**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

MARCELIE PRISCILA DE OLIVEIRA ROSSO

**Estudo comparativo entre as técnicas de sutura
término-lateral e coaptação com selante de fibrina
na regeneração do nervo facial, associada ou não
ao laser de baixa potência**

**BAURU
2016**

MARCELIE PRISCILA DE OLIVEIRA ROSSO

**Estudo comparativo entre as técnicas de sutura término-lateral e
coaptação com selante de fibrina na regeneração do nervo facial,
associada ou não ao laser de baixa potência**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração de Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim.

**BAURU
2016**

Rosso, Marcelie Priscila de Oliveira

R737e Estudo comparativo entre as técnicas de sutura término-lateral e coaptação com selante de fibrina na regeneração do nervo facial, associada ou não ao laser de baixa potência/ Marcelie Priscila de Oliveira Rosso. – Bauru, 2016.
109p. : il.; 31 cm

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, em 08 de maio de 2013.

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 007/2013

Data: 08/05/2013

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe **Alice Izabel de Oliveira** (*in memoriam*), que por tristeza não está fisicamente comigo neste momento, mas com certeza está me guiando, dando proteção e abençoando por todos os caminhos trilhados durante minha vida e compartilhