizadas por diversas formas e critérios, incluindo morfometria, imunofenotipagem de superfície, transcriptoma, perfil de citocina e proteoma (Caddick et al.; 2006; Satar et al., 2009).

Dominici et al. (2006) estabeleceram três critérios para identificação das células-tronco mesenquimais: 1- aderência ao substrato plástico; 2- expressão dos antígenos de superfície positivos ($\geq 95\%$ de expressão) para CD105, CD73 e CD90, e negativo ($\leq 2\%$ de expressão) para CD45, CD34, CD14, CD11b e CD79 α ; e, 3- potencial multipotente de diferenciação para três linhagens de células: osteoblastos, adipócitos e condroblastos.

Caddick et al. (2006), Lin et al. (2008 a ou b?), Sun et al. (2001a) e Wang et al. (2011) utilizam a morfometria celular como uma das formas de caracterização das células-tronco mesenquimais indiferenciadas e diferenciadas.

Satar et al. (2009) caracterizaram as células-tronco mesenquimais

indiferenciadas, usadas em sua pesquisa, apenas por morfometria celular (células aderidas ao substrato plástico e confluência de 70% após a 3ª passagem).

Shah et al. (1996), Jessen e Mirsky (1999), Morrison et al. (1999), Zhang et al. (2004), Caddick et al. (2006), Lin et al. (2008b) e Wang et al. (2011) consideram a expressão das proteínas GFAP, S100 e p75 específicas de CS, as quais não são expressas em células-tronco indiferenciadas.

Segundo Lin et al. (2008b) a quantificação da expressão da proteína S100 depende do tempo de diferenciação. Os autores descrevem que as células-tronco mesenquimais, induzidas com β -mercaptoetanol e ácido all-trans retinóico, começam expressar a proteína S100 no citoplasma, ao redor do núcleo, após o terceiro dia. Seis dias após a indução com forskolin, bFGF, fator de crescimento derivado de plaquetas e heregulina, as células-tronco mesenquimais atingem seu pico de diferenciação, com a quantidade máxima de células diferenciadas, indicando um amadurecimento das CS. Nove dias após a indução, as células-tronco mesenquimais diferenciadas não conseguem mais sintetizar a proteína S100, que diminui e migra para periferia. Quinze dias após a indução, a expressão da proteína S100 cai ainda mais, e é visualizada apenas nas pontes citoplasmáticas.

3.8 Diferenciação das células multipotentes do estroma mesenquimal

A capacidade de diferenciação *in vitro* das células-tronco mesenquimais em células com fenótipo de células de Schwann é demonstrada por vários autores desde o final da década de 90 (Jan, Jan, 1998; McDonald et al., 1999; Sanchez-Ramos et al., 2000; Cuevas et al., 2002; Tohill et al., 2004; Caylan et al., 2006; Lin et al., 2008a, b; Cui et al., 2008; Cho et al., 2008; Cho et al., 2010; Sun et al., 2001a, b; Keilhoff, e Fansa, 2011). Contudo, os autores Myers et al. (1983), McDonald, Zochodne (2003), Zhang et al. (2004), Dezawa et al. (2001), Cuevas et al. (2002, 2004), Chen et al. (2006b), Grosheva et al. (2008a, b) e Mahay et al. (2008), ao injetarem células-tronco mesenquimais indiferenciadas diretamente no sítio de lesão, observaram uma melhora da regeneração neural sugerindo a capacidade destas células em diferenciar-se *in vivo*.

Apesar da falta de clareza sobre sua função fisiológica, a presença da proteína S100 está relacionada à proteção do tecido nervoso, estimulação e indução da regeneração axonal, nutrição e maturação das CS (Huang et al., 1998; Lin et al., 2008b).

As CMEM da medula óssea diferenciam-se principalmente em células da linhagem mesodérmica (Pittenger et al., 1999; Paniushin et al., 2006; Lin et al., 2008a, b; Keilhoff, Fansa, 2011); entretanto, quando devidamente estimuladas e ambientadas, podem diferenciar-se em outras linhagens, como a ectodérmica (Bunge, 1993; Azizi et al., 1998; Woodburg et al., 2000; Sanchez-Ramos et al., 2000; Dezawa et al., 2001; Joshi, Enver, 2002;

Barcelos et al., 2003; Muñoz-Elias et al., 2004; Tohil et al., 2004; Battiston et al., 2005; Paniushin et al., 2006; Chen et al., 2006a, b; Gomillion, Burg, 2006; Meliga et al., 2007; Zhang et al., 2008; Lin et al., 2008a, b; Cho et al., 2010; Sun et al., 2001a, b; Keilhoff, Fansa, 2011).

De acordo com o estudo de Muñoz-Elias et al. (2004), as células-tronco mesenquimais indiferenciadas, após 3 horas expostas ao meio de indução neural (MIN), apresentam alterações morfológicas neuronais típicas, sugerindo que esta diferenciação morfológica ocorre antes e/ou na ausência de divisão celular.

Caddick et al. (2006) e Mahay et al. (2008) demonstraram que as células-tronco diferenciadas *in vitro* apresentam características fenotípicas, bioquímicas e funcionais semelhantes às CS.

Caddick et al. (2006) afirmam que as células-tronco indiferenciadas são negativas para a expressão de p75, GFAP e S100 até a oitava passagem. A partir daí, as células começam a expressar S100 mostrando que pode haver uma diferenciação espontânea.

Gimble et al. (2008) expõem que a diferenciação *in vitro* das células-tronco mesenquimais apresenta diversas limitações como a aplicabilidade *in vivo* da caracterização bioquímica.

Cho et al. (2008) demonstram a capacidade que as células-tronco mesenquimais retiradas do processo mastóideo de humanos têm de diferenciar-se em células com fenótipo de CS.

Segundo Lin et al. (2008a) as células-tronco mesenquimais indiferenciadas, quando devidamente induzidas, espiculam-se mostrando um padrão morfológico neural 3 dias após a indução. Em 6 dias, essas células já mostram um fenótipo bem espiculado e até se comunicam. Caddick et al. (2006) referem-se à ocorrência de alongamento e bipolaridade, na maioria das células, após 14 dias de diferenciação.

Segundo Shi et al. (2009) a expressão de S100 mostra a formação progressiva de mielina pelas CS, as quais revestem os axônios recentemente formados.

Wang et al. (2011), em seu estudo sobre a regeneração do nervo facial de coelhos com células-tronco e artéria autóloga, qualificaram a proteína básica de mielina e compararam entre as células-tronco diferenciadas e indiferenciadas. Após a análise dos resultados, os autores sugerem que as células-tronco diferenciadas, semelhantes às CS, são mais efetivas na mielinização dos axônios regenerados.

3.9 Avaliação funcional objetiva da regeneração neural

Esslen e Fisch, em 1977, descreveram a técnica de eletroneuromiografia (estudo da neurocondução motora) do nervo facial em humanos a qual é considerada até hoje o melhor e mais objetivo método de avaliação de prognóstico em pacientes com PFP aguda (Gantz et al., 1984; Bento, 1988; Salomone et al., 2011).

Medinaceli et al., em 1982, criou o chamado “walking-track analysis”, método amplamente citado na literatura, o qual avalia de uma forma não invasiva a regeneração do nervo ciático de ratos *in vivo*.

Mattox e Felix (1987), pioneiros na realização de exames eletroneurofisiológicos no nervo facial de ratos, criaram um método invasivo, no qual o nervo facial é estimulado em vários locais e seguimentos (tronco, ramo bucal e ramo mandibular) e captado com auxílio de eletrodos subcutâneos nos lábios superior e inferior dos ratos.

De acordo com Liveson e Dong (1992), Nobrega e Manzano (2007) e Salomone et al. (2012) fatores como idade, gênero, temperatura, anatomia, tipo de eletrodo, filtros, intensidade e frequência de estímulos, distância entre os eletrodos, além dos locais de estimulação e de captação, podem interferir nas respostas à eletroestimulação, necessitando, assim, de uma padronização correta do exame para que não haja alterações na avaliação final dos resultados.

Chen et al. (1993), Ferri et al. (1998) e Borin et al. (2006) criaram escalas de observação comportamental da mímica facial e Tomov et al. (2002), Hadlock et al. (2005) e Guntinas-Lichius et al. (2005) avaliaram a movimentação das vibrissas por meio de gravações digitais.

Segundo Robinson e Snyder-Mackler (2002) e Hayashi et al. (2004) O estudo eletroneurofisiológico tem o propósito de determinar e quantificar a função e os distúrbios do sistema nervoso periférico, especificamente dos nervos sensitivos e motores, junção neuromuscular e da unidade motora,

tornando-se parte fundamental dos modelos experimentais que visam à avaliação da regeneração neural.

Segundo Hayashi et al. (2004) os métodos existentes de avaliação funcional por meio da eletroneuromiografia (EMG) em animais derivam de modelos usados em humanos e são aplicados de acordo com o animal e o nervo a ser estudado.

Hayashi et al. (2004) relatam que, para evitar erros na avaliação da amplitude, deve-se usar o chamado estímulo supramáximo (intensidade máxima de estímulo necessária para despolarizar todas as fibras axonais).

Byrne et al. (2005) descreveram um método de avaliação invasivo no qual estimula-se o tronco do nervo facial de ratos, sem a determinação do local, e captam-se, bilateralmente, os PAMCs com auxílio de eletrodos colocados simetricamente no sítio das vibrissas. Os autores utilizam, ainda, corrente de estímulo fixa de 1,5mA.

Shi et al. (2009) avaliaram a regeneração do ramo bucal do nervo facial, estimulando o segmento proximal deste ramo com corrente fixa de 0,5mA e captando a resposta com micro agulhas no seguimento distal, para obter o potencial de ação do nervo (PAN). Nesse estudo os autores não observaram o local exato da estimulação.

Salomone et al. (2012) criaram um modelo de avaliação funcional objetiva da regeneração de nervo facial em ratos Wistar, preciso, não invasivo, fácil, rápido e de alta reprodutibilidade. Os autores descrevem que não houve diferença significativa entre os lados e os valores médios da

amplitude, latência, duração e intensidade de estímulo que foram: $4,63 \pm 1,80$; $1,30 \pm 0,24$; $3,83 \pm 0,60$; e, $2,26 \pm 0,38$ respectivamente.

3.10 Avaliação histológica da regeneração neural

De acordo com os autores Duncan (1934), Fernand e Young (1951), Donovan (1967), Williams e Wendell-Smith (1971), o diâmetro das fibras nervosas oferece uma base conveniente de comparação dentro e entre grupos experimentais.

Segundo Rushton (1952) e Mayhew e Sharma (1984a, b), o diâmetro externo, o qual inclui o axônio e a bainha de mielina, tem sido usado para classificar fibras mielinizadas e correlacioná-las com alterações patológicas, como diminuição do impulso nervoso.

Abercrombie e Johnson (1946) e Gundersen (1977) citam que, para evitar erros de amostragem (efeito de margem) durante o estudo morfométrico de fibras axonais, devem-se excluir as fibras que não tenham o centro dentro do campo.

Donovan (1967), Sharma et al. (1980), Diani et al. (1981) e Zemp et al. (1981) descreveram diferentes métodos de amostra para a contagem de fibras neurais.

Szal e Miller (1975), Spector et al. (1993) e Lewin et al. (1997) consideram o estudo morfométrico do nervo, o qual inclui a medida da

densidade e do diâmetro axonal, assim como a contagem da quantidade total de axônios, um método objetivo de avaliação da regeneração neural.

Para Harrison (1981) a análise das características morfométricas das fibras mielínicas por um sistema computadorizado não só facilita a contagem, mas também fornece resultados confiáveis e precisos.

Mayhew e Sharma (1984a, b), em seus estudos sobre planos de amostragem para estimar o tamanho de fibras nervosas, concluem que os dados obtidos em 6% da área total de um nervo são tão precisos quanto à medida de todas as fibras mielínicas.

De acordo com Windebank et al. (1985), se o diâmetro do axônio regenerado for menor que $0,7\mu\text{m}$, o processo de mielinização não ocorrerá.

Para Miyamoto (1985), o método histológico mais confiável de avaliar a regeneração neural é a medida da densidade da área dos axônios mielinizados.

Ochi et al. (1995) utilizam o tamanho e a quantidade de axônios mielinizados para avaliação quantitativa da regeneração neural e referem que os aumentos do tamanho e da quantidade de axônios não estão necessariamente correlacionados com a melhora funcional.

Segundo Burt (1995), a condução do potencial de ação é mais rápida em fibras mielínicas de maior calibre. A transmissão do estímulo nervoso para o músculo esquelético é realizada por fibras mielínicas de grande diâmetro, que variam de 8 a $16\mu\text{m}$.

Segundo May e Schaitkin (2000), o diâmetro do axônio, a espessura e o comprimento da bainha de mielina são as dimensões mais importantes para a avaliação da recuperação funcional.

Para Vasconcelos e Gay-escoda (2000) a contagem da quantidade total de axônios é a variável mais importante.

A análise qualitativa, apesar de ser um método subjetivo, quando associado ao método quantitativo, auxilia na avaliação da qualidade do tecido regenerado e na precisão dos resultados dos dados quantitativos da regeneração neural em relação ao tempo (Costa 2003).

Costa et al. (2012) descreveram os parâmetros normais da quantidade de axônios, assim como dos diâmetros axonais do ramo mandibular do nervo facial de ratos *Wistar*.

3.11 Células-tronco na regeneração do nervo facial

Mazzini et al. (2004) descreveram o primeiro estudo de regeneração neural com o emprego de células-tronco mesenquimais em humanos. Os autores implantaram células-tronco mesenquimais autólogas na medula espinhal de sete pacientes com esclerose lateral amiotrófica, obtendo resultados positivos: quatro pacientes apresentaram melhora aparente na força da musculatura proximal dos membros inferiores e dois pacientes mostraram um aumento moderado da força desta mesma musculatura.

Yan et al., em 2004, usaram células-tronco neurais em condutas compostas por fásia autóloga para reparar um hiato de 6mm do nervo facial de coelho. Seis semanas depois do procedimento cirúrgico, eles compararam esse grupo com o grupo no qual foi aplicada somente a fásia. Os autores descrevem uma melhora na resposta funcional, com diferença significativa nas latências e no crescimento axonal, além de observar diversas células marcadas com proteína básica de mielina perto da área da lesão.

O único trabalho realizado em humanos sobre a regeneração do nervo facial com a implantação de células-tronco foi descrito por Caylan et al., em 2006. Os autores relatam o caso de uma mulher de 20 anos com paralisia facial traumática iatrogênica após um procedimento de mastoidectomia por otite média crônica. No relato, os autores referem-se a perda de 8-10mm do nervo no segmento mastóideo, o qual foi corrigido com enxerto autólogo (nervo auricular magno) imediatamente após a lesão. Sem melhora clínica e/ou eletroneurofisiológicas (HB VI), após 42 dias da paralisia, a paciente foi submetida a um novo procedimento cirúrgico para a implantação de células-tronco mesenquimais indiferenciadas autólogas, obtendo resultados promissores: em uma semana houve uma melhora de dois graus na escala HB, com variação de HB VI para HB IV, além de uma melhora eletroneurofisiológica, com a presença de potenciais polifásicos. Após cinco meses, os autores descreveram que a paciente evoluiu com melhora para HB III.

Guo e Dong (2006) avaliaram por imunohistoquímica, eletroneuromiografia e histologia (quantitativa) a regeneração do nervo facial de coelhos, 12 semanas após a implantação de células-tronco neurais extraídas de cobaias, e descreveram a diminuição da latência, o aumento da amplitude, o aumento da quantidade e do diâmetro das fibras axonais significativamente maiores no grupo tratado com células-tronco, quando comparados ao grupo tratado apenas com soro fisiológico, concluindo assim que células-tronco neurais de cobaias promovem a regeneração no nervo facial de coelhos. Os autores também demonstram, pela expressão da proteína S100, a diferenciação *in vivo* das células-tronco em células com fenótipo de células de Schwann.

Em 2008b, Grosheva et al. compararam, com e sem estimulação manual das vibrissas, a tubulização do nervo facial de ratos contendo células-tronco mesenquimais da medula óssea. Os autores relatam que nenhum dos grupos conseguiu diminuir a extensão e a ramificação dos axônios colaterais no local da lesão e, conseqüentemente, não obtiveram melhora funcional, concluindo que a tubulização do nervo facial com células-tronco mesenquimais, associada ou não à estimulação manual das vibrissas não beneficiam a regeneração do nervo facial, pois continua o crescimento de braços colaterais e poliinervação.

Zhang et al. (2008) implantaram células-tronco extraídas do córtex cerebral de ratos embebidas em uma solução de ácido hialurônico e/ou colágeno dentro de conduítes de colágeno para avaliar a regeneração do nervo facial seccionado de coelhos. Os autores avaliaram os resultados

eletrofisiológicos e histológicos após 12 semanas, concluindo que essas células-tronco, facilitam a reinervação dos axônios lesados. Além disso, os autores citam que não houve rejeição, mostrando a imunogenicidade baixa deste tipo de célula-tronco.

Guo e Dong (2009) estudaram os efeitos de células-tronco neurais retiradas de cobaias e o fator de crescimento do nervo (NGF) no crescimento do nervo facial de coelhos comparado com o de conduíte de quitosana e autoenxerto. Os resultados foram avaliados por imunohistoquímica, eletroneuromiografia e histologia (quantitativa). Os autores referem-se ao grupo que continha células-tronco neurais como melhores em comparação ao que não as utilizaram; entretanto, não houve diferença significativa quando comparado ao grupo que recebeu o autoenxerto.

Shi et al. (2009) avaliaram a regeneração do nervo facial de ratos após quatro semanas da neurotômese e implantação, em um tubo poliglicólico, de células-tronco neurais super expressando fator neurotrófico derivado da glia. Foram realizadas as avaliações funcionais (eletroneuromiografia) e histológicas (qualitativa e quantitativa), para concluir que a combinação do fator neurotrófico, derivado da glia com transplante de células-tronco neurais, pode melhorar a regeneração no sistema nervoso periférico.

Satar et al. (2009) estudaram a regeneração do ramo bucal de ratos em contato com gel foam embebido de células-tronco mesenquimais

indiferenciadas após a transecção e sutura epineural término-terminal imediata. Os autores avaliaram a regeneração neural pelo estudo histológico qualitativo e relataram que o grupo tratado com as células-tronco obtiveram resultados superiores, com melhora na organização axonal e espessura da mielina. Referem-se também às células-tronco, as quais não induziram a formação de tumores quando em contato com o nervo íntegro (ramo mandibular). Nesse estudo, a caracterização das células-tronco foi realizada por morfologia celular e a viabilidade e persistência das células não foram investigadas.

Cho et al. (2010) estudaram o efeito do plasma rico em plaquetas e de células-tronco mesenquimais humanas neuro-induzidas na regeneração de axotomias do tronco do nervo facial de cobaias. Foi realizada a avaliação funcional (movimentação das vibrissas) e evolução histológica. Os autores relatam que o plasma rico em plaquetas, assim como as células-tronco mesenquimais humanas neuro-induzidas, promove uma melhor regeneração do nervo facial axotomizado quando comparado apenas à sutura término-terminal. Entretanto, o uso das células-tronco não mostrou benefícios em relação à aplicação de plasma rico em plaquetas, mas a combinação do plasma e das células mostrou grande benefício. As células não foram caracterizadas; apenas os fatores neurotróficos foram avaliados por meio do teste Western Blot.

Sun et al. (2001a) investigaram o uso de artéria descelularizada (AD) contendo células-tronco indiferenciadas derivadas do tecido adiposo visceral autólogo indiferenciadas (CTAi) na regeneração do ramo bucal do nervo

facial de ratos. Os autores descrevem uma melhora funcional (avaliada por movimentação das vibrissas) e histológica (análise morfológica) do grupo AD+CTAi, quando comparado ao grupo que só recebeu AD. Entretanto, o grupo que recebeu enxerto autólogo e o grupo que não sofreu intervenção cirúrgica obtiveram uma melhora significativa em relação aos outros grupos (AD+CTAi e AD). Houve um aumento excessivo na quantidade de axônios do grupo que recebeu células-tronco adiposas que não correspondeu a uma melhora funcional. Nesse estudo, os autores identificaram e caracterizaram as células-tronco derivadas do tecido adiposo por morfologia celular.

Sun et al. (2001b), em outro estudo, investigaram o uso de artéria descelularizada (AD) contendo células-tronco derivadas do tecido adiposo visceral autólogo indiferenciadas (CTAi), transdiferenciadas (CTAt), células de Schwann autólogas (CSa) e auto-enxerto (AE) na regeneração do ramo bucal do nervo facial de ratos. Os autores descrevem uma melhora funcional (avaliada pela movimentação das vibrissas e pelo estudo de condução motora) e uma melhora histológica (morfologia axonal, densidade e diâmetro das fibras mielinizadas) de todos os grupos em relação ao grupo AD. Em relação aos resultados funcionais, os autores relatam que não houve diferença significativa no tempo de retorno da movimentação das vibrissas, até a segunda semana, entre os grupos CTAi, CTAt, SCa e AE e nem no valor da latência dos potenciais de ação motora. O pico de amplitude foi significativamente maior no grupo AE seguido pelos grupos CSa, CTAt e CTAi. A densidade de fibras mielinizadas foi maior no grupo CTAt em relação a todos os outros, e o diâmetro das fibras mielinizadas dos grupos

CTAt, CSa e AE foram significativamente maiores que CTAi. Os autores ainda ressaltam, que, apesar da quantidade de fibras mielinizadas do grupo CTAi ser excessivamente maior que os outros grupos que utilizaram células-tronco, não foi maior que o grupo AE.

Wang et al. (2011) implantaram células-tronco indiferenciadas e diferenciadas, que expressam o fenótipo de células de Schwann dentro de conduites formados por veia autóloga, para avaliar a regeneração do ramo bucal do nervo facial de coelhos após 4, 8 e 16 semanas. A regeneração e mielinização dos axônios neoformados foram analisadas por imunohistoquímica, morfometria e teste funcional (eletro-neuromiografia e movimentação das vibrissas). Os resultados obtidos pelos autores sugerem que as células transdiferenciadas em CS implantadas, associadas ao condúite de veia autóloga, estimulam a regeneração do nervo seccionado e promovem uma melhor mielinização do axônio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo experimental foi realizado em concordância com o Manual NRC sobre cuidados de animais de laboratório (*National Research Council*, 2003), após aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob o número de protocolo 0291/07 (Apêndice 1).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM 32) da FMUSP e no Laboratório de Genômica Funcional do Instituto de Biociências (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva) da Universidade de São Paulo com o apoio do Instituto de Ciências Biomédicas da FMUSP e da Rede PREMium de Equipamentos Multiusuários do Complexo do Hospital das Clínicas (HC).

Este projeto foi financiado por verba de auxílio à pesquisa da Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP), processo nº 2008/00458-9, sob responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Seleção de animais

Neste estudo experimental foram utilizados 50 ratos *Wistar*

(*Rattus norvegicus*) saudáveis, machos, adultos (idade entre 8 e 10 semanas), com massa corporal entre 250 e 350 gramas, adquiridos e mantidos no Centro de Bioterismo da FMUSP.

Os animais ficaram alojados em gaiolas contendo no máximo três indivíduos, em condições apropriadas de temperatura (24⁰C) e umidade do ar (60-70%), com ciclo claro-escuro de 12h e recebendo água à vontade. A ração específica para a espécie era oferecida uma vez ao dia, após a limpeza das gaiolas.

Foram excluídos os animais que apresentavam variações anatômicas do nervo facial, visíveis por transparência após tricotomia, que pudessem interferir nos resultados como ramos do nervo mandibular para a musculatura do lábio superior, ramos do nervo bucal para a musculatura do lábio inferior e/ou interligações desses dois ramos. Excluíram-se também os animais que apresentavam sinais de infecção e/ou malformações congênitas.

Dos 50 ratos mencionados, dois foram utilizados para o protocolo de obtenção e diferenciação das CMEMi.

4.1.2 Vetor lentiviral

Utilizou-se o vetor lentiviral LV-lac, adquirido da Addgene[®] (Cambridge, MA, EUA) pelo qual se expressa a β -galactosidase sob controle do promotor do citomegalovírus, um promotor forte e constitutivo.

4.1.3 Anticorpos

Os anticorpos usados foram: o monoclonal, gerado em camundongo anti- β -galactosidase de bactéria (clone Gal-40, Sigma[®], St Louis, EUA); e, os policlonais gerados em coelho anti-S100, anti-p75 (CD271, Abcam[®], Cambridge, MA, EUA) e anti-Oct-6 (Cell Signaling Technology[®], Danvers, MA, EUA). Os anticorpos para detecção de moléculas de superfície celular de células hematopoéticas, CD45 e CD34, (Pittenger et al., 1999; Dominici et al., 2006) foram, respectivamente, o anticorpo monoclonal anti-CD45 gerado em camundongo (clone A20, Abcam[®], Cambridge, MA, EUA) e o anticorpo policlonal anti-CD34 gerado em coelho (Abcam[®], Cambridge, MA, EUA). Conjugou-se os anticorpos secundários gerados em burro anti-IgG de coelho e os gerados em cabra anti-IgG de camundongo, aos Alexa 488 e Alexa 586 (Life Technologies[®], Grand Island, NY, EUA) respectivamente.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção das células multipotentes do estroma mesenquimal da medula óssea

Após o sacrifício dos animais por saturação de gás carbônico, removeu-se a medula óssea do fêmur e tíbia de dois ratos com a injeção de 10mL de meio de cultura alfa-MEM[®] (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA) no canal ósseo, para promover a suspensão das células e seu cultivo imediato, sem dissociação, em meio de cultura composto por alfa-MEM, suplementado

com soro fetal bovino (FBS), penicilina, gentamicina, estreptomicina 1X e glutamina a 4mM (Life Technologies[®], Carlsbad, CA, EUA). A incubação foi feita em estufa a 37⁰C e CO₂ a 5%. Após 24 horas e em sequencia a cada 72h, as culturas eram lavadas com solução tampão fosfato-salina e o meio era trocado. Completados 10 dias de cultura e atingida a confluência de 80-90%, as células foram tratadas com TrypLE Express[®] (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA), protease serina semelhante a tripsina, por cerca de 10 minutos, com o objetivo de soltá-las do substrato plástico. A solução com células foi centrifugada a 8000xg por 5 minutos em temperatura de 4⁰C, e as células ressuspensas em meio completo, distribuídas em cinco tubos (repique 1:5, passagem 1), congeladas no mesmo meio acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% em ambiente a -20⁰C, por 24 horas, e depois transferidas para ambiente a -80⁰C por 72 horas e então em N₂ líquido (Dezawa et al. 2001).

4.2.2 Transdução viral

A transdução viral foi realizada no Setor de Vetores Virais do Instituto do Coração (INCor-USP) em colaboração com o Dr. Bryan Strauss.

Para a produção viral, células HEK-293T (linhagem imortalizada humana, derivada de células renais embrionárias) foram plaqueadas e transfectadas com fosfato de cálcio, o plasmídio do vetor lentiviral e vetores de empacotamento psPAX2 e pCMV-VSVg (Addgene[®], Cambridge, MA, EUA).

A cultura foi lavada e tratada com TrypLE Express[®], por cerca de 10 minutos. Foram adicionados 5mL de meio de manutenção e as células centrifugadas a 100xg, por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a ressuspensão do precipitado celular, estimou-se o número de células em câmara de Neubauer. Depois da recentrifugação, essas células foram ressuspensas em 2mL de meio de manutenção e semeadas nos grupos seguintes: (i) Controle não-transduzido, com 1×10^5 células diluídas em 2mL de meio de manutenção em placa de Petri com 35mm de diâmetro; (ii) Controle transduzido, com 1×10^5 células adicionadas a 10 μ L de vírus-*lacZ* e 0,5 μ L de polibreno, mantidas em microtubo a 37⁰C por 2 horas e depois diluídas em 2mL de meio de manutenção em placa de Petri com 35mm de diâmetro; (iii) Células transduzidas para expansão, em cinco tubos, com 1×10^5 células cada, 10 μ L de vírus-*lacZ* e 0,5 μ L de polibreno, mantidas em microtubo a 37⁰C por 2 horas e depois diluídas em 2mL de meio de manutenção em seis poços de placa; (iv) Células não-transduzidas para ensaios de imunofluorescência indireta, em três tubos, contendo 1×10^5 células diluídas em 2mL de meio de manutenção, em três poços de placa com seis poços. Em cada um dos três poços foram colocadas quatro lamínulas.

Transduziu-se 1×10^5 células CMEMi da terceira passagem, de acordo com os grupos definidos acima, em suspensão com o LV-*lacZ* a uma concentração MOI (do inglês, *multiplicity of infection*) de 1,9 e polibreno a 4 μ g/mL em 500 μ L de meio de cultura. Após 2 horas, semeou-se a suspensão em placas de 35mm com 2mL de meio de cultura (procedimento

reproduzido em várias placas). Após 48 horas, fixou-se as células dos controles em paraformaldeído a 2%, glutaraldeído a 0,2% com tampão fosfato de sódio a 100mM (pH 7,3) por 5 minutos a 4^oC e coradas com MgCl₂ a 1,2mM, K₃Fe(CN)₆ a 3mM, K₄Fe(CN)₆ a 3mM e X-gal a 1mg/mL em tampão fosfato de sódio a 100mM (pH 7,3) por 16 horas a 37^oC, para revelar a atividade da enzima β-galactosidase, codificada pelo gene repórter *lacZ*.

Confirmou-se a transdução das CMEMi por ensaio colorimétrico e imunofluorescência direta do gene repórter *lacZ*. Após a transdução, essas células, então denominadas CMEMi/*lacZ*⁺ foram crio-preservadas.

As CMEMi/*lacZ*⁺ submetidas ao protocolo de diferenciação, e denominadas CMEMd/*lacZ*⁺ foram caracterizadas por ensaio de imunofluorescência para marcação dupla com anticorpo que identifica a expressão do gene repórter (anti-β-galactosidase) e outro para marcação de CS.

Minutos antes de cada procedimento cirúrgico, as células CMEMi/*lacZ*⁺ e CMEMd/*lacZ*⁺ foram expandidas, coletadas em TrypLE Express[®], ressuspensas em Matrigel[®] (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) a 1-2x10⁷ células/mL e mantidas em gelo comum até o momento exato da implantação no animal.

4.2.3 Diferenciação celular

Realizou-se a diferenciação das CMEMi/*lacZ*⁺ em células semelhantes a células de Schwann conforme protocolo descrito por Azizi et al. (1998) e Dezawa et al. (2001), com pequenas modificações. Cultivou-se as

CMEMi/*acZ*⁺ de terceira passagem em meio completo por 10 dias, com a troca do meio de cultura a cada 48 horas. No décimo dia, substituiu-se o meio de cultura pelo “meio A” composto por: meio alfa-MEM com β-mercaptoetanol (Sigma[®], St Louis, MO, EUA) para 1mM, piruvato de sódio para 1mM, glutamina e antibióticos. Após 24 horas, trocou-se o “meio A” pelo “meio B”, composto por: alfa-MEM, suplementado com antibióticos, glutamina, FBS a 10%, ácido all-trans retinóico (Sigma[®], St Louis, MO, EUA) para 350ng/mL. Após 72 h, substituiu-se o “meio B” pelo “meio C”, cuja composição era: alfa-MEM, FBS a 10%, forskolina (Sigma[®], St Louis, MO, EUA) a 5μM, bFGF (bFGF, Peptotech[®], Rocky Hill, NJ, EUA) para 10ng/mL, fator de crescimento derivado de plaquetas AA (PDGF-AA, Peptotech[®], Rocky Hill, NJ, EUA) para 5ng/mL e heregulina B1 (fator de crescimento epidérmico, Peptotech[®], Rocky Hill, NJ, EUA) para 200ng/mL e mantido por 7 dias com a troca do meio a cada 48h. Uma vez concluído o protocolo, as células foram: (a) fixadas e submetidas ao ensaio colorimétrico como descrito; (b) fixadas e submetidas à imunofluorescência indireta como detalhado a seguir; ou, (c) ressuspensas nas mesmas condições que as CMEMi, como descrito acima, para serem usadas no procedimento cirúrgico.

4.2.4 Imunofenotipagem das células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas e diferenciadas

As células CMEMi/*acZ*⁺ (da terceira passagem) e as CMEMd/*acZ*⁺ foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato-salina, por 30 minutos, lavadas no mesmo tampão e submetidas à imunofluorescência

indireta, a temperatura ambiente. Essas células foram permeabilizadas em detergente triton-X-100 a 0,3%, por 20 minutos, incubadas em glicina a 0,1M, por 20 minutos, bloqueadas em albumina sérica bovina (ASB, Peptotech[®], Rocky Hill, NJ, EUA) a 5% por 1 hora, e então incubadas em câmara úmida, por 16 horas, em solução do anticorpo primário diluído em ASB a 0,5% em tampão fosfato-salina. Os anticorpos utilizados foram os já descritos: o anti-S100 (diluído 50 vezes), o anti-p75^{NTR} (diluído 50 vezes) e o anti-Oct6 (diluído 50 vezes), todos com a finalidade de identificar células da linhagem de Schwann; e, o anti- β -galactosidase (diluído 100 vezes) visando a identificação da expressão do gene repórter. Os cortes foram lavados três vezes por 10 minutos em tampão fosfato-salina e incubados por 180 minutos com anticorpo secundário conjugado a fluorocromo: Alexa 488 (anticorpo gerado em burro anti-IgG de coelho, diluído 400 vezes) e Alexa 586 (anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo, diluído 400 vezes). Os cortes foram lavados três vezes por 5 minutos cada em tampão fosfato-salina. Para o controle negativo as células foram incubadas somente com os anticorpos secundários. Montou-se as lamínulas em uma lâmina de vidro com 10 μ l de meio de montagem para fluorescência (Vectashield[®], Vector Laboratories Inc[®], Burlingame, EUA). A coloração foi observada ao microscópio confocal (LSM410[®], Zeiss[®], Alemanha), na qual foram obtidas seções z com as imagens agrupadas em uma só.

4.2.5 Grupos de estudo

Dividiu-se a amostra de 48 ratos *Wistar* aleatoriamente em quatro grupos com 12 animais cada, denominados de acordo com o procedimento cirúrgico realizado, a saber:

Grupo A, tubo de silicone vazio: indivíduos submetidos à neurotome, alinhamento dos segmentos proximais e distais com a permanência de um hiato de 3mm entre os mesmos, seguido por interposição de um condúite de silicone vazio.

Grupo B, tubo de silicone preenchido com gel acelular de lâmina basal purificada (GALBP) (Matrigel® , BD Biosciences®, MA, EUA): indivíduos submetidos à neurotome, alinhamento dos segmentos proximais e distais com a permanência de um hiato de 3mm entre os mesmos, seguido por interposição de um condúite de silicone preenchido com GALBP.

Grupo C, tubo de silicone preenchido com GALBP + CMEMi/lacZ+: indivíduos submetidos à neurotome, alinhamento dos segmentos proximais e distais com a permanencia de um hiato de 3mm entre os mesmos, seguido por interposição de um condúite de silicone preenchido com GALBP + CMEMi/lacZ+.

Grupo D, tubo de silicone preenchido com GALBP + CMEMd/lacZ+: indivíduos submetidos à neurotome, alinhamento dos segmentos proximais e distais com a permanencia de um hiato de 3 mm entre os mesmos, seguido por interposição de um condúite de silicone preenchido com GALBP + CMEMd/lacZ+.

4.2.6 Protocolo anestésico e preparação dos animais

Para a identificação individual, cada animal recebeu uma marca amarela realizada com ácido pícrico em uma determinada região anatômica.

Antes de cada procedimento, anestesiaram-se os animais intraperitonealmente no quadrante abdominal inferior direito com hidrato de cloral a 10% (400mg/kg), permitindo assim níveis anestésicos satisfatórios por um período de 30 a 60 minutos, sem depressão respiratória e/ou interferência nas respostas eletroneurofisiológicas. Quando necessárias, doses complementares de hidrato de cloral a 10% (100mg/kg) eram administradas da mesma forma.

No pré-operatório todos os animais receberam antibioticoterapia profilática com penicilina cristalina (50.000U/kg) intramuscular (dose única).

Realizou-se a tricotomia da metade inferior das faces de cada animal, com lâminas de bisturi nº 23, individuais e descartáveis, após anestesia e antes da avaliação funcional.

4.2.7 Protocolo cirúrgico

Uma vez anestesiados, identificados, tricotomizados e medicados de acordo com o descrito, os animais eram posicionados em decúbito lateral direito e submetidos à antissepsia. Realizaram-se os procedimentos cirúrgicos em ambiente e com materiais estéreis, de acordo com as normas de assepsia cirúrgica.

4.2.7.1 Protocolo cirúrgico do grupo A

Para cada animal os tempos cirúrgicos foram efetuados, na sequência seguinte:

a) Incisão horizontal reta na derme da região de transição entre o terço médio e o terço inferior da face, do lado direito, com extensão de aproximadamente 30mm;

b) Hemostasia com gaze estéril e soro fisiológico (NaCl a 0,9%);

c) Dissecção por planos com exposição dos ramos mandibular e bucal do nervo facial direito e glândula parótida;

d) Colocação do afastador de pálpebras com visualização através do microscópio óptico (Carl Zeiss Surgical GmbH®, Oberkochen, Germany) (lente de 250mm, aumento de 16x) dos ramos mandibular e bucal do nervo facial direito;

e) Dissecção dos ramos mandibular e bucal do nervo facial até a glândula parótida direita com individualização dos mesmos;

f) Incisões transversais nas regiões proximal e distal do ramo bucal do nervo facial direito com exérese e descarte de no mínimo 20mm deste ramo prosseguido pelo reparo com fio mononylon 4-0 do segmento proximal residual;

g) Incisões transversais nas regiões proximal e distal do ramo mandibular do nervo facial direito com exérese e descarte de 3mm deste

ramo, após medição com compasso de Castroviejo curvo (abertura máxima de 100mm);

h) Colocação de um tubo de silicone com 7mm de comprimento, 1,47mm de diâmetro interno, 1,96mm de diâmetro externo e 0,48mm de espessura (American Scientific Products®, McGraw Park, IL, EUA) na região do segmento proximal do ramo mandibular do nervo facial direito (Figura 1);

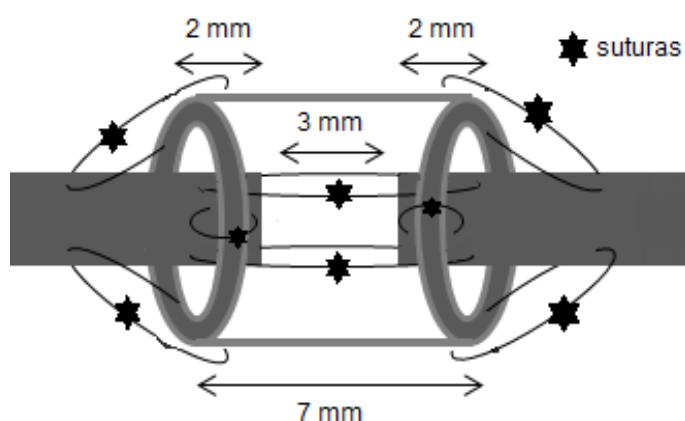


Figura 1 - Modelo esquemático do condúite de silicone utilizados nos procedimentos cirúrgicos. As setas (\leftrightarrow) sinalizam as distâncias e as estrelas (*) as suturas.

i) Aproximação e alinhamento dos segmentos proximal e distal do nervo mandibular seccionado por dois pontos de sutura simples, realizados com fio monofilamentar não absorvível 10-0 (Ethilon W2850®, Johnson & Johnson Medical®, EUA) e fixação em tecido conjuntivo paraneural, conservando um espaço entre os segmentos de 3mm;

j) Reposicionamento do tubo de silicone vazio sobre a região do espaço deixado entre os segmentos, fixando-o com três pontos de sutura em “U” em cada região dos segmentos (proximal e distal). A sutura foi realizada

com fio monofilamentar não absorvível 10-0 (Ethilon W2850[®], Johnson & Johnson Medical[®], EUA) transpondo o tubo de silicone e o tecido conjuntivo paraneural;

l) Obliteração das extremidades do tubo de silicone com adesivo tecidual fibrinolítico;

m) Fechamento da incisão cirúrgica por planos, com fio catagute 5-0 (subcutâneo) e mononylon 4-0 (pele).

4.2.7.2 Protocolo cirúrgico do grupo B

Neste grupo foram realizados os mesmos tempos cirúrgicos do grupo A, acrescentando entre os itens j e l, o item:

k.1) Preenchimento do tubo de silicone vazio, com capacidade total de cerca de $10,18\text{mm}^3$ (0,01mL) com GALBP.

4.2.7.3 Protocolo cirúrgico do grupo C

Neste grupo foram realizados os mesmos tempos cirúrgicos do grupo A, acrescentando entre os itens j e l, o item:

k.2) Preenchimento do tubo de silicone vazio, com capacidade total de cerca de $10,18\text{mm}^3$ (0,01mL) com GALBP contendo CMEMi/acZ+ em uma concentração de 10^5 células/mL.

4.2.7.4 Protocolo cirúrgico do grupo D

Neste grupo foram realizados os mesmos tempos cirúrgicos do grupo A acrescentando entre os itens j e L, o item:

k.3) Preenchimento do tubo de silicone vazio, com capacidade total de cerca de $10,18\text{mm}^3$ (0,01mL) com GALBP contendo CMEMd/lacZ+ em uma concentração de 10^5 células/mL.

4.2.8 Sacrifício dos animais

Seis semanas após o procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados com a administração intracardíaca de KCl a 19,1%, após terem sido submetidos, sequencialmente, à anestesia (protocolo 4.2.6), avaliação funcional objetiva (protocolo 4.2.9) e retirada do nervo operado (protocolo 4.2.10).

4.2.9 Protocolo da avaliação funcional objetiva

Todos os animais foram submetidos à eletroneuromiografia (teste de neurocondução motora) do ramo mandibular do nervo facial para a obtenção do potencial de ação muscular composto (PAMC) e posterior análise dos valores da amplitude, latência e duração em três momentos: pré-operatório imediato, terceira e sexta semanas de pós-operatório.

Antes da realização destes exames os animais eram anestesiados, identificados e tricotomizados de acordo com o protocolo 4.2.6.

4.2.9.1 Técnica para obtenção dos PAMCs

A técnica utilizada para a obtenção dos PAMCs, descrita por Salomone et al., em 2012, consiste na utilização de um eletromiógrafo portátil Neurosoft[®] (Ivanovo, Rússia), modelo Neuro-MEP-Micro[®] (Neurosoft[®]; Ivanovo, Russia), conectado a um computador portátil HP (HP[®], Hewlett-Packard[®], Palo Alto, CA, EUA) Modelo Pavilion dv5[®] por uma entrada Universal Serial Bus (USB) dispensando, assim, o uso de fonte externa de energia.

A configuração do eletromiógrafo (filtro passa alta 10Hz; filtro passa baixa 10kHz; filtro *notch* desligado; margem de entrada do sinal de 60mV; taxa de amostragem de 10kHz), a visualização e a análise dos PAMCs foram realizados com o software Neuro-MEP. NET[®] versão 2.4.23.0[®] (Neurosoft[®]; Ivanovo, Russia).

Para a captação foram utilizados dois eletrodos de agulha subdérmica, sem revestimento de *teflon*, medindo 12mm de comprimento e 0,35mm de diâmetro, da marca Spes Medica[®] (Spes Medica Srl[®], Battipaglia, Itália) dispostos em paralelo a uma distância fixa de 5mm entre si. Estes eletrodos receberam um revestimento isolante de 9mm de extensão, permanecendo os 3mm distais sem revestimento. A parte distal do eletrodo não revestida foi inserida totalmente no músculo do lábio inferior do rato, a uma distância de 2mm da comissura labial e do lábio inferior, no sentido longitudinal, paralelo às suas fibras, e ipsilateral ao lado estimulado,

com o polo de captação voltado proximalmente e o pólo de referência voltado distalmente em relação ao estimulador.

A varredura utilizada foi de 1,0ms/divisão, com uma janela total de 10ms e ganho de 2,5mV/divisão.

A estimulação elétrica foi realizada por meio de um eletrodo igual ao descrito acima, porém posicionado sobre a pele, em cima do ramo mandibular do nervo facial, após a identificação deste por transparência, a uma distância de 20mm do eletrodo de captação e com o anodo (+) posicionado proximalmente e o catodo (-) distalmente em relação à captação. Cada estímulo elétrico utilizado foi único, sem promediação, com duração de 0,2ms e intensidade inicial de 0,1mA. A intensidade de estímulo era aumentada em 0,1mA gradativamente até alcançar a intensidade supramáxima em cada lado do animal. Para a aquisição dos PAMCs nas terceiras e sextas semanas do pós-operatório, utilizou-se o mesmo valor do estímulo supramáximo de cada animal obtido no pré-operatório.

Como fio neutro (terra) foi utilizado um eletrodo monopolar da mesma marca e revestido de forma semelhante aos eletrodos descritos anteriormente, porém posicionado no ponto médio entre a estimulação e a captação. Caso a impedância ultrapassasse 5 Ω , os eletrodos eram recolocados e/ou substituídos (Figura 2).

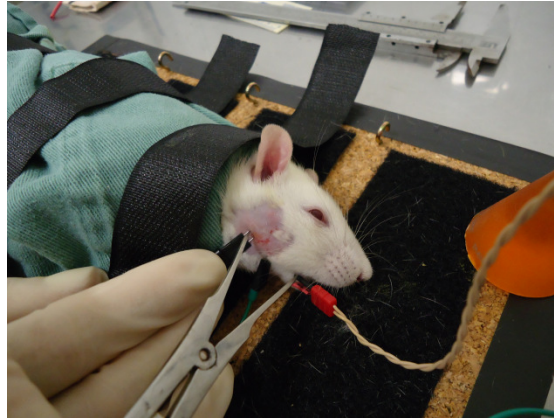


Figura 2 - Exame da avaliação funcional objetiva (teste de neurocondução motora)

4.2.9.2 Análise da amplitude

Convencionou-se mensurar da amplitude de pico-a-pico e em unidades 'mV'.

4.2.9.3 Análise da latência

A latência, distância entre o ponto de estímulo e o início do PAMC, foi medida em unidades de 'ms'.

4.2.9.4 Análise da duração

A duração, distância do início ao final do PAMC, foi medida em unidades de 'ms'.

4.2.10 Protocolo de avaliação histológica

4.2.10.1 Retirada do nervo facial

Retirou-se o nervo facial com o animal, ainda vivo, mas anestesiado

(protocolo 4.2.6), após a identificação, individualização e remoção do tubo de silicone do ramo mandibular do nervo facial operado.

Para a realização deste procedimento, seccionou-se transversalmente o nervo em suas extremidades (proximal e distal) com uma lâmina de barbear individual, removendo-o para uma superfície metálica lisa, previamente esterilizada com álcool a 70%. Após a retirada dos nervos, os animais foram sacrificados de acordo com o protocolo 4.2.8.

4.2.10.2 Tratamento do nervo retirado

Sob visualização em microscópio óptico (Carl Zeiss Surgical GmbH[®], Zeiss[®], Oberkochen, Germany) (lente de 250mm e aumento 16x) da região de regeneração neural (região a qual estava inserida dentro do tubo de silicone), seccionou-se transversalmente a peça, dividindo-a em dois segmentos: proximal (P) e distal (D). Esses segmentos foram novamente seccionado transversalmente, subdividindo em P1, P2, D1 e D2. Os segmentos proximal (P1) e o distal (D1) foram identificados, biselados em suas extremidades (P1- proximal; D1- distal) e condicionados em recipientes estéreis individuais contendo glutaraldeído 2% e paraformaldeído a 1% tamponado com fosfato de sódio 0,1M (pH = 7,3). Os seguimentos P2 e D2 também foram identificados, biselados em suas extremidades e condicionados em recipientes estéreis individuais contendo paraformaldeído 4% tamponado em fosfato-salino (pH=7,2) para posterior estudo imunocitoquímico.

Após a fixação dos seguimentos P1 e D1 com tetróxido de ósmio a

2% tamponado com cacodilato de sódio 0,1M (pH = 7,4), realizou-se a desidratação em banhos de imersão gradativos em concentrações crescentes de etanol (70% por 30min; 90% por 30min; e 100% por 20min por duas vezes), infiltração com óxido de propileno em concentrações de 1:3, 1:2 e 1:1 por 60 minutos cada, impregnação com resina pura por 5 horas em vácuo e a inclusão dos seguimentos com resina Epóxi[®] até sua polimerização em estufa a 60⁰C por 72 horas. Finalizadas estas etapas, realizaram-se cortes transversais de 1µm de espessura com micrótomo 820-II[®] (Reichert-Jung[®], Austria) e posterior coloração com azul de toluidina a 1%.

Os segmentos P2 e D2 de cada animal, depois de fixados em paraformaldeído a 4% e tampão fosfato-salina (pH=7,2) por 24 horas, foram emblocados em parafina e preparados para microscopia com cortes em lâminas de 8µm realizados com micrótomo 820-II[®] (Reichert-Jung[®], Austria). Após remoção da parafina foram imersos em xilol a 65⁰C, por 5 minutos, o tecido foi rehidratado em banhos de etanol com concentrações decrescentes, por 15 minutos cada (dois banhos a 100%, um banho a 95%, um banho a 70%) e o processo foi bloqueado para diminuir a autofluorescência, em três banhos de 10 minutos cada, em peróxido de hidrogênio a 3%. Uma vez transferidas para a solução tampão fosfato-salina (pH=7,2), as lâminas foram processadas para o estudo por imunofluorescência indireta com os marcadores S100 (identificação das células de Schwann) e β-galactosidase (detecção das células transplantadas) seguindo os mesmos protocolos descritos no item 4.2.4.

4.2.10.3 Estudo histopatológico

Sob visualização em microscópio óptico (Nikon® modelo Eclipse E 600®) as lâminas dos segmentos P1 e D1 foram fotografadas com máquina fotográfica Nikon® (modelo Coolpix E 955®) com aumentos de 50x (1 campo - nervo inteiro) e 400x (3 campos de 3.000µm² totalizando uma área de 9.000µm²). Posteriormente as imagens foram transportadas para o computador portátil (Hewlett-Packard® Modelo Pavilion dv5®) e analisadas por meio do software SigmaScan Pro 5.0® (SPSS Science®, Chicago, USA).

Antes das sessões fotográficas sob maior aumento (400x), o microscópio foi colimado e calibrado com uma lâmina-escala específica para que cada campo de 400x representasse exatamente uma área de 3.000µm².

No momento da cirurgia inicial, nove fragmentos normais de 3mm, retirados para a formação do hiato entre os segmentos proximais e distais do nervo facial do grupo A e dos 3 primeiros animais do grupo B, foram divididos em dois segmentos: proximal (P') e distal (D'), e tratados de acordo com o protocolo 4.2.10.2 além de fotografados como descrito anteriormente. As extremidades proximais do segmento P' e as distais do segmento D' foram usadas para a formação de um novo grupo histológico, o grupo N (nervo normal).

Todas as fotos foram digitalizadas e analisadas aleatoriamente por dois examinadores diferentes, cegos, e os resultados utilizados nos testes estatísticos foram compostos pela média obtida por esses dois examinadores.

As imagens da imunofluorescência indireta dos segmentos P2 e D2 foram obtidas com auxílio do microscópio confocal (LSM510[®], Zeiss[®], Germany) da rede PREMiUM de Equipamentos Multiusuários do Complexo do Hospital das Clínicas, após subtração do sinal de fundo do controle negativo, omitindo, assim, o anticorpo primário.

4.2.10.3.1 Análise histológica qualitativa

Com as imagens fotografadas em aumento de 50x, realizou-se um estudo descritivo dos dados qualitativos dos segmentos P1, P', D1 e D' nos quais foram observados os parâmetros seguintes:

- a) Presença, ou não, de fascículos bem definidos;
- b) Quantidade de fascículos;
- c) Arranjo axonal (morfometria e distribuição dos axônios mielinizados);
- d) Neoangiogenese.

4.2.10.3.2 Análise quantitativa

A análise quantitativa foi realizada com as três imagens fotografadas sob aumento de 400x dos segmentos P1, P', D1 e D' de cada nervo, e se avaliou:

- a) A quantidade total de axônios mielinizados em uma área parcial do nervo ($9.000\mu\text{m}^2$);

b) Densidade parcial da quantidade de axônios mielinizados [quantidade parcial de axônios mielinizados / área parcial ($9.000\mu\text{m}^2$)];

c) Maturação da mielina por meio da medida do menor valor do diâmetro externo (incluindo a bainha de mielina) contido em uma área de $9.000\mu\text{m}^2$.

Foram excluídas as fibras que não apresentavam seu centro dentro do campo.

4.2.11 Análise estatística

O cálculo da amostra foi baseado em estudos anteriores, semelhantes, e respeitaram-se as questões éticas relacionadas ao uso de animais em estudos experimentais (Brasil. Lei nº 9.605 de 12 de fevereiro de 1998; Lwanga, Lemeshow, 1991). Esses estudos foram realizados com os mesmos animais (ratos Wistar), com emprego de materiais e técnicas semelhantes, porém avaliando diferentes parâmetros de outros nervos (Dezawa et al., 2001; Zhang et al., 2004; Lopes et al., 2006; Shimizu et al., 2007; Cui et al., 2008; Lin et al., 2008b).

Os resultados dos valores das variáveis ordinais (quantitativas) da avaliação funcional (amplitude, latência, duração e intensidade de estímulo) e da avaliação histológica (quantidade total, densidade e diâmetro axonal em uma área parcial de $9.000\mu\text{m}^2$) foram comparados utilizando o software *Statistical Package for Social Sciences*[®] (SPSS, SPSS Inc.[®], Chicago, IL,

EUA), em sua versão 19.0[®], por: testes *Kolmogorov-Smírnov* para a análise de normalidade; testes de *Kruskal-Wallis* e *Friedman* para a verificação de possíveis diferenças entre os grupos/períodos quando comparados concomitantemente ($p < 0,05$); e os testes de *Mann-Whitney* e *Postos Sinalizados de Wilcoxon* ajustados pela *Correção de Bonferroni* ($p = 0,005116$ e $p = 0,008512$ respectivamente) para a identificação de quais os momentos e quais os grupos que apresentaram diferenças entre si quando comparados dois-a-dois.

5 RESULTADOS

Dos 12 animais selecionados para cada grupo, dois do grupo A foram descartados, o primeiro por causa de anomalia anatômica congênita (malformação crânio-maxilo-facial com exoftalmia unilateral) e o segundo por malformação do ramo mandibular do nervo facial direito visível por transparência (comunicação anômala do ramo mandibular com o bucal). No grupo C um animal foi descartado por apresentar-se abaixo da massa corporal estipulada.

Os valores das massas iniciais e finais para cada animal assim como suas variações e médias (por grupo) estão descritas na Tabela A (Anexo A).

A incidência de morte nos grupos A e B foi de 8,3% (um animal), nos 2º e 3º dias de pós-operatório respectivamente, por ruptura da ferida cirúrgica e automutilação. No grupo C a incidência foi de 16,6% (dois animais) por complicações anestésicas durante os preparativos para o procedimento de avaliação funcional da 3ª semana. No grupo D, a incidência de morte foi de 16,6% (dois animais), um animal no pré-operatório e um animal na avaliação realizada na 6ª semana, também por complicações anestésicas. Estas incidências estão expostas na Tabela B (Anexo A). Em nenhum grupo houve sinal de infecção pós-operatória e/ou presença de úlceras neuro-distróficas.

5.1 Cultura e caracterização das células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas

As CMEM extraídas da medula óssea de fêmures e tíbias de dois ratos *Wistar* adultos foram cultivadas e separadas das células hematopoiéticas por troca do meio de cultivo nas primeiras horas bem como por suas passagens.

À luz de transmissão ou contraste de fase, as CMEMi mostraram-se grandes, com processos celulares tendendo a ser paralelos, estendendo-se em um sentido longitudinal (Figura 3A). As CMEMi dos dois cultivos primários realizados toleraram muito bem as passagens celulares e seu congelamento até por volta do quarto repique. Após a quinta passagem, elas mantiveram-se viáveis, embora aparentemente com um ritmo proliferativo mais baixo.

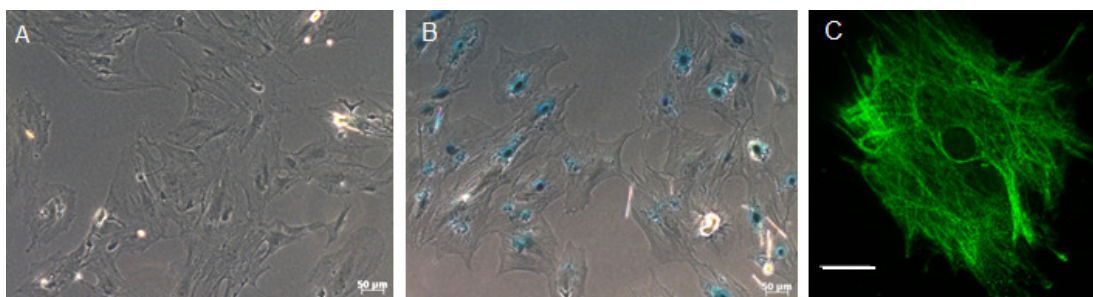


Figura 3 - (A) Células CMEMi ; (B) CMEMi/*lacZ*⁺ fixadas e tratadas em condições oxidativas, em presença do substrato X-Gal da enzima β -galactosidase, produzida pelo gene-reporter *lacZ*; (C) CMEMi/*lacZ*⁺ submetidas à imunofluorescência indireta com anticorpo anti- β -galactosidase. A expressão do gene repórter e a atividade da enzima produzida, β -galactosidase, são detectadas pela coloração azul (B) indicando a reação positiva pela digestão do substrato X-gal pela β -galactosidase, ao contrário do controle negativo (A) de CMEMi não transduzida com o vetor lentiviral que carrega o gene repórter. O ensaio de imunofluorescência com o anticorpo anti- β -galactosidase define somente que houve expressão do gene repórter naquela célula (C). Barras de escala: 50 μ m.

As células aderentes ao substrato plástico mostraram-se negativas à imunomarcação com anticorpos CD34 e CD45, bem como para os marcadores Oct-6, o receptor de neurotrofinas p75^{NTR} (CD27), S100 e GFAP (dados não mostrados), confirmando tratar-se de CMEMi.

5.2 Transdução

No ensaio colorimétrico, observou-se a cor azul na maioria das células CMEMi testadas (Fig. 3B), ao contrário do controle negativo, em que não houve modificação de cor (Figura 3A). A imunofluorescência indireta das CMEMi com anticorpo anti-β-galactosidase, também foi positiva (Figura 3C).

As células CMEMi transduzidas, ou seja, positivas para a expressão do gene repórter, denominadas agora CMEMi/*acZ*⁺, foram congeladas em alíquotas e usadas nos procedimentos cirúrgicos e ensaios de diferenciação celular.

5.3 Diferenciação das células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas e caracterização das células multipotentes do estroma mesenquimal diferenciadas

Três alíquotas de CMEMi/*acZ*⁺ foram submetidas ao tratamento *in vitro* para diferenciação em células semelhantes a células de Schwann. Na última semana do protocolo de 21 dias de tratamento, as modificações fenotípicas tornaram-se evidentes, com células apresentando um corpo

celular estrelado e mais estreito do que as CMEMi e CMEMi/*acZ*⁺, além de poucos processos celulares, todos longos e finos (Figura 4).

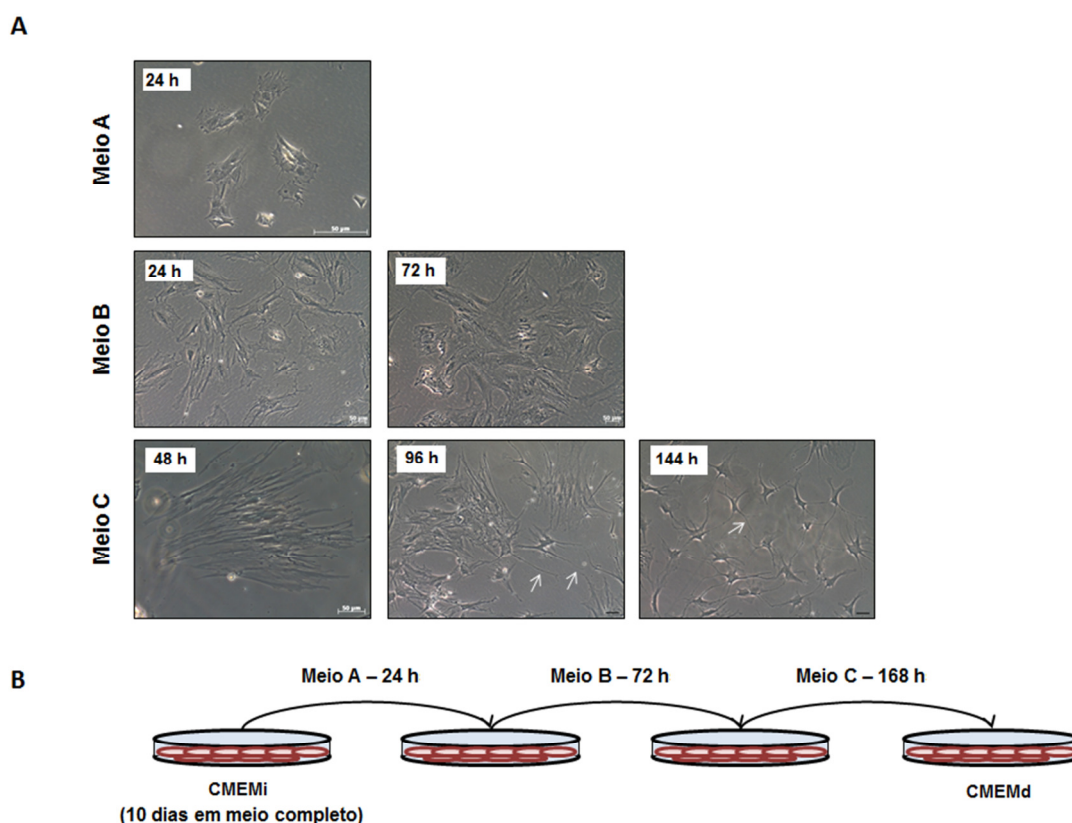


Figura 4 - (A) Imagens obtidas em fase, ao microscópio invertido Axiovert 40C[®] (Zeiss[®], Alemanha), durante o tratamento de células CMEMi/*acZ*⁺ em cultura, visando a sua diferenciação em células semelhantes às células de Schwann. Os meios de cultura (A, B e C) indicam as condições em que se encontravam as células durante o tratamento de acordo com o fluxograma em (B) e o período de incubação em cada meio quando a fotografia foi tirada está indicado em horas (h). (B) As unidades de tempo em (B) indicam a duração de cada etapa do tratamento *in vitro*. Os painéis de imagem em (A) permitem acompanhar a modificação da morfologia das células ao longo do tratamento, sobretudo quando incubadas em meio de cultura C. Neste meio, após 96 e 144 horas, observam-se processos alongados partindo do corpo celular (setas). Barras de escala: 100 μ m (meio A); 50 μ m (meios B e C).

No ensaio de imunofluorescência as células CMEMd/*acZ*⁺ foram positivas para a β -galactosidase em três dos quatro marcadores testados, Oct-6, p75NTR e S100 (Figura 5). O quarto marcador, GFAP, mostrou-se

negativo (dados não mostrados).

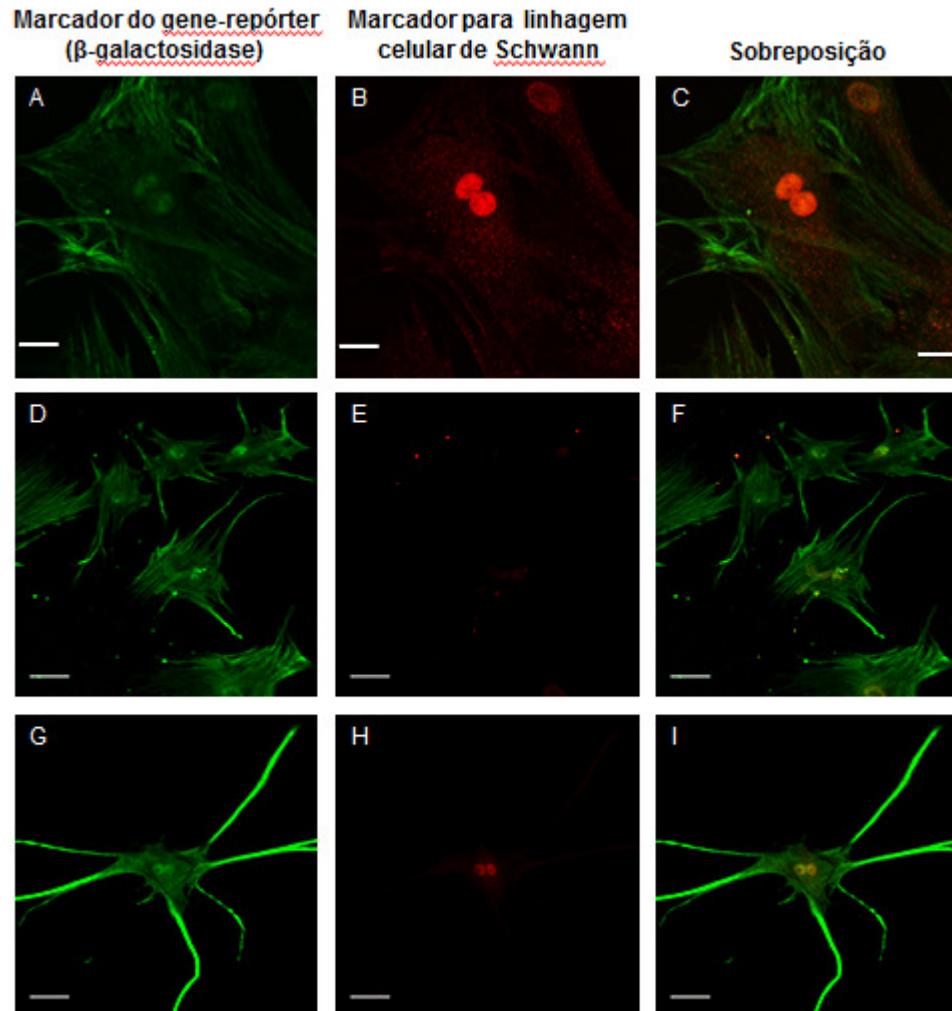


Figura 5 - Imunofluorescência indireta de células CMEMd/*lacZ*⁺ que foram submetidas ao tratamento completo visando à diferenciação *in vitro* em células semelhantes a células de Schwann. A marcação dupla foi realizada utilizando-se o anticorpo anti-β-galactosidase, com detecção por Alexa488 (verde, painéis A, D e G) e anticorpos para proteínas com expressão em precursores de células de Schwann (Oct-6, painel B), células de Schwann precursoras e imaturas (p75^{NTR}, painel E) e células de Schwann maduras (S100, painel H), com detecção por Alexa 568, em vermelho. Os painéis C, F e I definem a sobreposição das imagens, respectivamente entre os painéis A e B; D e E; e G e H. As imagens sobrepostas mostram que as células com expressão da proteína codificada pelo gene repórter (β-galactosidase) é a mesma que expressa os marcadores para célula de Schwann, uma vez concluído o tratamento *in vitro*. Nos painéis G-I, observa-se que a morfologia celular modificou, apresentando um corpo celular mais estrelado e longos processos, característicos de células da glia, corroborando o fenótipo de célula de Schwann madura, indicado pela expressão de S100. Imagens obtidas do agrupamento de seções z do microscópio confocal LSM410 (Zeiss, Alemanha). Barras de escala: 25 μm (A-C e G-I); 50 μm (D-F).

5.4 Avaliação da regeneração neural

A eficiência das CMEMi e CMEMd na regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos foi avaliada utilizando-se dois métodos objetivos: um funcional (estudo neurocondução motora) e outro histológico (análise quantitativa), além da complementação da avaliação histológica com um método subjetivo (estudo qualitativo) .

5.4.1 Avaliação funcional da regeneração neural

Os valores das variáveis amplitude, latência, duração e intensidade de estimulação dos PAMCs, dos lados direito e esquerdo, obtidos no pré-operatório, assim como os valores das variáveis amplitude, latência, duração dos PAMCs obtidos nas terceiras e sextas semanas de pós-operatório, do lado direito, foram submetidos ao teste de *Kolmogórov-Smírnov* resultando em 30% de dados não-normais.

5.4.1.1 Avaliação funcional da regeneração neural: pré-operatório

Os valores absolutos das variáveis, amplitude, latência, duração e intensidade de estimulação dos PAMCs, obtidos no pré-operatório dos lados direito e esquerdo, foram descritos na Tabela C (Anexo B). A média, mediana, desvio-padrão e percentil desses valores foram submetidos ao *Teste de Kruskal-Wallis* e analisados ($p < 0,05$). A Tabela 1 mostra que, no pré-operatório, não houve diferença estatisticamente significativa destas variáveis entre os grupos e/ou lados estudados.

Tabela 1 - Descrição e comparação dos valores das variáveis amplitude, latência, duração e intensidade de estimulação dos PAMCs obtidos no pré-operatório.

PRÉ-OPERATÓRIO										
Variável	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75	Sig. (p)
Amplitude Direita (mV)	A	9	5,8	1,68	3,6	8,68	4,08	6,34	6,83	0,983
	B	11	5,78	1,8	2,52	8,4	4,45	6,03	7,1	
	C	11	5,85	2,5	2,55	10,67	4,3	5,8	6,15	
	D	11	5,79	1,68	3,69	8,5	4,32	5,57	7,42	
	TOTAL	42	5,8	1,89	2,52	10,67	4,32	5,78	7	
Amplitude Esquerda (mV)	A	9	5,71	1,61	3,49	7,79	3,84	6,04	7,1	0,999
	B	11	5,72	2,15	1,59	8,92	4,29	5,9	7,3	
	C	11	5,81	2,21	2,1	9,08	3,82	5,94	7,63	
	D	11	5,81	1,8	2,5	8,17	4,83	6,18	6,88	
	TOTAL	42	5,76	1,9	1,59	9,08	4,24	6,03	7,23	
Latência Direita (ms)	A	9	1,17	0,19	0,8	1,5	1,1	1,16	1,3	0,066
	B	11	1,17	0,23	0,8	1,48	1	1,16	1,4	
	C	11	1,34	0,27	1,06	2,05	1,14	1,3	1,38	
	D	11	1	0,32	0,58	1,64	0,74	0,87	1,22	
	TOTAL	42	1,17	0,28	0,58	2,05	1,02	1,18	1,34	
Latência Esquerda (ms)	A	9	1,14	0,13	1	1,3	1,01	1,1	1,3	0,08
	B	11	1,13	0,11	1	1,3	1	1,16	1,2	
	C	11	1,37	0,47	0,82	2,66	1,1	1,28	1,5	
	D	11	1,03	0,19	0,6	1,68	0,92	1,13	1,88	
	TOTAL	42	1,15	0,31	0,6	2,66	1	1,1	1,29	
Duração Direita (ms)	A	9	4,49	1,1	2,76	5,66	3,2	4,82	5,61	0,982
	B	11	4,48	1,23	3,12	6,52	3,33	4,26	5,61	
	C	11	4,43	0,93	2,06	5,79	4,01	4,47	4,78	
	D	11	4,44	1,23	2,93	6,83	3,43	4,01	5,59	
	TOTAL	42	4,46	1,08	2,06	6,83	3,55	4,45	5,13	
Duração Esquerda (ms)	A	9	4,43	0,74	3,33	5,87	3,92	4,38	4,87	0,996
	B	11	4,42	0,85	3,36	5,96	3,71	4,37	4,98	
	C	11	4,46	0,85	3,11	6,08	3,83	4,29	5,35	
	D	11	4,35	0,98	2,62	5,97	3,69	4,2	4,74	
	TOTAL	42	4,41	0,83	2,62	6,08	3,92	4,37	4,76	
Estímulo Direita (mA)	A	9	2,48	0,44	2	3	2	2,5	2,95	0,076
	B	11	2,48	0,42	2	3	2	2,5	3	
	C	11	2,37	0,39	1,7	3	2	2,4	2,7	
	D	11	2,95	0,65	2	4	2,5	3	3	
	TOTAL	42	2,58	0,53	1,7	4	2	2,55	3	
Estímulo Esquerda (mA)	A	9	2,44	0,42	2	3	2	2,5	2,9	0,352
	B	11	2,45	0,46	2	3	2	2,5	3	
	C	11	2,28	0,49	1,5	2,9	1,9	2,4	2,6	
	D	11	2,68	0,64	2	4	2	3	3	
	TOTAL	42	2,46	0,52	1,5	4	2	2,5	3	

Teste de Kruskal-Wallis

* p<0,05

5.4.1.2 Avaliação funcional da regeneração neural: 3ª semana

Os valores absolutos das variáveis amplitude, latência e duração dos PAMCs, obtidos na 3ª semana do lado direito, estão descritos na Tabela D (Anexo C). A média, mediana, desvio-padrão e percentil desses valores foram submetidos ao *Teste de Kruskal-Wallis* e analisados (p<0,05).

A Tabela 2 mostra que na avaliação da 3ª semana, não houve diferença nos valores das amplitudes ($p=0,932$) e das latências ($p=0,987$) entre os grupos, apenas nos valores da duração dos PAMCs ($p=0,01$).

Tabela 2 - Descrição e comparação dos valores das variáveis: amplitude, latência e duração dos PAMCs obtidos na terceira semana.

3ª SEMANA										
Variável	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75	Sig. (p)
Amplitude Direita (mV)	A	9	0,4	0,44	0,12	1,39	0,14	0,22	0,59	0,923
	B	11	0,4	0,5	0,03	1,76	0,05	0,26	0,38	
	C	9	0,27	0,2	0,01	0,53	0,07	0,33	0,45	
	D	11	0,24	0,18	0,04	0,65	0,12	0,2	0,35	
	TOTAL	40	0,33	0,36	0,01	1,76	0,12	0,21	0,38	
Latência Direita (ms)	A	9	5,7	2,88	1,64	9,1	2,63	6,6	8,45	0,987
	B	11	5,77	3,22	0,76	11,2	3,8	4,54	8,18	
	C	9	5,37	2,34	2,86	10,9	3,78	5,11	5,82	
	D	11	6,5	4,35	1,93	11,7	2,1	7,3	11	
	TOTAL	40	5,86	3,24	0,76	11,7	2,89	5,12	8,65	
Duração Direita (ms)	A	9	13,98	2,26	9,71	18,8	12,73	14,1	14,93	0,01
	B	11	13,97	2,82	10,24	18,6	11,9	13,01	16,8	
	C	9	10,61	1,61	8,7	13,68	9,4	10,2	11,88	
	D	11	13,31	2,68	7,8	16,8	11,9	13,58	16,03	
	TOTAL	40	13,04	2,67	7,8	18,8	10,7	13	14,3	

Teste de Kruskal-Wallis

* $p < 0,05$

A variável duração foi submetida ao *Teste de Mann-Whitney*, ajustado pela *Correção de Bonferroni* (*alfa de Bonferroni* = 0,008512) e comparada grupo a grupo.

A duração dos PAMCs do grupo C foi menor, ou seja, melhor quando comparada a duração dos grupos A ($p=0,007$) e B ($p=0,002$). Não houve diferença quando confrontados os grupos A e B ($p=0,704$), A e D ($p=0,849$), B e D ($p=0,622$), C e D ($p=0,017$).

5.4.1.3 Avaliação funcional da regeneração neural: 6ª semana

Os valores absolutos das variáveis amplitude, latência e duração dos PAMCs, obtidos na sexta semana do lado direito, estão descritos na Tabela E (Anexo D). A média, mediana, desvio-padrão e percentil desses valores foram submetidos ao *Teste de Kruskal-Wallis* e analisados ($p < 0,05$). A Tabela 3 mostra que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos valores das amplitudes e durações dos PAMCs ($p < 0,001$). Não houve diferença entre as latências obtidas na 6ª semana ($p = 0,323$).

Tabela 3 - Descrição e comparação dos valores das variáveis amplitude, latência e duração dos PAMCs do lado direito obtidos na 6ª semana.

6ª SEMANA										
Variável	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75	Sig. (p)
Amplitude (mV)	A	9	0,66	0,51	0,35	1,93	0,37	0,47	0,78	* < 0,001
	B	11	0,66	0,45	0,22	1,86	0,33	0,6	0,78	
	C	9	2,07	0,73	1,26	3,61	1,62	1,76	2,59	
	D	10	1,85	0,66	1,33	3,49	1,43	1,59	2,15	
	TOTAL	39	1,29	0,87	0,22	3,61	0,5	1,33	1,76	
Latência (ms)	A	9	3,21	2,28	1,4	9	1,88	2,63	3,35	0,323
	B	11	3,2	1,74	1,8	7,12	1,96	2,65	4,7	
	C	9	2,24	0,31	1,72	2,7	2,1	2,1	2,52	
	D	10	2,14	0,5	1,63	2,89	1,72	1,95	2,71	
	TOTAL	39	2,71	1,49	1,4	9	1,9	2,28	2,75	
Duração (ms)	A	11	11,97	2,69	8,25	16,2	9,35	12,4	14,2	* < 0,001
	B	9	11,98	1,7	8,51	14,5	11,3	11,9	13,1	
	C	9	6,51	0,94	5,32	8,11	5,82	6,09	7,42	
	D	10	9,42	0,91	8,6	11,8	8,88	9,18	9,59	
	TOTAL	39	10,06	2,81	5,32	16,2	8,25	9,37	12,3	

Teste de Kruskal-Wallis

* $p < 0,05$

As variáveis amplitude e duração dos PAMCs foram submetidas ao *Teste de Mann-Whitney* ajustado pela *Correção de Bonferroni* (α de *Bonferroni* = 0,008512) e comparadas grupo a grupo.

Em relação às amplitudes obtidas na 6ª semana, os grupos que utilizaram CMEM (C e D) apresentaram resultados maiores, ou seja, melhores ao serem comparados aos grupos A ($p < 0,001$) e B ($p < 0,001$), os quais não receberam essas células. Não houve diferença nos valores das amplitudes ao confrontar os grupos A e B ($p = 0,849$) e os grupos C e D ($p = 0,307$) nesse mesmo período. (Gráfico 1)

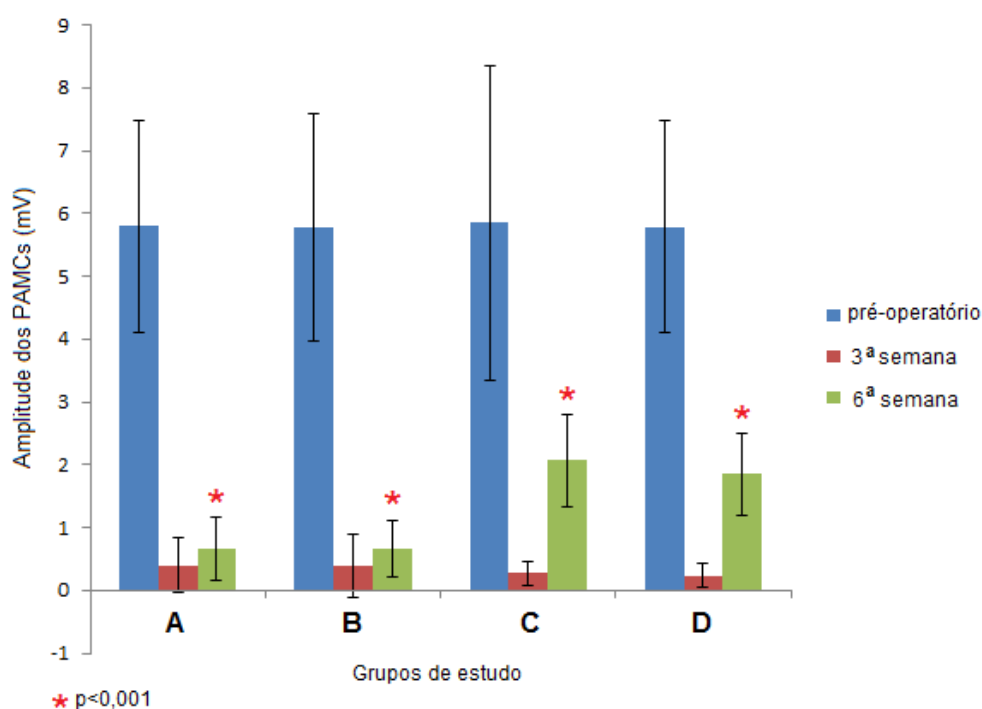


Gráfico 1- Amplitudes dos PAMCs do lado direito obtidas no pré-operatório, 3ª e 6ª semanas. Não houve diferença entre os grupos e/ou lados quando comparados no pré-operatório ou quando comparados os grupos na 3ª semana. Na 6ª semana, os grupos C e D apresentaram maiores amplitudes ao serem comparados aos grupos A e B ($*p < 0,001$). (Teste de Mann-Whitney ajustado pela Correção de Bonferroni com alfa de Bonferroni = 0,008512)

A duração dos PAMCs do grupo A foi igual ao do grupo B ($p = 0,879$), entretanto, ao confrontar o grupo A com os grupos C ($p < 0,001$) e D ($p = 0,007$), os resultados foram maiores, ou seja, piores. No grupo B, a

duração dos PAMCs foi maior em comparação ao grupo C ($p < 0,001$), porém, sem diferença estatisticamente significativa com o grupo D ($p = 0,032$). Ao analisar somente as durações dos PAMCs dos grupos aos quais foram aplicadas as CMEM, o grupo C apresentou durações menores se comparados às do grupo D ($p < 0,001$) (Gráfico 2).

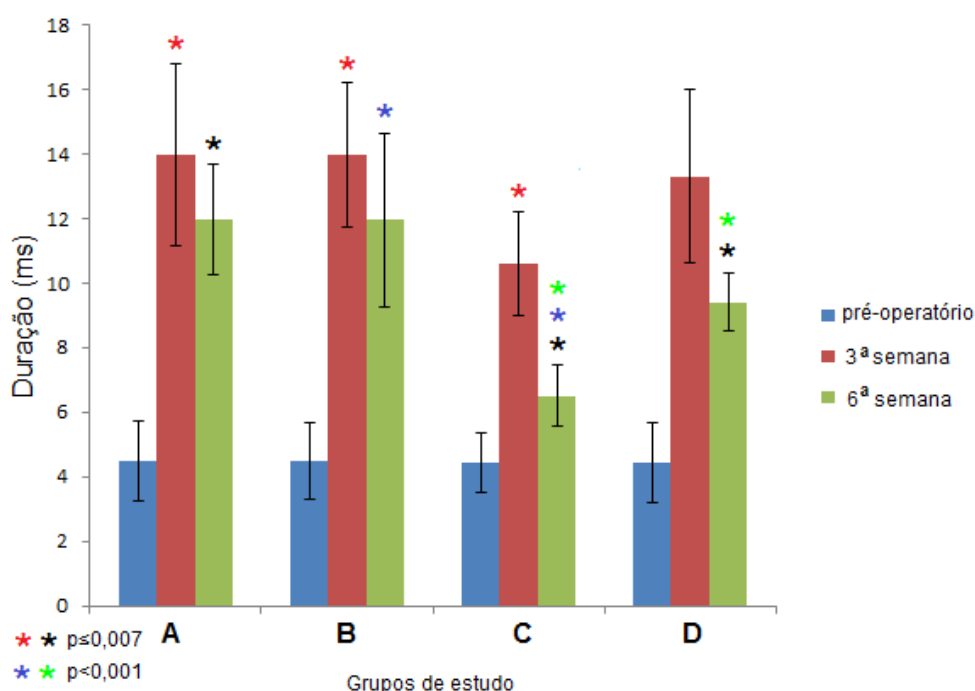


Gráfico 2 - Duração dos PAMCs do lado direito obtidos no pré-operatório, 3ª e 6ª semanas. Não houve diferença entre os grupos e/ou lados quando comparados no pré-operatório. Na 3ª semana, a duração do grupo C foi estatisticamente menor que a dos grupos A e B ($*p \leq 0,007$). Na 6ª semana, a duração do grupo A foi maior que a dos grupos C e D ($*p \leq 0,007$). Os grupos B ($*p < 0,001$) e D ($*p < 0,001$) apresentaram durações maiores ao serem comparados com o grupo C (*Teste de Mann-Whitney* ajustado pela *Correção de Bonferroni* com *alfa de Bonferroni* = 0,008512)

Em relação especificamente a latência, não houve diferença nos valores obtidos no pré-operatório, 3^a e 6^a semanas ao comparar grupo a grupo ($p>0,05$) (Gráfico 3).

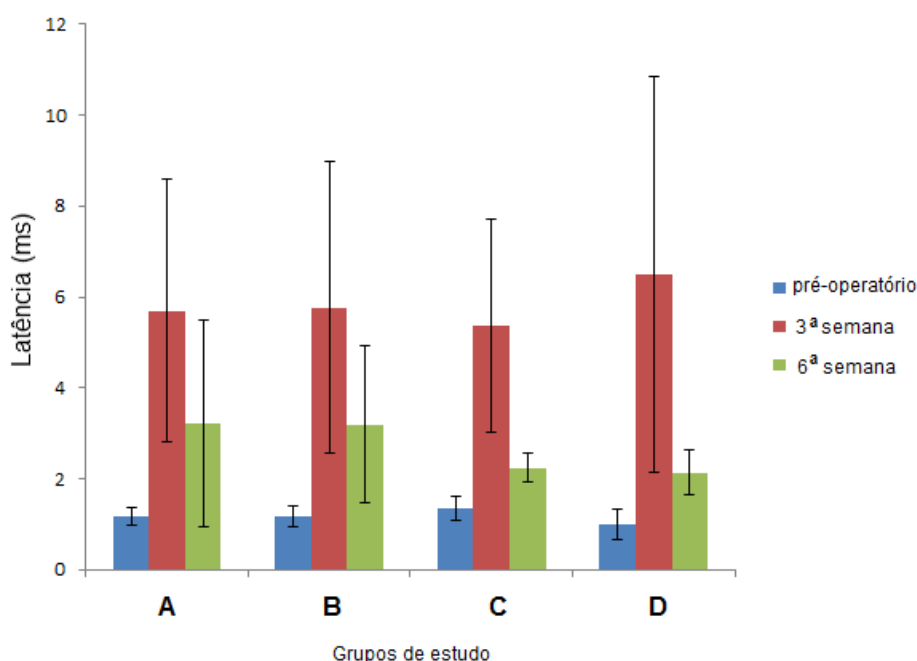


Gráfico 3 - Latência dos PAMCs do lado direito obtidos no pré-operatório, 3^a e 6^a semanas. Não houve diferença nos valores das latências dos PAMCs obtidos no pré-operatório, 3^a e 6^a semanas ao comparar os grupos (*Teste de Kruskal-Wallis*; $p<0,05$).

5.4.2 Avaliação funcional da regeneração neural: comparação entre os períodos

Os valores absolutos das variáveis: amplitude, latência e duração dos PAMCs, obtidos no pré-operatório, na 3^a e na 6^a semana do lado direito foram descritos anteriormente nas Tabelas C, D e E (Anexos B, C e D) respectivamente. A média, mediana, desvio-padrão e percentil desses

valores foram submetidos ao *Teste de Friedman* e analisados ($p < 0,05$). A Tabela 4 mostra que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em todos os grupos e variáveis estudadas ao confrontar os grupos por períodos ($p \leq 0,001$).

Tabela 4 - Comparação, por período, das variáveis amplitude, latência e duração dos PAMCs do lado direito.

Grupos	Variáveis	Período	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75	Significância (p)
A	Amplitude (mV)	Pré-operatório	9	5,8	1,68	3,6	8,68	4,08	6,34	6,83	*
		3ª Semana	9	0,4	0,44	0,12	1,39	0,14	0,22	0,59	< 0,001
		6ª Semana	9	0,66	0,51	0,35	1,93	0,37	0,47	0,78	
	Latência (ms)	Pré-operatório	9	1,17	0,19	0,8	1,5	1,1	1,16	1,3	*
		3ª Semana	9	5,7	2,88	1,64	9,1	2,63	6,6	8,45	0,001
		6ª Semana	9	3,21	2,28	1,4	9	1,88	2,63	3,35	
	Duração (ms)	Pré-operatório	9	4,48	1,23	3,12	6,52	3,33	4,26	5,61	*
		3ª Semana	9	13,97	2,82	10,24	18,6	11,9	13,01	16,8	0,001
		6ª Semana	9	11,98	1,7	8,51	14,5	11,3	11,9	13,1	
B	Amplitude (mV)	Pré-operatório	11	5,78	1,8	2,52	8,4	4,45	6,03	7,1	*
		3ª Semana	11	0,4	0,5	0,03	1,76	0,05	0,26	0,38	< 0,001
		6ª Semana	11	0,66	0,45	0,22	1,86	0,33	0,6	0,78	
	Latência (ms)	Pré-operatório	11	1,17	0,23	0,8	1,48	1	1,16	1,4	*
		3ª Semana	11	5,77	3,22	0,76	11,2	3,8	4,54	8,18	< 0,001
		6ª Semana	11	3,2	1,74	1,8	7,12	1,96	2,65	4,7	
	Duração (ms)	Pré-operatório	11	4,49	1,1	2,76	5,66	3,2	4,82	5,61	*
		3ª Semana	11	13,98	2,26	9,71	18,8	12,73	14,1	14,93	< 0,001
		6ª Semana	11	11,97	2,69	8,25	16,2	9,35	12,4	14,2	
C	Amplitude (mV)	Pré-operatório	9	5,81	2,8	2,55	10,67	3,8	5,28	8,05	*
		3ª Semana	9	0,27	0,2	0,01	0,53	0,07	0,33	0,45	< 0,001
		6ª Semana	9	2,07	0,73	1,26	3,61	1,62	1,76	2,59	
	Latência (ms)	Pré-operatório	9	1,34	0,3	1,06	2,05	1,12	1,3	1,43	*
		3ª Semana	9	5,37	2,34	2,86	10,9	3,78	5,11	5,82	< 0,001
		6ª Semana	9	2,24	0,31	1,72	2,7	2,1	2,1	2,52	
	Duração (ms)	Pré-operatório	9	4,31	1	2,06	5,79	4,01	4,47	4,78	*
		3ª Semana	9	10,61	1,61	8,7	13,68	9,4	10,2	11,88	< 0,001
		6ª Semana	9	6,51	0,94	5,32	8,11	5,82	6,09	7,42	
D	Amplitude (mV)	Pré-operatório	10	5,52	1,51	3,69	8,5	4,31	5,24	6,48	*
		3ª Semana	10	0,24	0,19	0,04	0,65	0,11	0,19	0,37	< 0,001
		6ª Semana	10	1,85	0,66	1,33	3,49	1,43	1,59	2,15	
	Latência (ms)	Pré-operatório	10	1,03	0,32	0,58	1,64	0,81	0,95	1,25	*
		3ª Semana	10	6,42	4,58	1,93	11,7	2,1	6	11,05	< 0,001
		6ª Semana	10	2,14	0,5	1,63	2,89	1,72	1,95	2,71	
	Duração (ms)	Pré-operatório	10	4,46	1,29	2,93	6,83	3,43	4,01	5,59	*
		3ª Semana	10	13,45	2,78	7,8	16,8	11,9	13,58	16,03	< 0,001
		6ª Semana	10	9,42	0,91	8,6	11,8	8,88	9,18	9,59	

Teste de Friedman

* $p < 0,05$

As variáveis amplitude, latência e duração dos PAMCs do lado direito foram submetidas ao *Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon* ajustado

pela *Correção de Bonferroni* (α de Bonferroni = 0,016952) e comparadas entre os três períodos de análise.

5.4.2.1 Amplitudes

Nos grupos A e B, as amplitudes obtidas no pré-operatório foram maiores, quando comparadas às obtidas na 3^a ($p=0,008$; $p=0,003$) e 6^a semanas ($p=0,008$; $p=0,003$), não havendo diferença ao confrontar os valores obtidos nas 3^a e 6^a semanas ($p=0,066$; $p=0,050$) respectivamente.

Nos grupos C e D, as amplitudes obtidas no pré-operatório foram maiores quando comparadas às obtidas na 3^a ($p=0,008$; $p=0,003$) e 6^a semanas ($p=0,008$; $p=0,005$), entretanto os valores das amplitudes da 6^a semana também foram estatisticamente maiores ao serem confrontados com os da 3^a ($p=0,008$; $p=0,005$) nesses dois grupos.

5.4.2.2 Latência

As latências dos grupos A, B e D no pré-operatório foram menores, ou seja, melhores quando comparadas as latências obtidas na 3^a ($p=0,008$; $p=0,004$; $p=0,003$) e 6^a ($p=0,008$; $p=0,003$; $p=0,005$) semanas. Não houve diferença nos valores dessa variável ao compará-la com os valores obtidos na 3^a e 6^a semanas ($p=0,038$; $p=0,050$; $p=0,037$).

As latências do grupo C no pré-operatório foram menores quando comparadas as latências obtidas nas 3^a ($p=0,008$) e 6^a semanas ($p=0,008$). Entretanto, os valores das latências na 6^a semana também se mostraram menores ao serem comparados com os da 3^a ($p=0,008$) neste grupo.

5.4.2.3 Duração

Nos grupos A, B e D as durações dos PAMCs no pré-operatório foram menores ao confrontá-las com as durações obtidas na 3^a ($p=0,008$; $p=0,003$; $p=0,003$) e 6^a semanas ($p=0,008$; $p=0,003$; $p=0,005$), não havendo diferença ao comparar os valores dessa variável obtidos na 3^a semana com os da 6^a semana ($p=0,173$; $p=0,108$; $p=0,107$).

No grupo C, as durações dos PAMCs no pré-operatório foram menores ao compará-las com as obtidas na 3^a ($p=0,008$) e 6^a semanas ($p=0,008$). No entanto, as durações dos PAMCs desse grupo obtidas na 6^a também foram menores ao confrontá-las com os valores obtidos na 3^a semanas ($p=0,008$) nesse grupo. A Figura 6 mostra exemplos de PAMCs dos grupos A, B, C e D adquiridos nos três períodos estudados (lado direito).

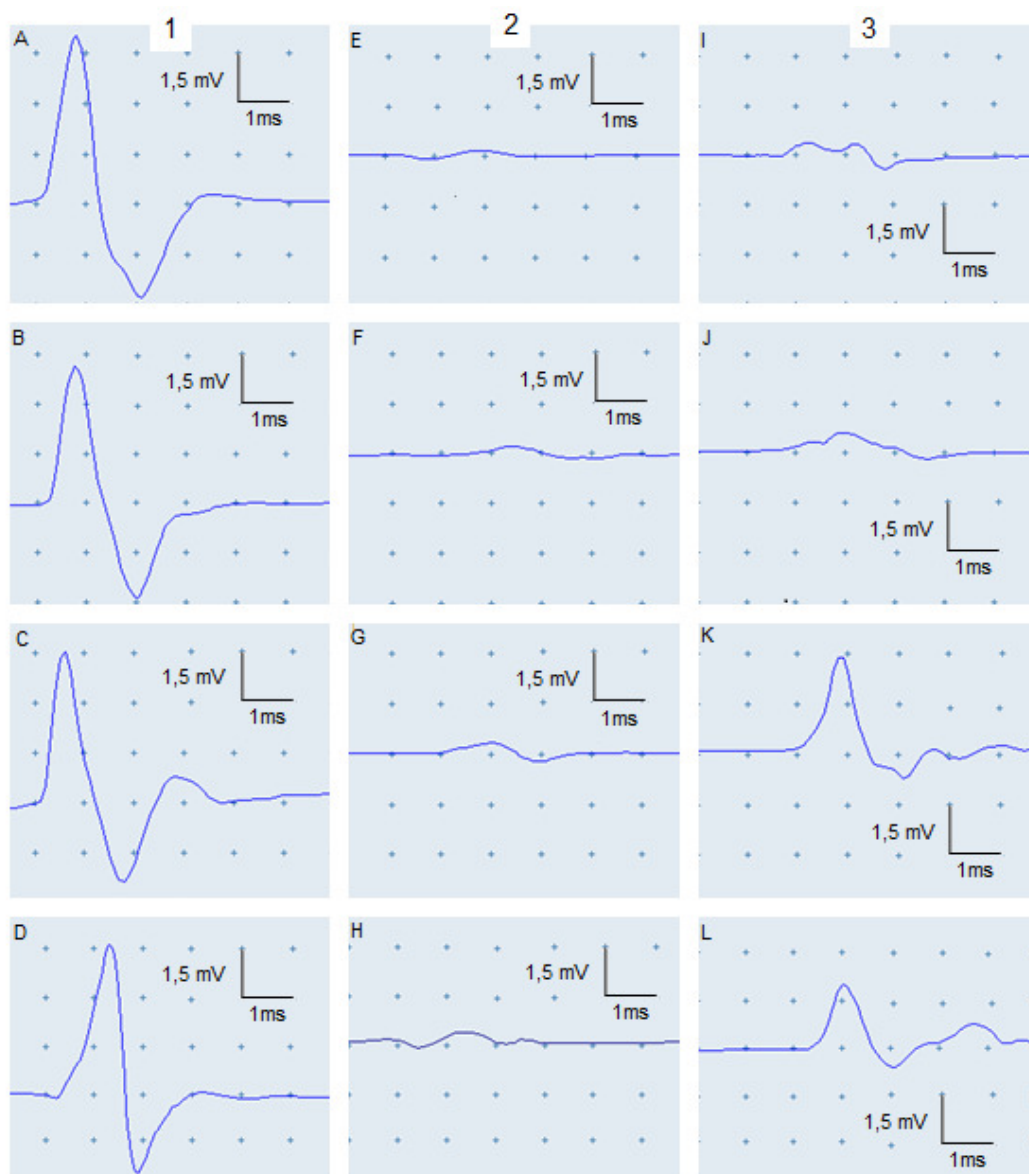


Figura 6 – Exemplos de PAMCs do lado direito dos grupos A, B, C e D nos três períodos estudados. A coluna 1 representa os PAMCs obtidos no pré-operatório : **(A)** grupo A; **(B)** grupo B; **(C)** grupo C; **(D)** grupo D. A coluna 2 representa os PAMCs obtidos na 3ª semana: **(E)** grupo A; **(F)** grupo B; **(G)** grupo C; **(H)** grupo D. A coluna 3 representa os PAMCs obtidos na 6ª semana: **(I)** grupo A; **(J)** grupo B; **(K)** grupo C e **(L)** grupo D.

5.5 Avaliação histológica da regeneração neural

Durante o processo de inclusão e/ou cortes, perdeu-se um segmento distal do grupo B e descartaram-se seis segmentos do grupo D (três proximais e três distais) por causa da inclusão no eixo errado e consequentes cortes longitudinais. Portanto, ao todo, foram analisados histologicamente 95 segmentos de nervos, 48 segmentos proximais (nove do grupo A, 11 do grupo B, nove do grupo C, sete do grupo D e 12 do grupo N) e 47 segmentos distais (nove do grupo A, 10 do grupo B, nove do grupo C, sete do grupo D e 12 do grupo N).

No total, foram fotografadas 380 lâminas, 95 no aumento de 50x (nervo inteiro – uma foto por segmento P1, P', D1 e D') e 285 no aumento de 400x (três fotos por segmento P1, P', D1 e D'). Todas as fotos foram digitalizadas e analisadas com o software SigmaScan Pro 5.0 (SPSS Science®, Chicago, USA) por dois examinadores diferentes, cegos, sendo os resultados utilizados nos testes estatísticos a média obtida por esses dois examinadores.

5.5.1 Avaliação histológica qualitativa da regeneração neural:

5.5.1.1 Segmentos proximais (P1 e P')

Ao comparar os segmentos proximais (P1) somente dos grupos operados, não houve diferenças visualmente importantes. Todos apresentaram uma morfologia bastante semelhante: um fascículo bem

definido, axônios relativamente arredondados, com diâmetros aparentemente regulares, distribuídos homoganeamente e com bainha de mielina densa e espessa (Figuras 7A-D). O epineuro e perineuro estavam presentes variando de espessura em poucos animais dentro de cada grupo. A neoangiogênese apesar de discreta foi mais visualizada nos grupos A e B (Figuras 7A-B).

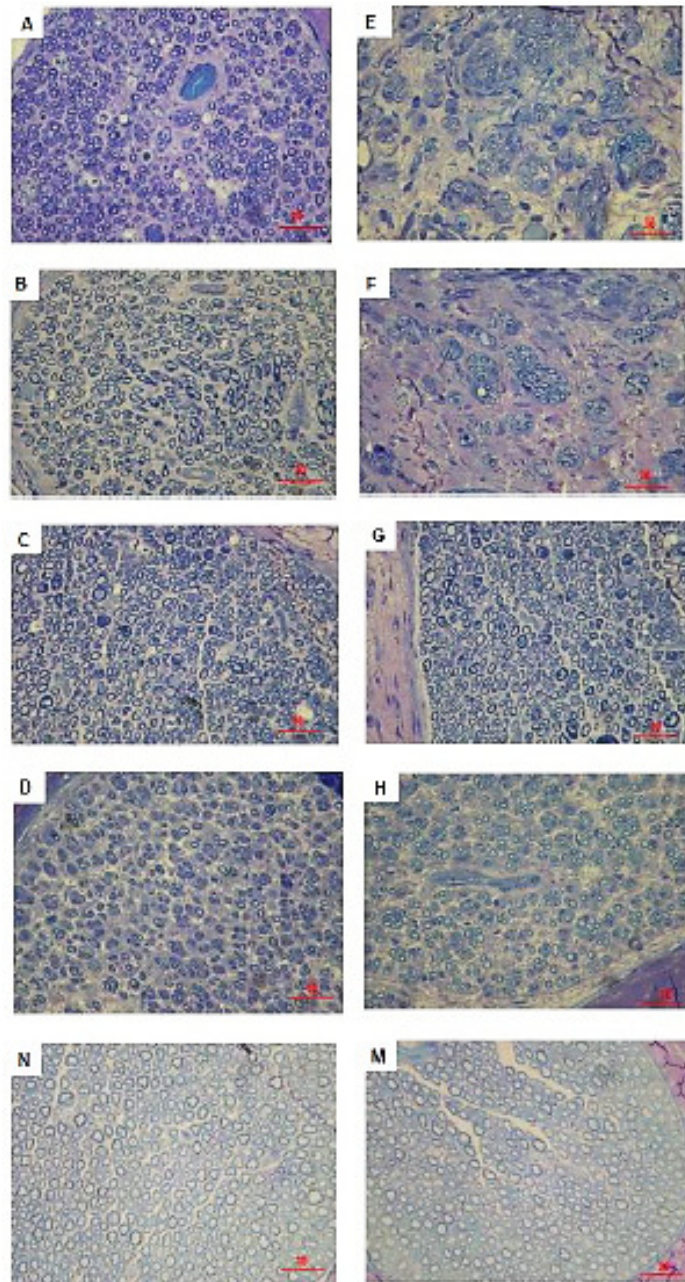


Figura 7 – Cortes histológicos transversais de 1µm corados com azul de toluidina 1% dos segmentos proximais (P1 e P') e distais (D1 e D') obtidos através da visualização por microscópio óptico em aumento de 400x, representando uma área de 3,000 µm² (Barra de escala=30 µm). A primeira linha (superior) representa os segmentos proximais: (A) grupo A; (B) grupo B; (C) grupo C; (D) grupo D e (N) nervo normal. A segunda linha (inferior) representa os segmentos distais: (E) grupo A; (F) grupo B; (G) grupo C; (H) grupo D; (M) nervo normal.

Os segmentos proximais dos nervos normais (P') apresentaram também um fascículo que continha axônios regulares, de diâmetros similares e distribuídos homoganeamente. O perineuro mostrou-se como uma condensação de tecido frouxo e o epineuro estavam presentes e visíveis (Figura 5N). Contudo, ao comparar os segmentos P1 com o P', as diferenças tornaram-se mais evidentes, mostrando que houve uma rarefação e clara alteração na morfologia dos axônios como diminuição do tamanho axonal, adelgaçamento e formação irregular da bainha de mielina em todos os grupos, além de salientar a presença de neoangiogênese principalmente no grupo A (Figuras 7A-N). Apesar de discretas as diferenças entre os segmentos P, o grupo C foi o que mais se aproximou do nervo normal (Figuras 7 C e N).

5.5.1.2 Segmentos distais (D1 e D')

Nos grupos C e D houve a formação de dois a três fascículos bem definido, porém com epineuro e perineuro menos espessos se comparados aos segmentos proximais (P1) (Figuras 7 C-D e G-H). No grupo D, apesar de ter havido a formação de fascículos, os axônios confluíram e formaram pequenos grupos, com axônios regulares, porém muito pequenos e com bainha de mielina mais delgada. Tanto o epineuro quanto o perineuro apresentaram-se mais finos (Figura 7H). Nos grupos A e B, não houve a formação de fascículos, apenas diversos agrupamentos axonais, com uma quantidade ínfima de axônios irregulares e sem perineuro. O epineuro também foi de difícil localização e quando presente mostrava-se muito fino

(Figuras 7E e 7F). A neoangiogênese foi mais evidente em todos os grupos ao compará-los com os segmentos P1 e P', porém mais presente nos grupos que não receberam CMEM (A e B). Em comparação ao segmento distal do nervo normal (Figura 7M), assim como ocorrido no segmento proximal, as diferenças tornaram-se mais evidentes, mostrando uma diminuição ainda maior da quantidade e no tamanho dos axônios, principalmente nos grupos A e B, além do adelgaçamento e irregularidade na bainha de mielina em todos os grupos (Figuras 7 E-H). A neoangiogênese foi claramente maior no segmento distal dos grupos A e B apesar de presente também no grupo D. O segmento D1 do grupo C também foi o que mais se assemelhou ao nervo normal (Figuras 7 G e M).

5.5.2 Avaliação histológica quantitativa da regeneração neural

Os valores absolutos do número total de axônios, as médias dos diâmetros e a densidade axonal em uma área parcial ($9.000\mu\text{m}^2$) dos segmentos P' e D' obtidos no pré-operatório (grupo N) e dos segmentos P1 e D1 obtidos na 6ª semana (grupos A, B, C e D) foram descritos na Tabela F (Anexo E). As médias, medianas, os desvios-padrões e percentis destes valores foram submetidos ao *Teste de Kruskal-Wallis* e analisados ($p < 0,05$). A Tabela 5 mostra que nos segmentos proximais foram encontradas diferenças apenas nas médias dos diâmetros axonais ($p < 0,001$), enquanto nos segmentos distais todas as variáveis histológicas estudadas mostraram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 5 - Descrição e comparação dos valores dos números, diâmetros e densidades axonais dos segmentos proximais e distais dos grupos estudados.

Variável	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 Mediana	Percentil 75	Significancia (p)
Número de axônios Segmento proximal	A	9	1516	323,42	1241	2063	1259	1381	1800,5	0,193
	B	11	1517	243,64	1259	2123	1339	1462	1633	
	C	9	1613,2	429,84	1182	2325	1354,5	1381	2089,5	
	D	7	1692,1	273,31	1293	2162	1514	1629	1811	
	N	12	1662	131,03	1336	1847	1590,75	1669,5	1753	
Total	48	1596,7	284,02	1182	2325	1355,25	1568	1753		
Número de axônios Segmento distal	A	9	444,22	92,94	324	602	359,5	423	517	* < 0,001
	B	10	445	238,04	160	776	198,25	437,5	655,25	
	C	9	1024	356,83	489	1832	846,5	1025	1076	
	D	7	988,71	462,94	372	1507	539	903	1434	
	N	12	1646	115,96	1382	1789	1599	1663	1721,5	
Total	47	943,34	546,82	160	1832	444	786	1518		
Diâmetro Axonal Segmento proximal	A	9	3,1	0,41	2,27	3,62	2,92	3,01	3,5	* < 0,001
	B	11	3,09	0,45	2,4	3,93	2,67	3,13	3,45	
	C	9	3,9	0,73	3,28	5,58	3,39	3,64	4,22	
	D	7	3,36	0,87	2,46	4,57	2,49	3,63	4,03	
	N	12	4,5	0,21	4,2	5,01	4,36	4,48	4,53	
Total	48	3,63	0,78	2,27	5,58	3	3,5	4,38		
Diâmetro Axonal Segmento distal	A	9	2,78	0,47	2,26	3,59	2,37	2,66	3,21	* < 0,001
	B	10	2,78	0,42	2,43	3,84	2,51	2,62	2,9	
	C	9	3,22	0,3	2,86	3,77	3	3,16	3,42	
	D	7	2,77	0,61	2,32	3,68	2,34	2,47	3,62	
	N	12	4,49	0,27	4,09	5,06	4,28	4,51	4,61	
Total	47	3,3	0,83	2,26	5,06	2,54	3,05	4,09		
Densidade Axonal Segmento proximal	A	9	0,17	0,04	0,14	0,23	0,14	0,15	0,2	0,169
	B	11	0,17	0,03	0,14	0,24	0,15	0,16	0,18	
	C	9	0,18	0,05	0,13	0,26	0,15	0,15	0,23	
	D	7	0,19	0,03	0,14	0,24	0,18	0,19	0,23	
	N	12	0,18	0,01	0,15	0,21	0,18	0,19	0,19	
Total	48	0,18	0,03	0,13	0,26	0,15	0,18	0,19		
Densidade Axonal Segmento distal	A	9	0,05	0,01	0,04	0,07	0,04	0,05	0,06	* < 0,001
	B	10	0,05	0,03	0,02	0,09	0,02	0,05	0,07	
	C	9	0,11	0,04	0,05	0,2	0,09	0,11	0,12	
	D	7	0,11	0,05	0,04	0,17	0,06	0,1	0,16	
	N	12	0,18	0,01	0,15	0,2	0,18	0,18	0,19	
Total	47	0,1	0,06	0,02	0,2	0,05	0,09	0,17		

Teste de Kruskal-Wallis

*p < 0,05

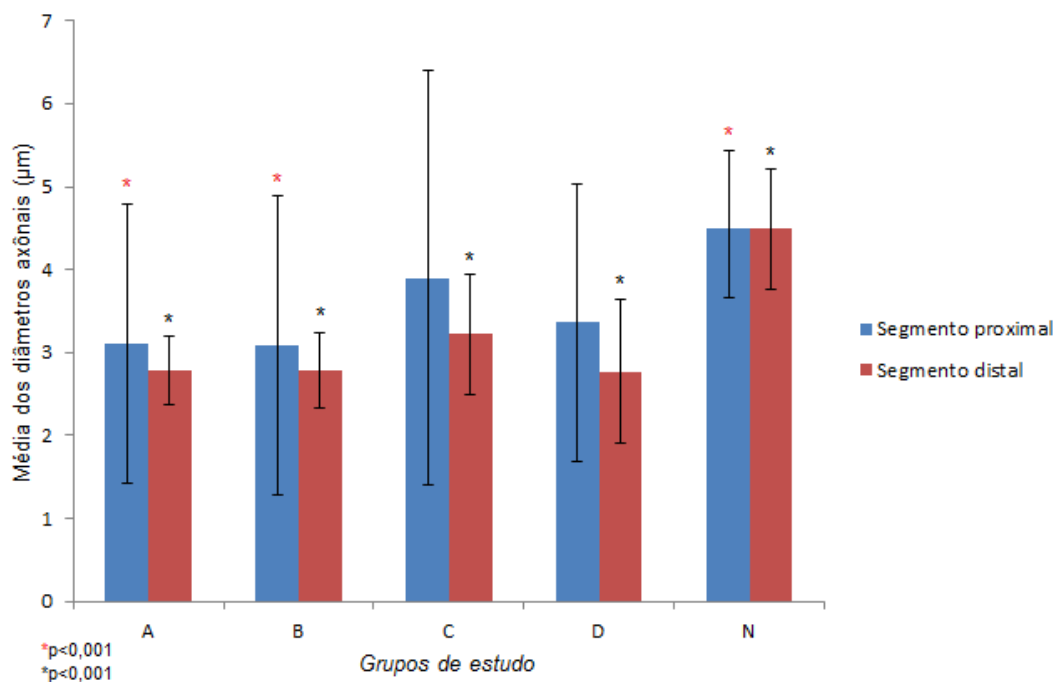
5.5.2.1 Segmentos proximais (P1 e P')

As médias dos diâmetros axonais dos segmentos P1 e P' foram submetidas ao *Teste de Mann-Whitney* ajustado pela *Correção de Bonferroni* (*alfa de Bonferroni = 0,005116*) e comparadas grupo a grupo.

Não houve diferença ao comparar os diâmetros dos grupos C e D com os diâmetros dos grupos A, B e N ($p \geq 0,007$). Também não houve

diferença ao confrontarmos os grupos C e D ($p=0,427$) e os grupos A e B ($p=0,909$), somente as médias dos diâmetros axonais dos grupos A e B apresentaram valores menores quando comparadas ao grupo N ($p<0,001$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Comparação da média do diâmetro axonal em uma área parcial ($9.000\mu\text{m}^2$). Nos seguimentos proximais não houve diferença ao comparar os diâmetros dos grupos C e D com os dos grupos A, B e N ($p\geq 0,007$) assim como ao confrontarmos os grupos C e D ($p=0,427$) e os grupos A e B ($p=0,909$). As médias dos diâmetros axonais do segmento proximal dos grupos A e B mostraram-se menores ao compara-las com as do grupo N ($*p<0,001$). No segmento distal, não houve diferença na média dos diâmetros entre os grupos operados ($p\geq 0,007$), no entanto, ao compará-los ao grupo normal (grupo N), todos apresentaram diâmetros estatisticamente menores ($*p<0,001$) (Teste de Mann-Whitney ajustado pela Correção de Bonferroni com alfa de Bonferroni = 0,005116).



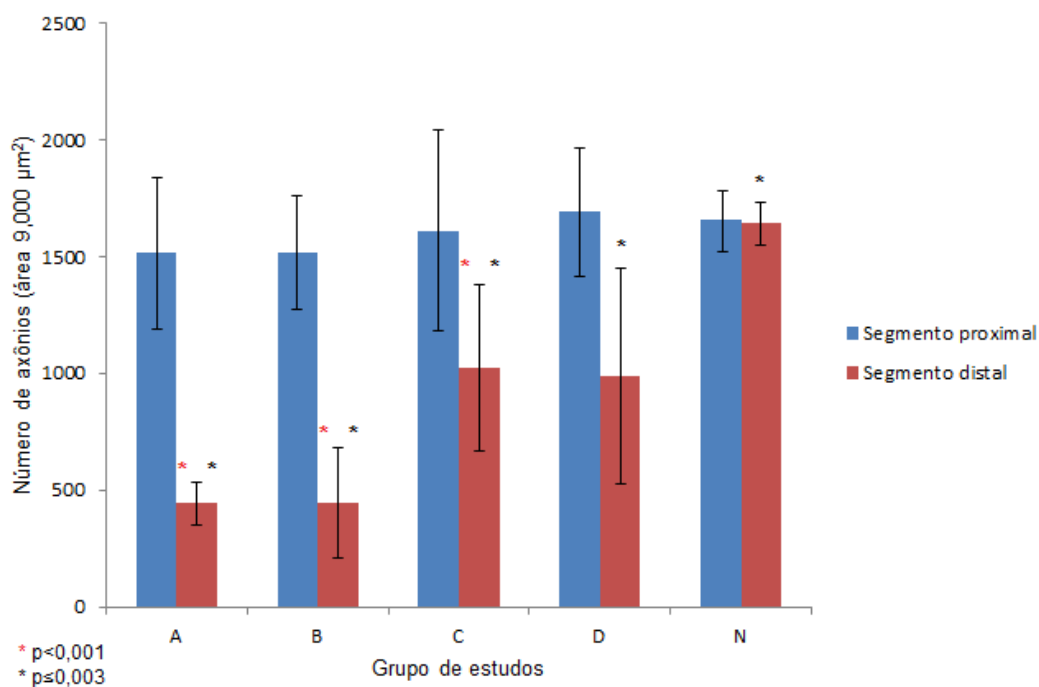
5.5.2.2 Segmentos distais (D1 e D')

As quantidades, densidades e médias dos diâmetros axonais foram

submetidas ao *Teste de Mann-Whitney* ajustado pela *Correção de Bonferroni* (*alfa de Bonferroni* = 0,005116) e comparados grupo a grupo.

Em relação à quantidade de axônios, não existiu diferença ao comparar o grupo D com os grupos A, B e C ($p \geq 0,013$) e também ao comparar os grupos A e B ($p = 0,935$). A quantidade de axônios do grupo C mostrou-se estatisticamente maior em relação aos grupos A ($p = 0,001$) e B ($p = 0,001$), porém em todos os grupos, o número de axônios foi menor quando confrontados ao grupo N ($p \leq 0,003$). (Gráfico 5)

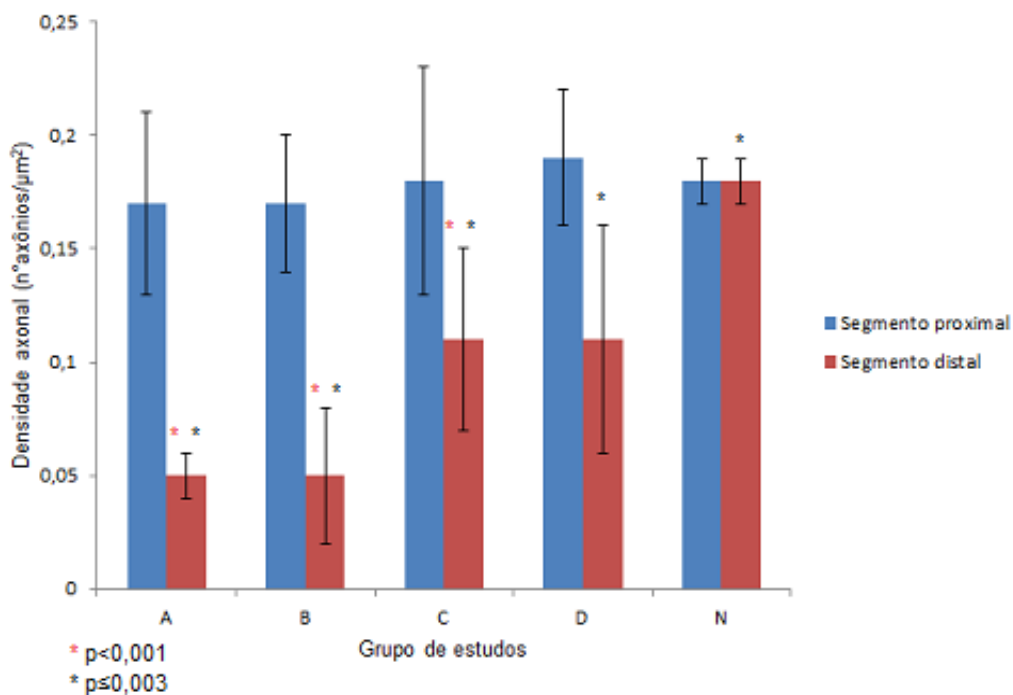
Gráfico 5 – Comparação do número de axônios em uma área parcial ($9,000 \mu\text{m}^2$). Nos seguimentos proximais que não houve diferença estatística entre os grupos estudados ($p > 0,05$). Nos segmentos distais, o número de axônio do grupo C mostrou-se estatisticamente maior em relação aos grupos A ($*p = 0,001$) e B ($*p = 0,001$), porém em todos os grupos, o número de axônios foi menor quando confrontados ao grupo N ($*p \leq 0,003$). (*Teste de Mann-Whitney* ajustado pela *Correção de Bonferroni* com *alfa de Bonferroni* = 0,005116).



Os resultados obtidos na avaliação da densidade axonal foram os mesmos com os obtidos com o número de axônios. Não houve diferença ao comparar o grupo D com os grupos A, B e C ($p \geq 0,013$) e também ao confrontar os grupos A e B ($p = 0,935$). A densidade axonal do grupo C mostrou ser estatisticamente maior em relação aos grupos A ($p = 0,001$) e B ($p = 0,001$). Em todos os grupos, os valores da densidade axonal foram menores ao compara-los com o resultado do grupo N ($p \leq 0,003$).

Não houve diferença na média dos diâmetros entre os grupos operados ($p \geq 0,007$), no entanto, ao compara-los ao grupo normal (grupo N), todos apresentaram diâmetros estatisticamente menores ($p < 0,001$) (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Comparação da densidade axonal (número de axônios mielinizados/área parcial $9.000\mu\text{m}^2$). Nos seguimentos proximais que não houve diferença estatística entre os grupos estudados ($p>0,05$). Nos segmentos distais, a densidade axonal do grupo C mostrou-se estatisticamente maior em relação aos grupos A ($*p<0,001$) e B ($*p<0,001$), porém em todos os grupos, a densidade axonal foi menor quando confrontados ao grupo N ($*p\leq 0,003$). (*Teste de Mann-Whitney* ajustado pela *Correção de Bonferroni* com *alfa de Bonferroni* = 0,005116).



6 DISCUSSÃO

6.1 Modelo animal

A escolha do melhor modelo animal para o estudo da regeneração de nervos ainda é um tema bastante discutido, pois todos os modelos descritos na literatura apresentam vantagens e desvantagens (Mattox, Felix, 1987; Borin et al., 2010; Salomone et al., 2012).

Por ser bastante extenso e facilmente exposto, o nervo ciático de ratos é um dos modelos experimentais mais utilizados no estudo da regeneração de nervos periféricos (Lundborg, Longo, 1982; Seckel et al., 1984; De Medinaceli, Seaber, 1989; Buttemeyer et al., 1995; Lewin et al., 1997; Mohammad et al., 2000; Dezawa et al., 2001; Murakami et al., 2003; Keilhoff et al., 2006; Yang et al., 2011; Dadon-Nachum et al., 2011), no entanto, este nervo divide-se logo após sua emergência abaixo do *sacrum*, podendo causar alterações nos resultados funcionais e/ou histológicos (Mattox, Felix, 1987; Tomov et al., 2002; Hadlock et al., 2005; Salomone et al., 2012). Além disso, alguns autores como McCoy e Boyle (1971), Labelle e Allen (1972), Szal e Miller (1975), Aldskogius et al. (1980) e Spector (2000) referem que por causa de seu trajeto intra-ósseo longo, o nervo facial apresenta diferenças importantes nas respostas regenerativas em relação aos outros nervos, não permitindo a comparação.

Animais grandes como o porco, apesar de possuírem um extenso

segmento vertical (mastóideo) do nervo facial, excelentes para a realização de procedimentos cirúrgicos (Barrs, 1991), têm sua utilização restrita por dificuldades encontradas com o manuseio e a manutenção, custo alto, resistência baixa a infecções, além de apresentarem uma incidência alta de complicações anestésicas (Mattox, Felix, 1987; Salomone et al., 2012).

Mamíferos de médio a pequeno porte como gatos, coelhos e cobais também têm sido bastante utilizados, sobretudo por serem de mais fácil manuseio e apresentarem um custo menor em comparação aos animais de grande porte (Mattox, e Felix, 1987). Ademais, possuem o nervo facial anatomicamente semelhante ao nervo facial de humanos (Mattox, Felix, 1987; Bento, 1988; Costa, 2003) e uma reação microbiológica pós-traumática conhecida (Costa, 2003). Entretanto, estes animais ainda exibem certa complexidade de manuseio e manutenção, imunidade baixa além da dificuldade de suportar a paralisia facial bilateral (Mattox, Felix, 1987; Barrs, 1991; Borin et al., 2010; Salomone et al., 2012).

Animais pequenos como ratos estão sendo amplamente empregados em pesquisas experimentais por apresentarem vantagens como: manuseio e tratamento fáceis; resistência alta a manipulações e a infecções; custo baixo; podem ser alojados em gaiolas coletivas; possuem tolerância à paralisia facial bilateral; similaridade anatômica com outros primatas (Mattox, Felix, 1987; Barrs, 1991; Borin et al., 2010; Salomone et al., 2012); além de possuírem todos os seus parâmetros anatômicos, metabólicos e de crescimento bem descritos na literatura (Donaldson, 1924; Greene, 1955; Wingerd, 1988; Gheorghe, 2011).

Optou-se utilizar ratos da raça Wistar não apenas por apresentar as vantagens já descritas, mas também porque estes animais possuem um segmento extratemporal do nervo facial bastante extenso, puramente motor, de fácil acesso e que mostra um padrão de ramificação que não difere dos outros roedores. Outra vantagem é que o nervo facial desses animais passa abaixo e não através da glândula parótida, e seus ramos periféricos repousam sobre a fáscia que recobre os músculos da face, o que facilita a exposição e a dissecação (Dörfl, 1982; Klein, Rhoades, 1986; Semba, Egger, 1986; Mattox, Felix, 1987; Salomone et al., 2012). Ademais, a quantidade de fibras do nervo facial de ratos não varia de acordo com a massa corporal e a idade do animal (Semba, Egger, 1986; Mattox, Felix, 1987). A padronização do sexo masculino foi proposital, por ter sido comprovada a influência que o ciclo hormonal feminino exerce sobre a regeneração neural (Kinderman, e Jones, 1998).

Estudos prévios, específicos sobre a regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos Wistar não são encontrados na literatura e mesmo assim optou-se por este ramo. As justificativas são:

- 1) facilidade de acesso se comparado aos ramos auricular posterior, cervical, temporal e zigomático (Mattox, Felix, 1987; Hadlock et al., 2005; Salomone et al., 2012);

- 2) trajeto mais longo (10 a 12mm) antes de se bifurcar em comparação ao tronco (6mm) e aos ramos cervical posterior, cervical, bucal, auriculo-temporal, zigomático e temporal, o que permite a realização de

cirurgias e o alinhamento dos enxertos sem alteração nos resultados (Mattox, Felix, 1987; Hadlock et al., 2005; Salomone et al., 2012);

3) padrão anatômico menos complexo em comparação aos ramos temporal e zigomático (Greene, 1955; Hebel, Stromberg, 1976; Mattox, Felix, 1987; Hadlock et al., 2005)

4) visualização prévia, por transparência, sem intervenção cirúrgica, o que possibilita o descarte de animais com variações anatômicas importantes as quais poderiam contaminar as respostas eletrofisiológicas como ramos adicionais, ramos para o lábio superior e/ou interligações com o ramo bucal (Salomone et al., 2012)

5) histologia padronizada e com pouca variação (Mattox, Felix, 1987; Costa et al., 2012)

6) Estudo de condução nervosa padronizado (Salomone et al., 2012)

7) maior semelhança com o nervo facial humano já que, diferentemente do tronco, o ramo mandibular apresenta fascículos (Greene, 1955; Thomander, 1982; Mattox, Felix, 1987; Wingerd, 1988; Gheorghe, 2011).

6.2 Paralisia facial periférica e regeneração neural

A regeneração do nervo facial é proporcional ao grau de lesão, ou seja, quanto mais leve for o grau de lesão do nervo, melhor será a regeneração neural (Salomone et al. 2011). Apesar de a idiopática ser a

etiologia mais frequente das PFP, os traumas correspondem a segunda causa mais comum de PFP (May, Schaitkin 2000) e quando ocorrem geralmente provocam uma lesão mais grave que a PFP idiopática, com descontinuidade parcial ou total do nervo (neurotmese) em até 57% dos casos (Bento et al., 1985; Bento, 1988; Bento et al., 1989; Bento et al., 2008; Salomone et al., 2011). Optou-se por estudar especificamente a PFP traumática (neurotmese) com a formação de um hiato de 3mm, por causa de três fatores: 1) índice alto deste tipo de lesão no homem (Bento et al., 1985; Bento, 1988; Bento et al., 1989; May, Schaitkin, 2000; Salomone et al. 2011); 2) prognóstico péssimo que esse tipo de lesão apresenta (Lundborg, 1982; Yanagihara, 1982; McKennan, Chole, 1992; May, Schaitkin, 2000; Hall, 2005; Millest, 2005; Grosheva et al., 2008a, b; Satar et al., 2009; Cho et al., 2010); 3) dificuldades/desvantagens na realização de enxertos (Nishiura et al., 2004; Zhang et al., 2008; Yang et al., 2008; Shi et al., 2009; Dong, Yi, 2010).

6.3 Técnicas cirúrgicas de reparação neural

Há muitos anos, o homem tenta reestabelecer a função de um nervo lesionado. Galeno, em 200 a.C. (apud Costa, 2003) foi o primeiro a relatar a possibilidade de regeneração de um nervo lesado. Em 600 d.C. Argino (apud Costa, 2003), realizou a primeira neurorrafia, entretanto, para alguns autores a primeira descrição de um ato cirúrgico sobre um nervo data do século XIII e foi realizado por Saliceto (apud Brunelli, 1978). Contudo, somente Hueter,

em 1873, foi quem obteve algum sucesso na reparação cirúrgica de um nervo lesado (Hueter, 1873; Bento, 1988).

A sutura término-terminal é considerada a técnica “padrão ouro” de reparação neural desde 1873 (Millesi, 1977; Yanagihara, 1982; Bento, 1988; McKennan, Chole, 1992; May, Schaitkin, 2000; Keilhoff, Fansa, 2011), apesar disso, os resultados funcionais obtidos com este tipo de cirurgia ainda permanecem insatisfatórios para o paciente (Lundborg, 1982; Yanagihara, 1982; McKennan, Chloe, 1992; May, Schaitkin 2000; Hall, 2005; Millest, 2005; Grosheva et al., 2008; Satar et al., 2009; Cho et al., 2010), e não ultrapassa HB III, quando realizada por cirurgiões experientes (Barrs, 1984; Liu, 2007; Satar et al., 2009).

O enxerto autólogo é indicado para os casos em que há perda de contiguidade do nervo e não é possível realizar a sutura término-terminal, seja ela com adesivo fibrínico ou fio de sutura (Bento, 1988; Millesi, 2000; Zhang et al., 2008; Ladak et al., 2011; Sun et al., 2001; Keilhoff, Fansa, 2011). No entanto, seu uso não é isento de sequelas com inúmeras desvantagens como escassez de fonte doadora, resultados funcionais insatisfatórios (HB IV-III), além de trazer sequelas neurais inevitáveis ao doador (Dezawa, 2002; Hu et al., 2005; Calyan, 2006; Yang et al., 2008; Shi et al., 2009; Fang et al., 2010; Wang et al., 2011; Keilhoff, Fansa, 2011). A aplicação de aloenxertos também é controversa pois sofrem rejeição e requerem imunossupressão contínua do indivíduo receptor (Keilhoff, Fansa, 2011).

A técnica cirúrgica de tubulização evoluiu espontaneamente no meio do século XX (Spector, 1991) e é definida por Fields et al. (1989) como a “introdução das extremidades proximal e distal de um nervo seccionado em uma estrutura tubular, que pode ou não conter substâncias e/ou outros adjuntos para fins experimentais ou para promover a cura”. Utilizada principalmente quando há perda de grande extensão de nervo, permite que o broto axonal cresça direcionado ao segmento distal, assim como sua mielinização (Doolabh et al., 1996; Battiston et al., 2005). Nesta técnica, é necessária a fixação das extremidades do tubo ao nervo com fio de sutura para diminuir a tensão, manter os segmentos do nervo em justaposição e preservar a correspondência entre os fascículos (Szal, Miller, 1975; Lundborg et al., 1982; Fields et al., 1989; Satar et al., 2009). Algumas vantagens da técnica da tubulização, como proteger o nervo contra compressão, confinar os fatores neurotróficos, reduzir a invasão de células do tecido conjuntivo, promover o direcionamento longitudinal dos vasos intraneurais, diminuir o cruzamento dos axônios em crescimento, e diminuir a formação de neuromas foram descritas por Szal e Miller (1975) e Fields et al. (1989), entretanto, a principal vantagem da tubulização em relação às outras técnicas cirúrgicas é ser um meio de administrar substâncias, neste caso as CMEMi e CMEMd, fornecer uma câmara experimental *in vivo* e possibilitar o estudo funcional e histológico da regeneração do nervo facial (Szal, Miller, 1975; Lundborg et al., 1981; Fields et al., 1989).

Glück, em 1880, foi o primeiro a usar um conduíte na tentativa de

promover a regeneração neural. O autor usou um dreno cirúrgico de osso para reparar um nervo dividido, porém, não obteve sucesso. Com base nessas tentativas, Vanlair (1882) instituiu uma série de estudos experimentais ao utilizar drenos cirúrgicos de osso descalcificados para reparar descontinuidades de nervos ciáticos de cães, e constatou a substituição do tecido ósseo por fibras regeneradas distais à lesão. A partir daí, surgiram vários tipos diferentes de conduites. Von Büngner (1891, 1893) utilizou artéria braquial, Notthaft (1893) a artéria aorta de coelhos e Glück (1880, 1881) experimentou vários tipos de materiais como tiras de couro dinamarquês, feixes de categute, fragmentos de músculo e pele. Em 1944, Weiss descreveu 20 tipos diferentes de revestimentos do sítio da sutura neural, usados entre os anos 1880 e 1943; entre eles havia pergaminhos, penas e tântalo. Fields et al., em 1989, propôs a utilização de aço inoxidável, traqueia, ágar, peritônio, caseína, colágeno, dura-máter, epineuro, fáscia, gordura, gaze, gelatina, vidro, magnésio, mesotélio, fibra de celulose, policarbonatos, poliéster, polietileno, policloreto de vinil, entre outros.

O tubo de silicone tornou-se o conduíte artificial mais utilizado em procedimentos cirúrgicos, principalmente por causa de suas características como elasticidade, transparência, imunogenicidade baixa e comprovada ação na diminuição do cruzamento das fibras axonais em crescimento (Ducker, Hayes, 1968; Szal, Miller, 1975; Chiu et al., 1982; Fields et al., 1989; Spector, 1991). Além disso, Ducker e Hayes (1968) estudaram a reparação de lesões do nervo periférico de cães e chimpanzés, ao comparar os envoltórios de silicone com Millipore[®] demonstrando que os tubos de silicone são bem

tolerados, mesmo após três anos da implantação, concluindo que o tubo de silicone é o melhor material para a reparação de nervos periféricos.

Independente do material utilizado, as dimensões do condúite podem afetar de modo significativo a regeneração do nervo. Segundo Ducker e Hayes (1968) para que as condições sejam favoráveis ao crescimento neural, o tubo de silicone deve ser relativamente curto e largo. Conduites muito curtos não permanecem na posição do sítio de reparação e quando muito extensos, 8-9mm (Campbell, Luzio, 1964), 10mm (Hirasawa, Marmor, 1967) e 40mm (Ducker, Hayes, 1968), podem interferir no suprimento sanguíneo e resultar em necrose, diminuição da condução neural ou desconexão das fibras axonais.

Em relação ao diâmetro, os condúites de silicone devem ser duas vezes e meia a três vezes mais largos que o diâmetro do nervo seccionado, para permitir a formação de edema sem lesão estrutural das fibras nervosas (Ducker, Hayes, 1968; Szal, Miller, 1975).

A espessura da parede do tubo é outra consideração de ordem prática. Conduites com espessura de 0,066-0,005 polegadas (1,68-0,13mm), em razão de sua elasticidade, diminuem a formação de neuromas (Weiss, 1944; Ducker, Hayes, 1968; Szal, Miller, 1975), no entanto, se muito finos, podem colabar e/ou estenosar (Ducker, Hayes, 1968).

Após analisar as vantagens e desvantagens de cada tipo de material e em virtude das características do tubo de silicone mencionadas acima, optou-se por utilizar no presente estudo este tipo de conduíte, com as dimensões adequadas para os procedimentos.

6.4 Células de Schwann

Desde a sua descoberta pelo fisiologista alemão Theodor Schwann, em 1939, as CS são descritas como um dos componentes mais importantes do processo de regeneração do nervo periférico (Martini et al., 1994; Bunge, 1994; Ide, 1996; Dubey et al., 1999; Dezawa et al., 2001; Hall et al., 2001; Dezawa et al., 2002; Mosahebi et al., 2003; Bhathja, Field, 2006; Cui, 2006; Cui et al., 2008; Lin et al., 2008a, b; Webber, Zochodne, 2010; Madduri e Gander, 2010; Krekoski et al., 2011; Hall et al., 2001; Wang et al., 2011). Essas células seriam as responsáveis pela produção de fatores neurotróficos os quais se acredita serem a chave para a regularização e modulação da sobrevivência neuronal (Von Bartheld, 1998; Abe et al., 2001; Hall et al., 2001).

Após uma lesão, o nervo periférico inicia uma cascata conhecida de eventos celulares e moleculares nos seguimentos proximal, distal e no local da lesão, evidenciando a participação direta e dinâmica das CS no processo de degeneração e regeneração neural (Dezawa et al., 2002; May, Schaitkin 2000). No local da lesão e no seguimento distal, inicia-se a chamada

degeneração Walleriana com a desdiferenciação e proliferação das CS nativas remanescentes, fragmentação e fagocitose dos axônios degenerados por essas CS neoformadas e macrófagos advindos de outros locais (Fawcett, Keynes, 1990; Torigoe et al., 1996; May, Schaitkin 2000; Hall et al., 2001; Dezawa et al., 2002).

As CS também apresentam uma íntima relação reguladora com os axônios. Os axônios regulam os genes que controlam a diferenciação e a proliferação da CS e em contrapartida, as CS enviam sinais intracelulares que regularizam a expressão desses genes. Quando esta relação estreita axônio-CS é prejudicada pela lesão e subsequente degeneração Walleriana, as CS rapidamente diminuem a expressão do gene de mielinização e aumentam as afinidades dos receptores de neurotrofina p75, proteína 43 associada ao crescimento (GAP-43), além de se desdiferenciarem e dividirem-se (Bolin, Shooter, 1993; Hall et al., 2001).

Em razão do suporte dado pelas CS ao nervo lesado, o transplante destas células corrobora para um melhor resultado regenerativo se comparado à simples liberação de fatores de crescimento (Hall, 1978; Ide, 1996; Fansa et al., 1999; Bhathja, Field, 2006; Madduri, Gander, 2010; Muir, 2010; Schmitte et al., 2010; Keilhoff et al., 2011). Entretanto, os grandes obstáculos em se utilizar as CS na prática clínica é conseguir quantidade suficiente de CS porque as CS alogênicas sofrem rejeição imunológica além de apresentar dificuldade no cultivo por baixa proliferação *in vitro* (Guenard et al., 1992; Caddick et al., 2006; Chen et al., 2006; Lin et al., 2008b; Shi et al., 2009, Cho et al., 2010) e as CS autólogas causam cicatrizes e sequelas

neurais na área doadora além de apresentarem limitação no número de nervos periféricos disponíveis (Nishiura et al., 2004; Zhang et al., 2008; Yang et al., 2008; Shi et al., 2009; Dong, Yi, 2010).

6.5 Células multipotentes do estroma mesenquimal da medula óssea

O conceito de células-tronco difere um pouco entre os autores. Owen (1978) descreve as células-tronco como células que possuem a capacidade de dividir-se, dando origem a células semelhantes às suas progenitoras. Beresford (1989) refere-se às células-tronco como um tipo especial de célula que tem a capacidade única de se autorrenovar e dar origem a células especializadas. Caplan (1991), por sua vez, define células-tronco como células que apresentam três características: autorrenovação, habilidade de se diferenciar em outros tipos celulares e capacidade *in vivo* de reconstruir um tecido novo. Para Muschler e Midura (2002) as células-tronco são células em repouso que apresentam duas propriedades: divisão assimétrica e autorrenovação. Essa divisão assimétrica é descrita como “a capacidade de uma célula-tronco, após ser ativada por um estímulo, sofrer uma divisão na qual uma célula permanece em repouso (estado original de repouso igual ao da célula-mãe) e a outra originar uma célula denominada progenitora, que tem a habilidade de se proliferar e posteriormente diferenciar-se, formando tecidos maduros” (Muschler e Midura, 2002).

Além das células-tronco hematopoiéticas, a medula óssea contém outro tipo de célula com fenótipo de células-tronco, as chamadas “stem-like cells”, as quais são precursoras das células não hematopoiéticas (Dezawa,

2006). Essas células, inicialmente, foram reconhecidas como células aderentes ao substrato plástico ou unidade de colônia formadora de fibroblastos e, só recentemente, foram reconhecidas como células-tronco mesenquimais ou do estroma da medula óssea (Prockop, 1997; Horwitz et al., 2005).

O termo “células-tronco” também é alvo de discussão. A Sociedade Internacional de Terapia Celular (2005) recomenda atualmente que se use o termo “células multipotentes do estroma mesenquimal” para as células aderentes ao substrato plástico, isoladas da medula óssea e que, com frequência, são rotuladas como “*bone marrow mesenchymal stem cells*” (acrônimo do inglês).

A importância do estudo das CMEM, diferenciadas ou não, na regeneração neural está na capacidade dessas células em secretar fatores neurotróficos, proporcionando um microambiente favorável para a sobrevivência das células neurais, estimulando e apoiando o crescimento, a maturação, a formação de mielina das fibras regeneradas dentro do enxerto e a diferenciação das células de Schwann (Woodburg et al., 2000; Cuevas et al., 2002; Dezawa, 2002; Barcelos et al., 2003; Gomillion, Burg, 2006., Cho et al., 2010; Sun et al., 2001a, b). Ademais, a capacidade de diferenciação *in vitro* das CMEMi em células com fenótipo de células de Schwann é demonstrada por vários autores desde o final da década de 90 (Jan, Jan, 1998; McDonald et al., 1999; Sanchez-Ramos, 2000; Cuevas et al., 2002; Tohill et al., 2004; Caylan et al., 2006; Lin et al., 2008a, b; Cui et al., 2008; Cho et al., 2008, 2010; Sun et al., 2001a, b; Keilhoff, Fansa, 2011).

As técnicas de colheita, expansão e diferenciação das CMEM são bem simples, de fácil reprodutibilidade e não apresentam restrições na aquisição. Além disso, são capazes de interagir e sobreviver em diferentes tecidos hospedeiros, inclusive em ambientes não imunes, pois apresentam imunogenicidade baixa (Pittenger et al., 1999; Colter et al., 2000; Hori et al., 2003; Uccelli et al., 2006a; Gneccchi, Melo, 2009; Keilhoff, Fansa, 2011). No presente estudo, as CMEMi foram extraídas da medula óssea de ossos longos (fêmur e tíbia) de ratos Wistar adultos, cultivadas, transduzidas, congeladas e posteriormente descongeladas e diferenciadas em CMEM que apresentavam fenótipo de Schwann sem dificuldades, com taxa de reprodutibilidade alta, seguindo os protocolos descritos anteriormente por Azizi et al. (1998), Dezawa et al. (2002), Lin et al. (2008b), Keilhoff et al. (2006) e Wang et al. (2011).

6.6 Caracterização celular

A caracterização das CMEMi pode ser realizada de diversas formas e seguir diversos critérios como morfometria, imunofenotipagem de superfície, transcriptoma, perfil de citocina e proteoma (Dominici et al., 2006; Caddick et al., 2006; Lin et al., 2008a, b; Satar et al., 2009).

Em razão da inespecificidade dos marcadores de superfície para as CMEMi, pois são expressos também em células musculares, mesenquimais, epiteliais e endoteliais, Dominici et al. (2006) estabeleceram três critérios para identificação destas células: 1) aderência ao substrato plástico;

2) expressão dos antígenos de superfície positivos ($\geq 95\%$ de expressão) para CD105, CD73 e CD90, e negativo ($\leq 2\%$ de expressão) para CD45, CD34, CD14, CD11b e CD79 α ; e, 3) potencial multipotente de diferenciação para três linhagens de células: osteoblastos, adipócitos e condroblastos. No entanto, alguns autores utilizaram somente a morfometria celular para caracterização das CMEMi. (Caddick et al., 2006; Lin et al., 2008a, b; Satar et al., 2009).

No presente estudo, as CMEMi foram separadas das células hematopoiéticas por sua adesão ao substrato plástico, troca do meio nas primeiras horas do cultivo primário e sua passagem. A caracterização ocorreu por morfometria, visualizada em microscópio (contraste de fase) e por imunomarcção negativa para os anticorpos CD34 e CD45, bem como para os marcadores de células da linhagem de Schwann (Oct-6, CD271, S100 e GFAP). A positividade para os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 não foi testada mediante clara evidência alcançada com a morfometria e a imunomarcção negativa.

A caracterização das CMEMd também é possível por morfometria, com células que mostram espiculações e intercomunicações as quais caracterizam o padrão neural (Caddick et al., 2006; Lin et al., 2008a, b), e também pela expressão das proteínas GFAP, S100 e p75^{NTR} que são consideradas específicas para CS, uma vez que não são expressas nas CMEMi (Shah et al., 1996; Jessen e Mirsky, 1999; Morrison et al., 1999; Zhang et al., 2004; Caddick et al., 2006; Lin et al., 2008a, b; Wang et al., 2011).

O marcador Oct-6 é expresso tanto nas CS como nas células da linhagem de oligodendrócitos (Monuki et al., 1989.; Scherer et al, 1994;. Jaegle et al., 1996; Bermingham et al., 1996; Arroyo et al., 1998; Gondre et al., 1998; Mandemakers et al., 2000), e apesar ser detectado em precursores das CS (Blanchard et al., 1996; Lobsiger et al., 2001), é mais expresso por CS na fase “promyelinating” durante o desenvolvimento e a mielinização de axônios em regeneração (Monuki et al., 1989; Scherer et al., 1994; Jaegle et al., 1996; Zorick et al., 1996; Arroyo et al., 1998).

No presente estudo a caracterização das CMEMd também ocorreu com modificações fenotípicas evidentes (corpo celular estreito, poucos processos celulares, todos longos e finos) e por positividade para os marcadores de superfície Oct-6, p75^{NTR} e S100, com distribuição subcelular, esperada para células de Schwann (Dezawa et al., 2001; Sim et al., 2002a, b; Cosgaya et al., 2002; Jaegle et al., 2003; Jessen e Mirsky, 2005; Parkhurst et al., 2010). O quarto marcador, GFAP, mostrou-se negativo, e isso ocorreu devido a fase em que as células se encontravam (Monuki et al., 1989;. Scherer et al., 1994; Jaegle et al., 1996; Zorick et al., 1996; Arroyo et al., 1998), porém, as características morfológicas associadas a positividade dos outros três marcadores de superfície, confirmaram a diferenciação das CMEMi em CMEMd.

6.7 Período das análises

Não existe um “período ideal” para as análises funcional e/ou histológica da regeneração do nervo facial de ratos, pois esse “tempo”

necessário para avaliação, depende de vários fatores como tipo de exame utilizado, modelo animal, ramo estudado, local e grau de lesão neural, tamanho do hiato, tipo de reparo e de conduíte utilizado entre outros.

Hadlock et al. (2005) referem que não há diferença entre as velocidades de crescimento dos nervos ciático ($2,20 \pm 0,3$ mm/dia) e bucal ($2,24 \pm 0,4$ mm/dia) de ratos. Lundborg (1982) avaliou a regeneração do nervo ciáticos de ratos após a realização de um hiato de 10mm e colocação de um conduíte de silicone mostrando que em três meses o nervo já havia reestabelecido a conexão entre os segmentos proximal e distal. Sun et al. (2011) relatam que oito semanas é suficiente para a regeneração de um hiato de 8mm no ramo bucal de ratos. Shi et al. (2010), após a realização de um hiato de 5mm no nervo facial de ratos, detectaram o retorno do NAP após quatro semanas. Szal e Miller (1975) descrevem o retorno da atividade bioelétrica do nervo facial de ratos, avaliada pelo teste de Hilger, após neurotome e sutura término-terminal em pouco mais de um mês. Além disso, Borin et al. (2010) observaram o início da movimentação das vibrissas três semanas após a lesão do tronco do nervo facial de ratos e referem, ainda, que em seis semanas o retorno funcional já estava bem perto do normal.

Em relação à histologia, Satar et al. (2009) referem que não houve diferença significativa no arranjo axonal do nervo bucal de ratos após neurotome e sutura término-terminal imediata ao compará-los após um, três e seis meses, mostrando que o nervo bucal de ratos após um mês da lesão, não mostrava mais sinais de DW, podendo ser avaliado neste período. Borin

et al. (2010) descrevem que houve crescimento e remodelamento axonal acentuados até sete semanas e que após este período, essas alterações alcançaram um platô, sem sofrer mais mudanças.

Com base nesses estudos prévios, foram padronizados a avaliação funcional em três momentos (pré-operatório, três semanas e seis semanas) e a avaliação histológica na sexta semana após o procedimento cirúrgico.

6.8 Avaliação funcional da regeneração neural

A avaliação funcional é parte fundamental dos estudos de regeneração neural, tornando-a um dos principais pontos de críticas dos trabalhos experimentais. Assim como o chamado “Walking track”, teste descrito primeiramente por Medinaceli, em 1982, no qual o autor avalia de uma forma não invasiva e subjetiva a regeneração do nervo ciático de ratos, alguns métodos foram criados para a avaliação da regeneração do nervo facial. Escalas de observações comportamentais da mimica facial (Chen, Bisby, 1993; Ferri et al., 1998; Borin et al., 2010) gravações em vídeo precisas da movimentação (Tomov et al., 2002; Hadlock et al., 2005; Guntinas-Lichius et al., 2005) e da fibrilação (Heaton, Kobler, 2005) das vibrissas associadas ou não a escalas são exemplos de métodos de avaliação funcional do nervo facial de ratos bastante utilizados, porém, caracterizam-se como subjetivos, e sofrem alterações quando realizados por examinadores distintos e/ou na presença de cicatrizes/edemas pós-cirúrgicos (Stipp-Brambilla et al., 2010).

Com o propósito de criar um método objetivo de avaliação funcional do nervo facial de ratos, várias técnicas também já foram descritas. Mattox e Felix (1987), pioneiros, estimularam o nervo facial em vários seguimentos (tronco, ramo bucal e ramo mandibular) e captaram as respostas com eletrodos subcutâneos localizados no lábio superior e inferior dos ratos. Byrne et al. (2005) estimularam o tronco do nervo facial e captaram os PAMCs por eletrodos colocados simétrica e bilateralmente nas vibrissas. Shi et al. (2009) avaliaram somente o ramo bucal do nervo facial, após a colocação de um tubo de silicone, estimulando-o no seguimento proximal e captando a resposta com microagulhas no seguimento distal para obter o potencial de ação do nervo (PAN). Entretanto, além de serem métodos invasivos, as técnicas descritas acima não estabelecem um local exato (fixo) para o estímulo, podendo causar alterações nos resultados que dependem da distância, como a latência (tempo necessário para que o potencial percorra as fibras nervosas mais o tempo de transmissão através da placa terminal), o tempo de condução das fibras musculares (velocidade das fibras rápidas) (Liverson, Dong, 1992; Nobrega, Manzano, 2007) e duração (medida do tempo do início ao final do PAMC, refletindo o número e a sincronia das fibras axonais que contribuem para a resposta eletro-neurofisiológicas) (Liverson, Dong, 1992).

Outro ponto questionado é a intensidade da corrente de estímulo. A amplitude (resultante da soma do potencial gerado por cada fibra nervosa) apresenta uma relação direta com o número de fibras axonais integras e sincrônicas presentes e despolarizadas pelo estímulo (Liverson, Dong, 1992;

Nobrega, Manzano, 2007; Salomone et al., 2012). Um valor mais baixo de amplitude do que o normal pode refletir a diminuição da quantidade de fibras integras ou da sincronia dessas fibras. Para evitar erros na avaliação da amplitude, deve-se usar o chamado estímulo supramáximo (Barrs, 1991; Liverson, Dong, 1992; Nobrega, Manzano, 2007), ou seja, a intensidade máxima de estímulo necessária para despolarizar todas as fibras do nervo (Salomone et al., 2012). Na avaliação funcional da regeneração do nervo facial, Mattox e Felix (1987) não descreveram a intensidade de estímulo usada, Shi et al. (2005) usaram corrente fixa de 0,5mA e Byrne et al. (2005) descreveram estímulos supramáximos com corrente fixa de 1,5mA, os quais diferem dos valores descritos por outros autores (Salomone et al. 2012; Costa et al. 2012).

É necessário também na avaliação funcional do nervo facial ter cuidado com as possíveis variações anatômicas. Como descrito anteriormente, o ramo mandibular do nervo facial dos ratos *Wistar* pode emitir ramos para o lábio superior, provocando assim uma ligação entre os ramos mandibular e bucal (Greene, 1955; Thomander et al., 1982; Mattox, Felix, 1987; Wingerd, 1988; Gheorghe, 2001). Este fato foi comprovado por Mattox e Felix (1987) ao estimularem os ramos mandibular e bucal separadamente, e captarem respostas sincrônicas em eletrodos localizados no lábio inferior e superior. Contudo, os próprios autores referem que o ramo mandibular (lábio inferior), apesar de apresentar traçados mais amplos, apresenta amplitudes menores quando comparado ao ramo bucal (lábio superior).

No presente estudo, para a avaliação funcional objetiva da regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos Wistar, foram analisados os valores das variáveis: amplitude, latência e duração dos PAMCs obtidas com a técnica de neurocondução motora descrita anteriormente por Salomone et al. (2012) na qual o estímulo elétrico foi aplicado sobre a pele, em um ponto fixo, a 20mm do eletrodo de captação, no trajeto do nervo avaliado (previamente visualizados por transparência), para evitar alterações nos resultados que dependem do tempo como a latência e duração do PAMC. Os PAMCs foram obtidos com estímulos supramáximo que variaram entre 1,79 e 3,6mA os quais estão em concordância com os valores normais descritos previamente (Salomone et al., 2012). 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 que interligavam esses ramos. Além disso, no intra-operatório, foi dissecado e retirado todo ramo bucal, desde sua saída abaixo da parótida até a musculatura nasal, além de reparar a borda do segmento proximal desse ramo com um fio de sutura, para que esse não crescesse em direção ao lábio inferior e contaminasse as respostas neurofisiológicas.

6.9 Resultados eletrofisiológicos

Os achados do presente trabalho mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa nos valores das variáveis: amplitude, latência,

intensidade de estímulo e duração dos PAMCs entre os grupos e/ou lados no momento do pré-operatório. Estes valores foram compatíveis com os valores normais padronizados por Salomone et al. (2012) e utilizados por Costa et al., (2012), que mostram que esta técnica de avaliação objetiva é de reprodutibilidade alta.

O aumento das amplitudes observadas nos grupos C e D em relação aos grupos A e B mostraram que o uso das CMEM realmente beneficiam a regeneração do nervo facial. Estas observações discordam dos resultados descritos por Grosheva et al. (2008) e confirmam os resultados obtidos pela maioria dos autores como Caylan et al. (2006), Satar et al. (2009), Cho et al. (2010), Wang et al. (2011) e Costa et al. (2011). No entanto, as CMEMd não favoreceram a regeneração em relação às CMEMi como nos relatos de Wang et al. (2011) e Costa et al. (2011), pelo contrário, a duração dos PAMC do grupo C foi melhor que a do grupo D, o que mostra que apesar da quantidade de fibras íntegras funcionantes (amplitude) serem iguais entre estes dois grupos, no grupo C elas apresentam uma melhor sincronia, o que resulta em uma melhora funcional.

No presente estudo observou-se que houve uma melhora significativa das amplitudes dos grupos C e D e também das latências e durações do grupo C, entre a terceira e sexta semanas demonstrando que as CMEM, em especial as CMEMi, corroboram para a melhora da regeneração neural principalmente à partir da terceira semana (Caylan et al., 2006; Cho et al., 2010; Borin et al., 2010; Wang et al., 2011; Costa et al., 2011).

O fato de, no presente estudo, as CMEMi apresentarem resultados funcionais melhores e mais precoces que as CMEMd pode ser explicado por dois motivos: 1) as CMEMd necessitam de um substrato biológico maior que as CMEMi e que o material de silicone não forneceu, pois os autores que descreveram uma melhora funcional da regeneração do nervo facial de roedores com o uso de células-tronco diferenciadas em comparação com células-tronco indiferenciadas usaram algum tipo de substrato biológico como plasma rico em plaquetas (Cho et al., 2010), fator neurotrófico derivado da glia (Shi et al., 2009), conduíte de veia autóloga (Wang et al., 2001), conduíte de ácido poliglicólico (Shi et al., 2009; Costa et al., 2012) e conduíte de artéria descelularizada (Sun et al., 2011a, b), enquanto que o estudo no qual foram aplicados conduítes de silicone cita não haver melhora na regeneração neural com a utilização de CMEMi (Grosheva et al., 2008); 2) As CMEMi parecem exercer um papel mais importante que as CMEMd no período imediato após a lesão neural uma vez que naturalmente ocorre uma desdiferenciação das CS completamente diferenciadas logo após uma lesão neural (Bolin, Shooter, 1993; Hall et al., 2001; Dezawa, 2002).

6.10 Resultados histológicos

O estudo morfométrico quantitativo do nervo, o qual inclui a contagem do número de axônios, densidade e diâmetro axonal, são considerados por muitos autores um método objetivo de avaliação da regeneração neural (Szal, Miller, 1975; Spector et al., 1993; Lewin et al., 1997).

A avaliação qualitativa, apesar de ser um método subjetivo, quando associado com a análise quantitativa, auxilia na avaliação da qualidade do tecido regenerado e na precisão dos resultados dos dados quantitativos da regeneração neural em relação ao tempo (Costa, 2003).

Entre os vários autores, existem divergências sobre qual é o melhor parâmetro morfométrico quantitativo na avaliação da regeneração neural. Segundo Hubbard (1972) e Vasconcelos e Gay-escoda (2000) a contagem da quantidade total de axônios é o critério mais pertinente. Miyamoto (1985) defende que a densidade axonal é a variável mais importante e os autores Duncan (1934), Fernand e Young (1951), Donovan (1967) e Williams e Wendell-Smith (1971) relatam que o diâmetro das fibras nervosas oferece uma base conveniente de comparação dentro e entre grupos experimentais enquanto que para May et al. (2002), não somente o diâmetro do axônio, mas a espessura e o comprimento da bainha de mielina, são as dimensões mais relevantes da avaliação da recuperação do nervo.

A análise das características morfométricas das fibras mielínicas pode ser realizada com a ajuda de um *software*, o que não apenas facilita a contagem, mas também fornece resultados confiáveis e precisos (Harrison, 1981). Além disso, não é necessário avaliar as características morfométricas no nervo por inteiro, pois os dados obtidos em 6% da área total são tão precisos quanto às medidas totais das fibras mielínicas de um nervo (Mayhew, e Sharma 1984a,b).

No presente estudo, a área parcial analisada de $9.000\mu\text{m}^2$

correspondeu a quase 90% da área total do ramo mandibular do nervo facial dos ratos *Wistar* (Costa et al. 2012). Os dados histológicos da morfometria quantitativa (número total de axônios, densidade e a média dos diâmetros axonais em uma área parcial de $9.000\mu\text{m}^2$) foram analisados por dois examinadores diferentes, cegos, utilizando o *software* SigmaScan Pro 5.0[®] (SPSS Science[®], Chicago, USA) e os dados finais, a média dos valores obtidos pelos mesmos examinadores. As fibras que não tinham o centro dentro do campo foram excluídas para evitar o chamado “efeito de margem” e conseqüentemente, erros de amostragem (Abercrombie, 1946; Gundersen, 1977).

Entre os autores que estudaram a regeneração do nervo facial de ratos, coelhos e cobaias, assim como no presente estudo, a melhora histológica qualitativa é evidente nos grupos que utilizaram algum tipo de célula-tronco em comparação aos que não usam essas células (Sun et al., 2001a, b; Satar et al. 2009; Shi et al., 2010; Cho et al., 2010; Wang et al., 2011; Costa et al., 2012), mostram sempre que nos grupos que empregam células-tronco ocorre uma melhora na organização axonal, aumento no número de axônios mielinizados assim como um aparente aumento do diâmetro das fibras de mielina, contudo, todos concordam que ainda as diferenças ao compará-los com o nervo normal são grandes. Porém, assim como o ocorrido na avaliação funcional, esses autores referem que os resultados histológicos qualitativos obtidos com as células-tronco diferenciadas são melhores que os das indiferenciadas, diferente do que foi descrito, pois apesar de bastante semelhantes, na avaliação histológica

qualitativa o grupo C foi o que mais se aproximou do nervo normal, tanto no segmento proximal quanto no segmento distal.

Em relação ao nervo normal, Mattox e Felix (1987) descrevem que o ramo mandibular de ratos *Wistar* contém de três a cinco fascículos. No presente estudo, o número de fascículos variou de dois a três até sua inserção no músculo do lábio inferior. Contudo, os resultados obtidos no estudo histológico quantitativo (quantidade de axônios, densidade axonal e diâmetro axonal) do grupo normal não apresentou diferença entre os resultados descritos anteriormente por Mattox e Felix (1987) e Costa et al. (2012a, b), mostrando que o ramo mandibular do nervo facial de ratos *Wistar* apresenta pouca variância entre os lados e/ou animais além de uma maior semelhança com o nervo facial de humanos que o tronco do nervo facial, constituindo assim um bom modelo de estudo histológico quantitativo e qualitativo da regeneração neural do nervo facial.

Quanto os segmentos proximais, o presente estudo revelou que não houve diferença significativa nos valores da quantidade, densidade e diâmetro axonal entre os grupos que receberam CMEM (C e D) e o nervo normal (grupo N), enquanto que os grupos que não receberam essas células (A e B) apresentaram diâmetros axonais menores em relação ao grupo normal, evidenciando que as CMEMi e CMEMd atuam também no segmento proximal.

Nos grupos em que não foram usadas as CMEM (A e B) a quantidade de axônios e a densidade axonal do segmento distal mostraram-se iguais às

do grupo D e menores que as do grupo C, porém, não houve diferença entre os grupos C e D, cujos resultados são semelhantes aos descritos por Wang et al. (2011). Curiosamente, Sun et al. (2011a) em seu primeiro trabalho, referem que a densidade axonal do grupo que recebeu as células- tronco derivadas do tecido adiposo foi maior que a do grupo normal, mostrando assim que essas células, associadas a um condúite de artéria descelularizada, promoveram um crescimento excessivo de fibras mielinizadas, resultado este que difere do que foi aqui descrito, uma vez que todos os grupos apresentaram valores das variáveis quantitativas do segmento distal piores que o nervo normal. No entanto, em seu segundo trabalho, Sun et al. (2001b) descrevem que a densidade axonal do grupo que recebeu células- tronco derivadas do tecido adiposo transdiferenciadas foi maior que a dos outros grupos, incluído as células indiferenciadas e o nervo normal, porém não descrevem se houve ou não um crescimento excessivo de fibras axonais do grupo que recebeu as células-tronco indiferenciadas em relação ao nervo normal. Cho et al. (2010) relatam que os grupos que utilizaram apenas plasma rico em plaquetas ou CMEM não obtiveram diferença no número de axônios e somente quando associados mostraram resultados melhores na densidade de axônios. Costa et al. (2012) citam que o grupo que recebeu CMEMd obteve resultados melhores quanto a quantidade de axônios e densidade axonal em relação ao grupo recebeu as CMEMi, referindo ainda que grupo de CMEMd não apresentou diferença estatisticamente significativa para o nervo normal.

No presente estudo as CMEM influenciaram nos diâmetros axonais apenas nos segmentos proximais, uma vez que os resultados obtidos nesse segmento, nos grupos C e D, não exibiram diferença em relação ao grupo N, enquanto os grupos A e B mostraram diâmetros estatisticamente menores que os do nervo normal. Além disso, no segmento distal, não houve diferença do diâmetro axonal entre os grupos operados, apenas quando comparados ao nervo normal ($p < 0,001$) contrariando os resultados descritos por Sun et al. (2001b) , Wang et. al (2011) e Costa et al. (2012) em cujos resultados o diâmetro das fibras mielinizadas das células diferenciadas foram maiores que as indiferenciadas.

Segundo Ochi et al. (1995), os resultados obtidos com os métodos histológicos de avaliação da regeneração neural, sejam eles quantitativos, qualitativos ou a associação desses, devem ser analisados com prudência, pois o aumento do tamanho e da quantidade de axônios pode não corresponder a uma melhora funcional. Esses autores ainda exemplificam: espécies com muitos axônios mielinizados, porém pequenos e espécies com poucos axônios mielinizados, porém largos, parecem similares quanto à regeneração. Grosheva et al. (2008) vão além disso, e ressaltam que a quantidade, a densidade e o diâmetro axonal de nada importa se o crescimento axonal não for direcionado corretamente à placa-alvo. Esses fatos podem ser comprovados nos resultados descritos por Sun et al. (2001a, b) nos quais os grupos que receberam células-tronco derivadas de tecido adiposo, associados a conduítes de artérias descelularizada, apresentaram um crescimento excessivo de axônios, porém não houve uma

melhora funcional, pois estes axônios causaram uma poliinervação errônea. Os resultados obtidos no presente estudo também remetem à difícil correlação entre a melhora funcional e a melhora histológica uma vez que no grupo C houve aumento da amplitude e durações dos PAMCs acompanhado do aumento da quantidade de axônios e da densidade axonal, enquanto que no grupo D houve uma melhora funcional, com aumento da amplitude, porém sem correspondência histológica nenhuma.

Um dado interessante, aqui observado, é em relação ao diâmetro dos axônios. Defendido ferozmente por alguns autores como Donovan (1967), Williams e Wendell-Smith (1971), May et al. (2002), Costa et al. (2012), os resultados aqui obtidos demonstraram que o diâmetro das fibras mielinizadas não interferiu na recuperação funcional, diferente da quantidade e densidade axonal, que de certo modo, mostrou uma correlação, pelo menos no grupo C.

Considerações finais

As melhoras funcionais e histológicas na regeneração do ramo mandibular de ratos Wistar nos grupos nos quais foram inseridas células multipotentes do estroma mesenquimal em comparação com os grupos nos quais não foram inseridas essas células mostraram que as mesmas realmente auxiliam na regeneração neural, podendo vir a tornar-se uma opção para o tratamento de lesões graves do nervo facial.

É opinião da autora que a melhora funcional não depende apenas da melhora histológica, mas sim de outros fatores como os descritos por Grosheva et al. (2008) entre outros, ainda desconhecidos ou pouco estudados.

7 CONCLUSÕES

1. As células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas e diferenciadas *in vitro* que apresentam fenótipo de células de Schwann beneficiaram a regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos Wistar.

2. As células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas mostraram resultados funcionais e histológicos melhores que as células multipotentes do estroma mesenquimal diferenciadas *in vitro* que apresentam fenótipo de células de Schwann na regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos *Wistar*.

3. As padronizações do modelo de avaliação funcional da regeneração neural do ramo mandibular do nervo facial de ratos *Wistar* e da histologia (quantitativa e qualitativa) desse mesmo ramo criaram um novo modelo experimental para o estudo da regeneração do nervo facial.

ANEXO A

MASSA CORPORAL DOS ANIMAS POR GRUPO

Tabela A - Descrição, por grupo e por animal, dos valores da massa corporal inicial, final, suas variações e médias.

RATO	PESO											
	Grupo A			Grupo B			Grupo C			Grupo D		
	Inicial (g)	Final (g)	Variação (%)	Inicial (g)	Final (g)	Variação (%)	Inicial (g)	Final (g)	Variação (%)	Inicial (g)	Final (g)	Variação (%)
1	266,2	309,4	16,2	296,4	347,9	17,3	254,7	301,2	18,3	277,1	313,8	13,2
2	291,4	341,2	17	289,3	325,6	12,5	263,9	336,7	27,6	283,4	341,9	20,6
3	252,3	301,5	19,5	258,8	312,2	20,6	269,7	333,4	23,6	279,4	325,3	16,4
4	278,1	330	18,6	255,4	300,3	17,5	266,4	312	17,1	296,1	†	†
5	292,3	340,8	16,5	253,9	312,1	22,9	295	†	†	253,2	309,6	22,3
6	263,2	322,6	22,5	289,2	340,2	17,6	279,1	†	†	288,9	348,3	20,6
7	255,8	301,7	17,9	255,1	315,6	23,7	278,3	329,6	18,4	263,5	319,4	21,2
8	258,5	314,2	21,5	253,2	†	†	265,7	319,2	27,7	256,1	302,2	18,0
9	287,4	329,7	14,7	289,9	338,7	16,8	276,3	340,2	23,1	287,9	344,2	19,6
10	291,1	—	—	292,1	340,1	16,4	270,3	325,6	27,9	263,1	†	†
11	282,5	—	—	268,7	309,3	15,1	293,2	339,9	15,9	261,1	301,7	15,5
12	277	†	†	274,3	310,3	13,1	246,2	—	—	276,6	326,9	18,2
Média	274,6	321,2	18,2	273	322,9	17,6	271,5	326,4	22,2	273,8	323,3	18,6

— Animais descartados

† Animais mortos

INCIDÊNCIA DE MORTES

Tabela B - Quantidade e incidência de mortes, por período, em cada grupo.

Grupos	MORTES					Incidência
	Periodo				TOTAL	
	Pré-operatório	3 ^a Semana	6 ^a Semana	TOTAL		
A	1	0	0	1	8,30%	
B	1	0	0	1	8,30%	
C	0	2	0	2	16,60%	
D	1	0	1	2	16,60%	
TOTAL	3	2	1	6	12,50%	

ANEXO B

VALORES ABSOLUTOS DOS PAMCs NO PRÉ-OPERATÓRIO

Tabela C - Valores absolutos das variáveis intensidade de estímulo, amplitude, latência e duração dos PAMCs obtidos no pré-operatório.

Grupo	Variável	Lado	PRÉ-OPERATÓRIO											
			Ratos											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amplitude (mV)	Direito	6,34	6,57	3,87	6,6	7,05	3,6	4,28	8,68	5,2	—	—	†
		Esquerdo	6,04	7,79	3,59	4,08	3,49	6,22	7,21	6,98	6,02	—	—	†
	Latência (ms)	Direito	1,09	1,1	1,5	1,3	1,2	1,1	1,16	1,3	0,8	—	—	†
		Esquerdo	1,02	1	1,3	1,3	1,3	1,1	1,1	1,1	1	—	—	†
	Duração (ms)	Direito	3,12	3,19	4,45	6,19	4,28	4,14	3,47	6,52	5,02	—	—	†
		Esquerdo	3,39	5,48	4,02	3,36	4,21	5,96	4,5	4,37	4,55	—	—	†
	Estímulo (mA)	Direito	2,9	2	2,2	2,5	3	2,7	2	2	3	—	—	†
		Esquerdo	2,5	2	2	2,8	3	2,2	3	2	2,5	—	—	†
B	Amplitude (mV)	Direito	4,45	2,52	7,5	5,31	4,8	6,03	7,1	†	6,84	3,61	8,4	6,98
		Esquerdo	5,18	8,1	1,59	3,4	4,76	5,9	6,92	†	8,92	4,29	7,3	6,51
	Latência (ms)	Direito	1,06	0,8	1,48	1,16	0,9	1,3	1,2	†	1	1,48	1,4	1,13
		Esquerdo	1,16	1	1,2	1,16	1	1,1	1	†	1,3	1,2	1,3	1,07
	Duração (ms)	Direito	4,82	5,66	3,02	2,7	5,61	4,82	4,95	†	3,76	5,13	3,2	5,66
		Esquerdo	3,92	4,66	4,37	4,51	5,87	4,1	3,44	†	5,24	3,33	4,38	4,87
	Estímulo (mA)	Direito	2	2	2,6	2,5	3	2,5	2,7	†	3	2	2	3
		Esquerdo	2	2,5	2,5	2	3	3	2	†	3	2	2,9	2
C	Amplitude (mV)	Direito	5,8	4,3	9,95	6,15	5,95	6,04	5,28	10,67	3,29	2,55	4,3	—
		Esquerdo	2,1	3,82	7,63	7,77	7,63	5,94	3,34	7,12	4,82	4,7	9,08	—
	Latência (ms)	Direito	1,33	2,05	1,3	1,23	1,3	1,38	1,14	1,06	1,35	1,5	1,1	—
		Esquerdo	2,66	1,19	1,38	0,82	1,38	1,28	1,1	1,25	1,5	1,5	1,05	—
	Duração (ms)	Direito	3,97	4,3	4,78	5,79	5,02	4,96	2,06	4,47	4,78	4,05	4,58	—
		Esquerdo	3,11	3,7	4,29	4,48	4,03	4,53	3,95	5,6	4,22	5,1	6,08	—
	Estímulo (mA)	Direito	3	1,7	2	2,7	2,3	2,1	2,4	2	2,5	2,6	2,8	—
		Esquerdo	1,5	1,5	2,5	2,4	2,5	2	2,6	2,4	1,9	2,9	2,9	—
D	Amplitude (mV)	Direito	5,57	7,42	5,75	†	4,32	3,69	4,28	4,9	8,5	8,46	6,17	4,6
		Esquerdo	4,83	5,71	6,88	†	6,18	2,5	6,3	6,6	8,17	5,88	7,91	2,9
	Latência (ms)	Direito	1,35	0,58	0,7	†	1,64	0,87	0,85	1,22	1,03	0,74	1,19	0,85
		Esquerdo	0,85	1,06	0,6	†	1,08	0,83	1,68	1,08	1,03	0,82	1,2	1,1
	Duração (ms)	Direito	3,78	3,55	5,51	†	4,18	6,83	2,93	3,84	3,07	4,26	5,08	5,82
		Esquerdo	2,62	4,76	4,07	†	4,55	3,84	3,98	4,33	3,25	5,97	5,77	4,73
	Estímulo (mA)	Direito	2	2	3	†	3	2,5	3	4	3	3	3	4
		Esquerdo	2	2	3	†	3	2,5	3	3	2	3	2	4

— Animais descartados
† Animais mortos

ANEXO C

VALORES ABSOLUTOS DOS PAMCs DO LADO DIREITO NA TERCEIRA SEMANA DO PÓS-OPERATORIO

Tabela D - Valores absolutos das variáveis de amplitude, latência e duração dos PAMCs obtidos do lado direito, na terceira semana do pós-operatório.

Grupo	Variável	3ª SEMANA											
		Ratos											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amplitude (mV)	0,24	0,3	0,16	0,13	0,18	0,12	0,89	0,22	1,39	—	—	†
	Latência (ms)	1,64	9,1	8,1	8,8	2,96	7,13	4,67	6,6	2,3	—	—	†
	Duração (ms)	13,01	18,6	10,24	11,8	12,41	16,5	17,1	14,1	11,99	—	—	†
B	Amplitude (mV)	1,76	0,14	0,03	0,38	0,79	0,38	0,2	†	0,38	0,05	0,05	0,26
	Latência (ms)	0,76	3,8	11,2	4,54	2,3	9,69	7,8	†	4,02	8,18	4,32	6,83
	Duração (ms)	14,2	9,71	18,7	15,8	12,4	14,3	14,93	†	14,1	12,73	12,9	13,92
C	Amplitude (mV)	0,33	0,19	0,1	0,45	†	†	0,53	0,02	0,42	0,15	0,3	—
	Latência (ms)	4,33	5,11	10,9	3,23	†	†	5,1	5,12	2,86	5,2	6,44	—
	Duração (ms)	9,27	9,79	11,35	10,6	†	†	9,52	13,68	12,4	8,7	10,2	—
D	Amplitude (mV)	0,65	0,11	0,19	†	0,35	0,41	0,08	0,2	0,13	0,2	0,26	0,04
	Latência (ms)	1,93	11,2	10,1	†	11	2,1	2,3	11,7	2,1	7,3	2,1	9,7
	Duração (ms)	15,8	13	14,2	†	16,7	7,8	12,3	13,03	16,8	11,9	14,13	10,7

— Animais descartados
 † Animais mortos

ANEXO D

VALORES ABSOLUTOS DOS PAMCs DO LADO DIREITO NA SEXTA SEMANA DO PÓS-OPERATORIO

Tabela E - Valores absolutos das variáveis de amplitude, latência e duração dos PAMCs obtidos do lado direito, na sexta semana do pós-operatório.

Grupo	Variável	6ª SEMANA											
		Ratos											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amplitude (mV)	0,37	0,5	0,37	0,6	0,35	0,96	0,37	0,47	1,93	—	—	†
	Latência (ms)	2,63	1,67	2,89	9	2,5	3,6	1,4	3,1	2,09	—	—	†
	Duração (ms)	13,78	8,51	14,5	11,7	10	11,82	11,9	12,3	12,42	—	—	†
B	Amplitude (mV)	0,6	0,22	0,66	0,68	1,86	0,53	0,78	†	0,4	0,33	0,91	0,28
	Latência (ms)	4,7	7,12	5,32	1,8	2,15	1,96	2,65	†	1,9	2,65	2,22	2,75
	Duração (ms)	12,4	8,83	16,2	14,2	9,74	9,35	13,9	†	10,9	8,25	13,16	14,7
C	Amplitude (mV)	3,61	2,58	1,76	1,26	†	†	1,9	1,66	2,59	1,58	1,66	—
	Latência (ms)	2,1	2,28	2,7	2,1	†	†	2,7	2,33	2,1	1,72	2,1	—
	Duração (ms)	6,6	6,09	7,43	5,99	†	†	5,87	5,77	7,4	5,32	8,11	—
D	Amplitude (mV)	2,32	1,76	2,09	†	1,59	1,33	1,57	1,46	1,33	†	3,49	1,6
	Latência (ms)	1,63	2,83	1,76	†	1,72	2,35	2,06	1,7	2,67	†	1,83	2,89
	Duração (ms)	8,92	11,8	9,37	†	8,76	8,6	9,13	9,54	9,07	†	9,74	9,22

— Animais descartados

† Animais mortos

ANEXO E

VALORES HISTOLÓGICOS ABSOLUTOS DOS GRUPOS ESTUDADOS

Tabela F - Valores absolutos da quantidade de axônios, diâmetro e densidade axonal dos grupos estudados.

Grupo	Variável	Segmento	Ratos											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Número de axônios	Proximal	1267	1493	1251	1347	2063	1555	1381	1241	2046	—	—	†
		Distal	500	337	411	534	602	382	324	423	485	—	—	†
	Diâmetro axonal (µm)	Proximal	2,27	2,99	3,17	3,45	3	2,93	2,9	3,55	3,62	—	—	†
		Distal	2,26	2,66	2,31	2,42	2,63	2,7	3,03	3,39	3,6	—	—	†
	Densidade (axônio/µm)	Proximal	0,14	0,165	0,14	0,15	0,23	0,17	0,15	0,14	0,23	—	—	†
		Distal	0,05	0,04	0,04	0,06	0,07	0,04	0,03	0,05	0,05	—	—	†
B	Número de axônios	Proximal	1369	1416	1633	1493	2123	1326	1259	†	1546	1721	1462	1339
		Distal	160	620	205	178	610	776	444	†	431	265	D	761
	Diâmetro axonal (µm)	Proximal	3,93	3,19	3,13	3,3	3,46	3	2,92	†	3,45	2,54	2,4	2,67
		Distal	3,84	3,05	2,53	2,7	2,54	2,43	2,5	†	2,85	2,85	D	2,5
	Densidade (axônio/µm)	Proximal	0,15	0,16	0,18	0,16	0,24	0,16	0,14	†	0,17	0,19	0,16	0,15
		Distal	0,02	0,07	0,02	0,02	0,07	0,09	0,05	†	0,05	0,03	D	0,08
C	Número de axônios	Proximal	1974	1387	1182	1354	†	†	1381	1355	2205	2325	1356	—
		Distal	1069	1083	1054	971	†	†	1025	489	786	1832	907	—
	Diâmetro axonal (µm)	Proximal	5,59	4,44	3,46	3,4	†	†	3,9	3,38	3,27	4	3,6	—
		Distal	3,66	3,77	3,17	2,87	†	†	3,16	3,13	3,19	2,99	3,01	—
	Densidade (axônio/µm)	Proximal	0,22	0,15	0,13	0,15	†	†	0,15	0,15	0,24	0,26	0,15	—
		Distal	0,12	0,12	0,18	0,11	†	†	0,11	0,05	0,09	0,2	0,1	—
D	Número de axônios	Proximal	‡	2162	‡	†	1514	1626	1810	1811	1629	†	‡	1293
		Distal	‡	1507	‡	†	1408	1434	539	372	903	†	‡	758
	Diâmetro axonal (µm)	Proximal	‡	4,58	‡	†	4,03	2,45	3,81	2,49	2,51	†	‡	3,63
		Distal	‡	3,68	‡	†	3,62	2,31	2,47	2,37	2,34	†	‡	2,63
	Densidade (axônio/µm)	Proximal	‡	0,24	‡	†	0,19	0,18	0,2	0,2	0,19	†	‡	0,14
		Distal	‡	0,17	‡	†	0,16	0,15	0,06	0,04	0,1	†	‡	0,08
N	Número de axônios	Proximal	1847	1614	1648	1758	1583	1716	1661	1581	1678	1738	1336	1784
		Distal	1650	1722	1789	1602	1700	1720	1598	1606	1518	1789	1382	1676
	Diâmetro axonal (µm)	Proximal	4,35	5,01	4,75	4,46	4,3	4,39	4,19	4,48	4,54	4,5	4,47	4,52
		Distal	5,06	4,58	4,76	4,45	4,46	4,62	4,26	4,09	4,16	4,6	4,32	4,56
	Densidade (axônio/µm)	Proximal	0,2	0,18	0,18	0,2	0,17	0,19	0,18	0,17	0,19	0,19	0,15	0,2
		Distal	0,18	0,19	0,2	0,18	0,19	0,19	0,18	0,18	0,17	0,2	0,15	0,19

— Animais descartados

† Animais mortos

‡ Segmentos perdidos/descartados

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- Abe K, Namikawa K, Honma M, Iwata T, Matsuoka I, Watabe K, Kiyama H. Inhibition of Ras extracellular-signal-regulated kinase (ERK) mediated signaling promotes ciliary neurotrophic factor (CNTF) expression in Schwann cells. *J Neurochem.* 2001;77(2):700-3.
- Abercrombie M, Johnson ML. Collagen content of rabbit sciatic nerve during Wallerian degeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1946;9(4):113-8.
- Agius E, Cochard P. Comparison of neurite outgrowth induced by intact and injured sciatic nerves: a confocal and functional analysis. *J Neurosci.* 1998;18(1):328-38.
- Aldskogius H, Barron KD, Regal R. Axon reaction in dorsal motor vagal and hypoglossal neurons of the adult rat. Light microscopy and RNA-cytochemistry. *J Comp Neurol.* 1980;193:165-77.
- Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102:17734-8.
- Angelov DN, Ceynowa M, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Grosheva M, Kiryakova SI, Skouras E, Maegele M, Irintchev A, Neiss WF, Sinis N, Alvanou A, Dunlop SA. Mechanical stimulation of paralyzed vibrissal muscles following facial nerve injury in adult rat promotes full recovery of whisking. *Neurobiol Dis.* 2007;26:229-42.
- Aquino JB, Hjerling-Leffler J, Koltzenburg M, Edlund T, Villar MJ, Ernfors O. *In vitro* and *in vivo* differentiation of boundary cap neural crest stem cells into mature Schwann cells. *Exp. Neurol.* 2006;198:438-49.

¹ Esta tese está de acordo com as normas em vigor no momento desta publicação seguintes:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

- Arroyo EJ, Bermingham JR, Rosenfeld MG, Scherer SS. Promyelinating Schwann cells express Tst-1/SCIP/Oct-6. *J. Neurosci.* 1998;18:7891-902.
- Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats – similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:3908-13.
- Barcelos AC, Rodrigues MD, Silva CR, Padovani. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. *Microsurgery.* 2003;23:66-71.
- Barras FM, Kuntzer T, Zurn AD, Pasche P. Local delivery of glial cell line derived neurotrophic factor improves facial nerve regeneration after late repair. *Laryngoscope.* 2009;119:846-55.
- Barrs DM, Brackmann DE, Hitselberger WE. Facial nerve anastomosis in the cerebellopontine angle: a review of 24 cases. *Am J Otol.* 1984;5:269-72.
- Barrs DM. Facial nerve trauma: optimal timing for repair. *Laryngoscope.* 1991;101(8):835-48.
- Battiston B, Geuna S, Ferrero M, Tos P. Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurg.* 2005;25:258-67.
- Bento RF. *Contribuição para o estudo da anastomose do nervo facial. Comparação entre o adesivo tecidual fibrínico e a sutura epineural. Estudo em gatos.* São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1988.
- Bento RF, Miniti A. Anastomosis of the intratemporal facial nerve using fibrin tissue adhesive. *Ear Nose Throat J.* 1993;72(10):663.
- Bento RF, Miniti A. Comparison between fibrin tissue adhesive, epineural suture and natural union in the intratemporal facial nerve of cats. *Acta Otolaryngol.* 1989;465 Supplement 1:1-36.
- Bento RF, Miniti A, Ramos CC. Iatrogenic facial paralysis. *Folha méd.* 1998;97:333-7.
- Bento RF, Miniti A, Ruocco JR. Traumatic peripheral facial palsy. In: Portmann M. *Facial Nerve.* Paris, 1985. p.299-303.

- Bento RF, Salomone R, Brito Neto R, Tsuji RK, Hausen M. Partial Lesions of the Intratemporal segment of the facial nerve. Graft or Partial Reconstruction? *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2008;117(9):665-9.
- Bento RF, Vellutini EAS, Marshese T, Pahl FH, Navarro H, Miniti A. Topodiagnóstico na paralisia facial periférica. *Arq Neuropsiquiatr*. 1982;43:275-80.
- Beresford JN. Stem cell and the stromal system of bone marrow. *Clin Orthop Relat Res*. 1989;240:270-18.
- Bhatheja K, Field J. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int. J Biochem. Cell Biol*. 2006; 38(12):1995–9.
- Blanchard AD, Sinanan A, Parmantier E, Zwart R, Broos L, Meijer D, Meier C, Jessen KR, Mirsky R. (SCIP/Tst-1) is expressed in Schwann cell precursors, embryonic Schwann cells, and postnatal myelinating Schwann cells: Comparison with Oct-1, Krox-20, and Pax-3. *J. Neurosci. Res*. 1996;46:630-40.
- Bolin LM, Shooter EM. Neurons regulate Schwann cell genes by diffusible molecules. *J Cell Biol*. 1993;123:237-43.
- Borin A, Toledo RN, Faria SD, Testa JR, Cruz OL. Behavioral and histologic experimental model of facial nerve regeneration in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006;72:775-84.
- Boyd JB, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol. Neurobiol*. 2003;27:277-324.
- Brasil. Lei nº 9.605 de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 1998 13 fev; Seção I:01
- Bunelli G. *Microchirurgia del sistema nervoso periferico*. Brescia: Fondazione Pelizza; 1978.
- Bunge MB. Transplantation of purified populations of Schwann cells into lesioned adult rat spinal cord. *J Neurol*. 1994;242:36-9.
- Bunge RP. Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, tropism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 1993;3:805-9.

- Bunke HJ, Mclean DH. The advantage of a straight needle in microsurgery. *Plastic Reconstru Surg.* 1971;47:602-3.
- Burt AM. *Neuroanatomia.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1995.
- Buttermeyer R, Rao U, Jones NF. Peripheral nerve allograft transplantation with FK 506 functional, histological and immunological results before and after descintuation of immunosuppression. *Annals of Plastic Surgery.* 1995;35:396-401.
- Byrne PJ, Stuart M, Fakhry C, Lehar M, Flint PE. An electrophysiologic model for functional assessment of effects of neurotrophic factors on facial nerve reinnervation. *Arch Facial Plastic Surg.* 2005;7(2):114-8.
- Caddick J, Kingham PJ, Gardiner NJ, Wiberg M, Terenghi G. Phenotypic and functional characteristics of mesenchymal stem cells differentiated along Schwann cell lineage. *Glia.* 2006;54:840-9.
- Caylan R, Bektas D, Dikmen T, Bektas O, Omay SB, Ovali E. Mesenchymal stem cells in iatrogenic facial nerve paralysis: a possible role in the future. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2006;263(10):963-7.
- Campbell JB, Luzio J. Facial nerve repair. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1964;68:1068-75.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9:641-50.
- Chen S, Bisby M. Long-term consequences of impaired regeneration on facial motoneurons in the C57BL/Ola mouse. *J Comp Neurol.* 1993;335:576-85.
- Chen S, Velardez MO, Warot X, Yu ZX, Miller SJ, Cros D, Corfas G. Neuregulin 1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function. *J Neurosci.* 2006a;26:3079-86.
- Chen X, Wang XD, Chen G, Lin WW, Yao J, Gu XS. Study of in vivo differentiation of rat bone marrow stromal cells into Schwann cell-Like cells. *Microsurgery.* 2006b;26:111-5.
- Chernousov MA, Carey DJ. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histol Histopathol.* 2000;15:593-601.
- Chiu DTW, Janecka I, Krizek TJ. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery.* 1982;91:226-33.

- Cho HH, Jang S, Lee SC, Jeong HS, Park JS, Han JY, Lee KH, Cho YB. Effect of neural-induced mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on facial nerve regeneration in an acute nerve Injury model. *Laryngoscope*. 2010;120(5):907-13.
- Cho HH, Jeong HS, Jang SJ, Jeong HS, Park JS. Neural differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow of human mastoid process. *Korean J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2008;51:422-8.
- Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97:3213-8.
- Cosgaya JM, Chan JR, Shooter EM. The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science*. 2002;298(5596):1245-8.
- Costa HJZR, Bento RF, Salomone S, Azzi-Nogueira D, Zanatta DB, Costa MP, Silva CF, Strauss B, Haddad LA. Schwann-like cells associated with polyglycolic acid conduit and autologous grafting improve regeneration of the facial nerve. (enviado para publicação). 2012.
- Costa HJZR, Salomone S, Silva CF, Costa MP, Ramos MBLR, Bento RF. Quantitative histological analysis of the mandibular branch of the facial nerve in rats. *Acta Cirurgica Bras*. 2012 (nov); 11 (*in print*)
- Costa, HJZR. *Estudo experimental sobre a regeneração pós-traumática do nervo facial em coelhos*. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2003.
- Crumley RL. Crumley, Interfascicular nerve repair—is it applicable in facial nerve injuries? *Arch Otolaryngol*. 1980;106(6):313-6.
- Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, Garcia-Gomez I, Cuevas B, Gonzalez-Corrochano R, Diaz-Gonzalez D, Reimers D. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res*. 2002;24:634-8.
- Cuevas P, Carceller F, Garcia-Gomez I, Yan M, Dujovny M. Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. *Neurol Res*. 2004;26:230-2.
- Cui L, Jiang J, Wei L, Zhou X, Fraser JL, Snider BJ, Yu SP. Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in rats. *Stem Cells*. 2008;26:1356–65.

- Cui Q. Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration. *Mol Neurobiol*. 2006;33:155-79.
- Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D. Stem cells treatment for sciatic nerve injury. *Expert Opin Biol Ther*. 2011;11(12):1591-7.
- De Medinaceli L, Seaber AV. Experimental nerve reconstruction: importance of initial repair. *Microsurgery*. 1989;10:56-70.
- Dedkov EI, Kostrominova TY, Borisov AV, Carlson BM. Survival of Schwann cells in chronically denervated skeletal muscles. *Acta Neuropathol*. 2002;103:565-74.
- Dermietzel R, Spray DC. Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci*. 1993;16:186-92.
- Dezawa M. Central and peripheral nerve regeneration by transplantation of Schwann cells and transdifferentiated bone marrow stromal cells. *Anatomical Science International*. 2002;77:12–25.
- Dezawa M. Insights into autotransplantation: the unexpected discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Dec;63(23):2764-72.
- Dezawa M, Ishikawa H, Hoshino M, Itokazu Y, Nabeshima Y. Potential of bone marrow stromal cells in applications for neuro-degenerative, neuro-traumatic and muscle degenerative diseases. *Curr Neuropharmacol*. 2005 Oct;3(4):257-66.
- Dezawa M, Adachi-Usami E. Role of Schwann cells in retinal ganglion cell axon regeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2000;19:171-204.
- Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N, Yamada H, Sawada H, Ishikawa H, Mimura T, Kitada M, Suzuki Y, Ide C. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*. 2004;12:1701-10.
- Dezawa M, Mutoh T, Dezawa A, Adachi-Usami E. Putative gap junctional communication between axon and regenerating Schwann cells during mammalian peripheral nerve regeneration. *Neuroscience*. 1998;85:663-7.
- Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur. J. Neurosci*. 2001;14:1771-6.

- Diani AR, Davis DE, Fix JD, Swartzman J, Gerritsen GC. Morphometric analysis of autonomic neuropathology in the abdominal sympathetic trunk of the ketonuric diabetic chinese hamster. *Acta neuropathol.* 1981;53:293-8.
- Dohm S, Streppel M, Guntinas-Lichius O, Pesheva P, Probstmeier R, Walther M, Neiss WF, Stennert E, Angelov DN. Local application of extracellular matrix proteins fail to reduce the number of axonal branches after varying reconstructive surgery on rat facial nerve. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2010; 16:117–26.
- Dombrowski MA, Sasaki M, Lankford KL, Kocsis JD, Radtke C. Myelination and nodal formation of regenerated peripheral nerve fibers following transplantation of acutely prepared olfactory ensheathing cells. *Brain Res.* 2006;1125:1-8.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
- Donaldson HH. *The rat: data and reference tables for the albino rat (Mus norvegicus albinus) and the Norway rat (Mus norvegicus)*. Philadelphia. 1924.
- Donovan A. The nerve fibre composition of the cat optic nerve. *J Anatomy.* 1967;101:1-11.
- Dong M, Yi T. Stem Cell and Peripheral Nerve Injury and Repair. *Facial Plastic Surgery.* 2010;26(5):421-7.
- Doolabh VB, Hertl MC, Mackinnon SE. The role of conduits in nerve repair: a review. *Rev. Neurosci.* 1996;7:47-84.
- Dörfel J. The musculature of the mystacial vibrissae of the white mouse. *J. Anat.* 1982;135:147-54.
- Dubey N, Letourneau PC, Tranquillo RT. Guided neurite elongation and Schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 1999;158:338-50.
- Ducker TB, Hayes GJ. Experimental improvement as in the use of silastic cuff for peripheral nerve repair. *J. Neurosurg.* 1968;28(6):582-7.

- Duncan D. A relation between axone diameter and myelination determined by measurement of myelinated spinal root fibres. *Journal of Comparative Neurology*. 1934;60:437-71.
- Esslen, E. Eletromyography and eletroneurography. In :Fisch U. *Facial nerve surgery*. Birmingh: Aesculapius Publishing;1977. P.93-100.
- Evans GR. Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol*. 2000;19:312-8.
- Fang Y, Mo X, Guo W, Zhang M, Zhang P, Wang Y, Rong X, Tian J, Sun X. A new type of Schwann cell graft transplantation to promote optic nerve regeneration in adult rats. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010;4:581-9.
- Fansa H, Keilhoff G, Plogmeier K, Frerichs O, Wolf G, Schneider W. Successful implantation of Schwann cells in acellular muscle. *J. Reconstr*. 1999;15:61-5.
- Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 1990;13:43-60.
- Fernand VS, Young JZ. The sizes of the nerve fibres of muscle nerves. *Proc Royal Soc*. 1951;139:38-58.
- Ferreira MC, Besteiro JM, Tuma P. Results of reconstruction of the facial nerve. *Microsurgery*. 1994;15:5-8.
- Ferri C, Moore F, Bisby M. Effects of facial nerve injury on mouse potoneurons lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 1998;34:1-9.
- Fields RD, Beau JML, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Progress in Neurobiology*. 1989;33:87-134.
- Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutiérrez-Espíndola G, Pérez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stemcells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk Res*. 2005;29:215-24.
- Fontes FS, Bento RF, Tsuji RK, Castilho AM, Neto RVB. Paralisia facial periférica bilateral em pacientes com HIV. *Arq Otorrinolaringol*. 2005;9:229-33.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393-403.

- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá, EA, Ruadkow IA. "Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method". *Experimental hematology*. 1974;2(2):83-92.
- Friedenstein, AJ; Gorskaja, JF; Kulagina, NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hemat*. 1976;4(5):267-74.
- Gantz B, Holliday M, Gmuer AA, Fisch U. Eletroneurographic evaluation of the facial nerve. Method and technical problems. *Ann Otol Laryngol*. 1984;93:394-8.
- Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurol*. 2000;61:267-304.
- Gheorghe M. Constantine. Comparative Anatomy of the Mouse and the Rat, American Association for Laboratory Animal Science: Memphis, Tennessee. (AALAS), 2011, 261 pp.
- Gimble JM, Guilak F, Nuttall ME, Sathishkumar S, Vidal M, Bunnell BA. In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother*. 2008;35(3):228-238..
- Glück T. Ueber neroplastick auf dem wege der transplantation. *Arch. Klin. Chir*. 1880;25:606-16.
- Glück T. Ueber Transplantation, regeneration und entzündliche Neubildung. *Berliner Klinische Wochenschrift* 1881;18:554-557.
- Gnecchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol. Biol*. 2009;482:281-94.
- Gomillion CT, Burg KJ. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27:6052-63.
- Gondre M, Burrola P, Weinstein DE. Accelerated nerve regeneration mediated by Schwann cells expressing a mutant form of the POU protein SCIP. *J. Cell Biol*. 1998;141:493-501.
- Greene HEC. The anatomy of the rat. Eunice Chace Greene. *Hafner Pub*. 1955:370.

- Grosheva M, Guntinas-Lichius O, Angelova SK, Kuerten S, Alvanou A, Streppel M, Skouras E, Sinis N, Pavlov S, Angelov DN. Local stabilization of microtubule assembly improves recovery of facial nerve function after repair. *Exp Neurol*. 2008b;209:131-44.
- Grosheva O, Guntinas-Lichius SK, Arnhold S, Skouras E, Kuerten S, Streppel M, Angelova SK, Wewetzer K, Radtke C, Dunlop SA, Angelov DN. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation does not improve quality of muscle reinnervation or recovery of motor function after facial nerve transection in rats. *Biol Chem*. 2008a;389:873-88.
- Guenard V, Kleitman N, Morrissey TK, Bunge RP, Aebischer P. Syngenic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci*. 1992;12:3310-20.
- Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc*. 1977;111:219-23.
- 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;61:1276-83.
- Guntinas-Lichius O, Irintchev A, Streppel M, Lenzen Mithra, Grosheva M, Wewetzer K, Neiss WF, Angelov DN. Factors limiting motor recovery after nerve transection in rat: combined structural and functional analyses. *European Journal of Neuroscience*, vol 21 p. 391-402, 2005.
- Guntinas-Lichius O, Irintchev A, Streppel M, Lenzen Mithra, Grosheva M, Wewetzer K, Neiss WF, Angelov DN. Factors limiting motor recovery after nerve transection in rat: combined structural and functional analyses. *European Journal of Neuroscience*. 2005;21:391-402.
- Guo B, Dong M, Ren X. Research of guinea pig neural stem cells promoting facial nerve regeneration in rabbits. *J Zhengzhou Univ (Medical Science)*. 2006;41(3):445-8.
- Guo BF, Dong MM. Application of neural stem cells in tissue-engineered artificial nerve. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;140:159-64.
- 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.

- Hall S. Nerve repair: a neurobiologist's view. *Br J Hand Surg.* 2001;26:129-36.
- Hall S. The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg.* 2005;87-B(10):1309-19.
- Hall SM. The Schwann cell: a reappraisal of its role in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1978;4(3):165-76.
- Harrison DFN. Fiber size frequency in the recurrent laryngeal nerves of man and giraffe. *Acta Otolaryngol.* 1981;91:383-9.
- 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.
- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone.* 1992;13:69-80.
- Hebel R, Stromberg MW. *Anatomy of the laboratory rat.* Baltimore: Williams & Wilkins Co; 1976.
- Hess A, Rosner S. The satellite cell bud and myoblast in denervated mammalian muscle fibers. *Am J Anat.* 1970;129(1):21-39.
- Hirasawa Y, Marmor L. The protective effect of irradiation combined with sheathing methods on experimental nerve heterografts: Silastic, autogenous veins and heterogenous arteries. *J Neurosurg.* 1967;27:401-14.
- Hori J, Ng TF, Shatos M, Klassen H, Streilein JW, Young MJ. Neural progenitor cells lack immunogenicity and resist destruction as allografts. *Stem Cells.* 2003;21(4):405-16.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. International Society for Cellular Therapy Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.
- Hu Y, Leaver SG, Plant GW, Hendriks WT, Niclou SP, Verhaagen J, Harvey AR, Cui Q. Lentiviral-mediated transfer of CNTF to Schwann cells within reconstructed peripheral nerve grafts enhance adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration. *Mol Ther.* 2005;11:906-15.

- Huang YL, Ding M, Hansson HA. Dorsal root ganglion nerve cells transiently express increased immunoreactivity of the calcium-binding protein S-100 after sciatic transection. *Brain Res.* 1998;785:351-4.
- Hubbard JH. The quality of nerve regeneration: Factors independent of the most skillful repair. *Surg Clin North Am.* 1972;52:1099-108,
- Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996;25:101-21.
- Jackson CG, von Doersten PG. The facial nerve. Current trends in diagnosis, treatment, and rehabilitation. *Med Clin North Am.* 1999;83(1):179-95.
- Jaegle M, Ghazvini M, Mandemakers W, Piirsoo M, Driegen S, Levavasseur F, Raghoenath S, Grosveld F, Meijer D. The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important. 2003
- Jaegle M, Mandemakers W, Broos L, Zwart R, Karis A, Visser P, Grosveld F, Meijer D. The POU factor Oct-6 and Schwann cell differentiation. *Science.* 1996;273:507–510.
- Jan YN, Jan LN. Asymmetric cell division. *Nature.* 1998; 392:775-8.
- Jessen KR, Mirsky R. Developmental regulation in the Schwann cell lineage. *Adv Exp Med Biol.* 1999;468:3-12.
- Jensen PR, Gontang E, Mafnas C, Mincer TJ, Fenical W. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ. Microbiol.* 2005;7:1039-48.
- Joshi CV, Enver T. Plasticity revisited. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(6):749-55.
- Joyner CJ, Bennett A, Triffitt JT. Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation stage specific monoclonal antibodies. *Bone.* 1997;21:1-6.
- Kalat JW. *Biological Psychology.* 9th ed. USA (Belmont): Thompson Learning; 2007.
- Keilhoff G, Fansa H. Mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration - A real hope or just an empty promise? *Exp Neurol.* 2011;232:110-3.
- Keilhoff G, Goihl A, Stang F, Wolf G, Fansa H. Peripheral nerve tissue engineering: autologous Schwann cells vs. transdifferentiated mesenchymal *Stem Cells. Tissue Eng.* 2006;12:1451-65.

- Kerrebijn JDF, Freeman JL. Facial nerve reconstruction: outcome and features. *J Otolaryngol.* 1998;27:183-6.
- Kimura J, Rodnitzky RL, Okawara SH. Electrophysiologic analysis of aberrant regeneration after facial nerve paralysis. *Neurology.* 1975;25:989-93.
- 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(1):144-8.
- Klein BG, Rhoades RW. Representation of whisker follicle intrinsic musculature in the facial motor nucleus of the rat. *J Comp Neurol.* 1985;232:55-69.
- Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A. Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation.* 2001;68:235-44.
- Krekoski CA, Neubauer D, Zuo J, Muir D. Axonal regeneration into a cellular nerve grafts is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci.* 2001; 21:6206-13.
- Kreutzberg GW. Reaction of the neuronal cell body to axonal damage. In: Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK. *The axon.* Oxford University Press; 1995. p 355-74.
- Labelle JL, Allen DE. The peripheral nerve repair. A review. *J Maine Med Assoc.* 1972;63:164-6.
- Labrador RO, Buti M, Navarro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol.* 1988;149:243-52.
- Ladak A, Olson J, Tredget EE, Gordon T. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. *Exp. Neurol.* 2011;228(2):242-52.
- Le Beau JM, Powell HC, Ellisman MH. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. *J Neurocytol.* 1988;17:161-72.

- Lewin SL, Utley DS, Cheng ET, Verity AN, Terris DJ. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope*. 1997;107:992-999.
- Lin C, Jun J, Ling W, Xin Z, Fraser JL, Snider BJ, Yu SP. Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in rats. *Stem Cells*. 2008b;26:1356-65.
- Lin W, Chen X, Wang X, Liu J, Gu X. Adult rat bone marrow stromal cells differentiate into Schwann cell-like cells *in vitro*. *In vitro Cell.Dev.Biol. Animal*. 2008a;44:31-40.
- Liu L, Yang S, Han D, Huang D, Yang W. Primary tumours of the facial nerve: diagnostic and surgical treatment experience in Chinese PLA General Hospital. *Acta Otolaryngol*. 2007;127:993-9.
- Liverson JA, Dong MM. *Laboratory reference for clinical neurophysiology*. Philadelphia: FA. Davis Company; 1992.
- Lobsiger CS, Smith PM, Buchstaller J, Schweitzer B, Franklin RJM, Suter U, Taylor V. SpL201: A conditionally immortalized Schwann cell precursor line that generates myelin. *Glia* 2001;36:31-47.
- Lundborg G, Dahlin L, Danielsen N, Zhao Q. Trophism, tropism and specificity in nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg*. 1994;10:345-54.
- Lundborg G, Longo FM, Varon S. Nerve regeneration model and trophic factors in vitro. *Brain Res*, 1982;232:157-161.
- Lwanga SK, Lemeshow S. Sample size determination in health studies: a practical manual. Geneva, *World Health Organization*, 1991.
- Madduri S, Gander B. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration. *J Peripher Nerv Syst*. 2010;15(2)93-103.
- Mahanthappa NK, Anton ES, Matthew WD. Glial growth factor 2, a soluble neuregulin, directly increases Schwann cell motility and indirectly promotes neurite outgrowth. *J Neurosci*. 1996;6:4673-83.
- Mahay D, Terenghi G, Shawcross SG. Growth factors in mesenchymal stem cells following glial cell differentiation. *Biotechnol Appl Biochem*. 2008;51(4):167-76.

- Mandemakers W, Zwart R, Jaegle M, Walbeehm E, Visser P, Grosveld F, Meijer D. A distal Schwann cell-specific enhancer mediates axonal regulation of the Oct-6 transcription factor during peripheral nerve development and regeneration. *EMBO J.* 2000;19:2992–3003.
- Martini R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *Neurocytol.* 1994;23:1-28.
- Mattox DE, Felix H. Surgical anatomy of the rat facial nerve. *Am J Otol.* 1987;8(1):43-7.
- May M, Schaitkin BM. *The facial nerve.* 2nd ed New York: Thieme; 2000.
- Mayhew TM, Sharma AK. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J. Anat.* 1984b;139(1):59-66.
- Mayhew TM, Sharma AK. Sampling schemes for estimating nerve fibre size .I. Methods for nerve trunks of mixed fascicularity. *J. Anat.* 1984a; 139(1):45-58.
- Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Olivieri C, Pastore I, Marasso R, Madon E. Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2003;4:158-61.
- McCoy EG, Boyle WF. Reinnervation of the facial muscles following extratemporal facial nerve resection. *Laryngoscope.* 1971;81:1-7.
- McDonald DS, Zochodne DW. An injectable nerve regeneration chamber for studies of unstable soluble growth factors. *J Neurosci Methods.* 2003;122:171-8.
- McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med.* 1999;5:1410-2.
- McGovern FH. The return of function after damage to the facial nerve. *Eye Ear Nose Throat Mon.* 1970;49:451-4.
- McKennan KX, Chole RA. Facial paralysis in temporal bone trauma. *Am J Otol.* 1992;13:167-72.
- Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ (1982) An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol,* 1982;77:634-43.

- Meliga E, Strem BM, Duckers HJ, Serruys PW. Adipose-derived cells. *Cell Transplant*. 2007;16:963-70.
- Millesi H. Techniques for nerve grafting. *Hand Clin*. 2000;16(1):73-91, viii.
- Millesi H. Facial nerve suture. In: Fisch U- *Facial nerve surgery*. Birmingham: Aesculapius; 1977. p. 209-15.
- Millest H. Peripheral nerve repair: techniques and results. In: Gilbert A, Tubiana R. *Tendon, Nerve and Other Disorders*. New York, NY: Taylor and Francis; 2005. P.105–24.
- Miniti A, Gómez MVSG, Bento RF, Bogar P. Exercícios miofaciais e paralisia facial idiopática relato preliminar. *Rev Bras Otorrinol*. 1996;62:322-30.
- Miyamoto H. Miyamoto Introduction of axon packing density for histological quantitative assessment of peripheral nerve regeneration. *Hiroshima J Anesthesia*. 1985;21(1):3-17.
- Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E, Shenaq S. Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnon tube nerve conduit accossa 1-centimeter nerve gap. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105:660-3.
- Monuki, E. S., Weinmaster, G., Kuhn, R., and Lemke, G. (1989). SCIP:A glial POU domain gene regulated by cyclic AMP. *Neuron*. 1989;3:783-93.
- Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell*. 1999;96:737-49.
- Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G. Addition of fibronectin to alginate matrix improves peripheral nerve regeneration in tissue-engineered conduits. *Tissue Eng*. 2003;9:209-18.
- Muir D. The potentiation of peripheral nerve sheaths in regeneration and repair. *Exp. Neurol*. 2010;223(1):102-11.
- Muñoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, Woodbury D, Black IB. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J Neurosci*. 2004;24:4585-95.
- Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, Ochi M. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res*. 2003:17-24.

- Mushcler GF, Midura RJ. Connectivetissue progenitors: practical concept for a clinical application. *Clin Orthp Relat Res.* 2002;395:66-80.
- Myers RR, Heckman HM, Powell HC. Endoneurial fluid is hypertonic. Results of microanalysis and its significance in neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1983;42:217-24.
- National Research Council. *Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório.* 1ª ed. Goiânia: Nat Acad Press. 2003. (versão em português)
- Nishiura JB, Nilsson B, Kanje M, Dahlin LB. Addition of cultured Schwann cells to tendon autografts and freeze-thawed muscle grafts improves peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng.* 2004;10:157-64.
- Nissl F. Über die veränderung der ganglienzellen am facialiskern des kaminchens nach ausreissung des nerven. *Allg Z Psychiatr.* 1892;48:197-8.
- Nobrega JAM, Manzano GM. *Manual de Eletroneuromiografia e potenciais evocados cerebrais para a pratica clinica.* São Paulo; Ateneu; 2007.
- Notthaft V. Neu Untersuchungen über den verlawf der Degenerations und regenerationsprocesse an verletzten peripheren nerven. *Z wiss Zool.* 1893;1:134-6.
- Ochi M, Noda M, Nakamitsu K, Deie M, Ikuta Y, Maki Y, Awaya A. Promotion of sciatic nerve regeneration in rats by a new neurotrophic pyrimidine derivative MS-430. *Gen Pharmacol.* 1995; 26(1):59-64.
- Ontell M. Muscle satellite cells: calidated technique for light microscopic identification and a quantitative study of changes in their population following degeneration. *Anat Rec.* 1974;178(2):211-27.
- Owen M. Histogenesis of bone cells. *Calcif Tissue Res.* 1978;18;25(3):205-7.
- Paniushin OV, Domaratskaia EI, Starostin VI. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Izv Akad Nauk Ser Biol.* 2006;1:6-25.
- Parkhurst CN, Zampieri N, Chao MV. Nuclear localization of the p75 neurotrophin receptor intracellular domain. *J Biol Chem.* 2010;19;285(8):5361-8.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Mar-shak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.

- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;247:71-4.
- Reynolds BA, Weiss, M. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255(5052):1707–10
- Robinson AJ, Snyder-Mackler L. Estudo clinico eletrofisiológico. In: Robinson AJ, Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia Clínica: eletroterapia e testes eletrofisiológicos*. Porto Alegre: Artmed; 2002. pág.319.
- Rushton WAH. A theory of the effects of fiber size in modulated nerve. *J Physiol*. 1952;115:101-122.
- Salomone R. Paralisia facial periférica. In: Bento RF, Voegels RL, Sennes LU, Pinna FR, Jotz GP, editores. *Otorrinolaringologia baseada em sinais e sintomas*. São Paulo: Fundação Otorrinolaringologia; 2011:55-67.
- Salomone RHJ, Rodrigues JR, Reis e Silva SM, Orando 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.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, FreemanTB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol*. 2000;164:247-56.
- Satar B, Karahatay S, Kurt B, Ural AU, Safali M, Avcu F, Oztas E, Kucuktag Z. Repair of Transected Facial Nerve With Mesenchymal Stromal Cells: Histopathologic Evidence of Superior Outcome. *Laryngoscope*. 2009;119:2221-5.
- Scherer, S. S., Wang, D. Y., Kuhn, R., Lemke, G., Wrabetz, L., and Kamholz, J. (1994). Axons regulate Schwann cell expression of the POU transcription factor SCIP. *J Neurosci*. 1994;14:1930-42.
- Schmitte R, Tipold A, Stein VM, Schenk H, Flieshardt C, Grothe C, Haastert K. Genetically modiled canine Schwann cells—*in vitro* and *in vivo* evaluation of their suitability for peripheral nerve tissue engineering. *J Neurosci Methods*. 2010;186(2):202-8.
- Seckel BR, Chiu TH, Nyilas E, Sidman RL. Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides: regulation by the organ. *Plast Reconstr. Surg*. 1984;74:173-81.

- Seddon HJ. *Three types of nerve injury. Brain.* 1943; 66:237-88
- Sell S. *Stem cell handbook.* New York: Humana Press; 2003. P143.
- 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; 247:144–58.
- Shah NM, Groves AK, Anderson DJ. Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell.* 1996;85:331-43.
- Sharma AK, Bajada S, Thomas PK. Age changes in the tibial and plantar nerves of the rat. *J Anatomy.* 1980;130:417-28.
- Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone.* 2001;29:532-9.
- Shi Y, Zhou L, Tian J, Wang Y. Transplantation of neural stem cells overexpressing glia-derived neurotrophic factor promotes facial nerve regeneration. *Acta Oto-Laryngologica.* 2009;129:906-14.
- Shieh SJ, Lee JW, Chiu HY. Long term-functional results of primary reconstruction of severe forearm injuries. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2007;60:339-48.
- 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.
- Sim FJ, Zhao C, Penderis J, Franklin RJM. The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation. *J. Neurosci.* 2002;22:2451-9.
- Sim FJ, Zhao C, Penderis J, Franklin RJM. Expression of the POU-Domain Transcription Factors SCIP/Oct-6 and Brn-2 Is Associated with Schwann Cell but Not Oligodendrocyte Remyelination of the CNS. *Mol Cell Neurosc.* 2002;20:669–82.
- Soares HD, Chen SC, Morgan JI (2001) Differential and prolonged expression of Fos-lacZ and Jun – lacZ in neurons, glia, and muscle following sciatic nerve damage. *Exp Neurol.* 2001; 167:1–14.

- Sociedade Internacional de Terapia Celular Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
- Spector JG, Lee P, Derby A, Dikla G, Roufa DG. Early stages of facial nerve regeneration through silicone chambers in the rabbit. *Laryngoscope*. 1991;101:1109-23.
- Spector JG, Lee P, Derby A. Rabbit facial nerve regeneration in autologous nerve grafts after antecedent injury. *Laryngoscope*. 2000;110:660-7.
- Spector JG, Lee P, Derby A. Rabbit facial nerve regeneration in NGF-containing silastic tubes. *Laryngoscope*. 1993;103:548-58.
- Stipp-Brambilla EJ, Romão AM, Garbino JA, Salgado MH, Viterboz F. Efeito da exposição cirúrgica de nervos e músculos no teste neurofisiológicos em ratos. *Acta Fisiatr*. 2010;17(3):109-11.
- Sulaiman OA, Gordon T. Effects of short- and long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination, and size. *Glia*. 2000;32:234-46.
- Sun F, Zhou K, Mi W, Qiu J. Combined use of decellularized allogeneic artery conduits with autologous transdifferentiated adipose-derived stem cells for facial nerve regeneration in rats. *Biomaterials*. 2001b; 32:8118-28.
- Sun F, Zhou K, Mi W, Qui J. Repair of facial nerve defects with decellularized artery allografts containing autologous adipose-derived stem cells in a rat model. *Neuroscience Letters*. 2001a;499:104-8.
- Sunderland S. *Nerve and nerve injuries*. 2^a ed. London: Churchill-Livingston; 1978.
- Sweet CR, Castilho AM, Sanchez TG, Bento RF, Neto RVB. O Papel do acesso via fossa média no tratamento da paralisia facial traumática. *Rev Bras Otorrinol*. 1994; 54:1-10.
- Szal G, Miller T. Surgical repair of facial nerve branches. An analysis of different sheathing and suturing techniques. *Arch Otolaryngol*. 1975;101:160-5.
- Thomander L, Aldskogius H, Grant G. *Motor Fibre Organization in the Intratemporal Portion of Cat and Rat Facial Nerve studied with the horseradish Peroxidase Technique*. 1982, Vol. 93, n^o 1-6, p. 397-405.

- Tohill M, Mantovani C, Wiberg M, Terenghi G. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett*. 2004;362:200-3.
- Tomov T, Guntinas-Lichius O, Groheva M. Na example of neural plasticity evoked by putative behavioral demand and early use of vibrissa hairs after facial nerve transaction. *Exp Neurol*. 2002;178:207-218.
- Torigoe K, Tanaka HF, Takahashi A, Awaya A, Hashimoto K. Basic behavior of migratory Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*. 1996;137:301-8.
- Turner JW. A facial palsy in head injures. *Lancet*. 1944; 246:756-7.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur. J. Immunol*. 2006a;36:2566-73.
- Uccelli A, Zappia E, Benvenuto F, Frassoni F, Mancardi G. Stem cells in inflammatory demyelinating disorders: a dual role for immunosuppression and neuroprotection. *Expert Opin Biol Ther*. 2006b;6(1):17-22.
- Vanlair C. Dela regeneration des nerfs peripheriques par le procede de la suture tubulair. *Arch Biol Paris*. 1992; 3:379-496.
- Vasconcelos BCE, Gay-escoda C. Facial nerve repair with expanded plytetrafluoroethylene and collagen conduits: na experimantal study in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58:1257-62.
- Vaughan ED, Richardson D. Facial nerve reconstruction following ablative parotid surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1993;31:274-80.
- Von Bartheld CS. Neurotrophins in the developing and regenerating visual system. *Histol Histopathol*. 1998;13:437-59.
- Von Büngner O. Ueber die degenerations und regeneratioinsvorgänge an nerven nach verletzungen. *Beitr Path Anat*. 1891;10:321-93.
- Von Büngner O, Huber GC. Ueber da verhalten der kern der Schwann´schen Scheide bei nervendegenerationen. *Arcg Mikrosk*. 1893;41:146.
- Wang X, Luo E, Li Y, Hu J. Schwann-like mesenchymal stem cells within vein graft facilitate facial nerve regeneration and remyelination. *Brain Resarch*. 2011;1383:71-80.

- Webber C, Zochodne D. The nerve regenerative microenvironment: early behavior and partnership of axons and Schwann cells. *Exp Neurol*. 2010;223(1):51–9.
- Weiss P. The technology of nerve regeneration: A review sutureless tabulation and related methods of nerve repair. *J Neurosurg*. 1944;1:400-50.
- Williams OL, Wendell-Smith CP. Some additional parametric variations between peripheral nerve fibre populations. *J Anatomy*. 1971;109:505-526.
- Windebank AJ, Wood P, Bunge RP, Dyck PJ. Myelination determines the caliber of dorsal-root ganglion neurons in culture. *J Neurosci*. 1985; 5:1563–9.
- Wingerd BD. *Rat Dissection Manual*. The Johns Hopkins University Press 1988.
- Woodburg D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci*. 2000;61:364-370.
- Yan CJ. Research on repairing facial nerve injury of rabbits by neural stem cells and autologous fascia. *Chinese J Rehabil Theory Practice*. 2004;10:21-2.
- Yanagihara N. Transmastoid decompression of the facial nerve in temporal bone fracture. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1982;90:616–21.
- Yang DP, Zhang DP, Mak KS, Bonder DE, Pomeroy SL, Kim HA. Schwann cell proliferation during Wallerian degeneration is not necessary for regeneration and remyelination of the peripheral nerves: axon-dependent removal of newly generated Schwann cells by apoptosis. *Mol. Cell. Neurosci*. 2008;38:80-8.
- Yang Y, Yuan X, Ding F, Yao D, Gu Y, Liu J, Gu X. Repair of rat sciatic nerve gap by a silk fibroin-based scaffold added with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part*. 2011;17(17-18):2231-44.
- Zemp C, Bestern G, Rossi GL. Morphological and morphometric study of peripheral nerves from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Neuropathol*. 1981;53,99-106.

- Zhang H, Wei YT, Tsang KS, Sun CR, Li J, Huang H, Cui FZ, An YH. Implantation of neural stem cells embedded in hyaluronic acid and collagen composite conduit promotes regeneration in a rabbit facial nerve injury model. *J Transl Med.* 2008;5,6:67.
- Zhang P, He X, Liu K, Zhao F, Fu Z, Zhang D, Zhang Q, Jiang B. Bone marrow stromal cells differentiated into functional Schwann cells in injured rats sciatic nerve. *Artificial Cells Blood. Substitute and Biotechnology.* 2004;4(32)509-18.
- Zorick TS, Syroid DE, Arroyo E, Scherer SS, Lemke G. The transcription factors SCIP and Krox-20 mark distinct stages and cell fates in Schwann cell differentiation. *Mol Cell Neurosci.* 1996;8:129-45.

APÊNDICE

CARTA DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 30.05.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa n° **0291/07**, intitulado:

REGENERAÇÃO DO NERVO FACIAL DE RATOS ATRAVÉS DA IMPLANTAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DO ESTROMA DE MEDULA ÓSSEA DIFERENCIADAS IN VITRO, apresentado pelo Departamento de **Oftalmologia e Otorrinolaringologia**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde n° 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**

Pesquisador (a) Executante: **Raquel Salomone**

CAPPesq, 30 de maio de 2007

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

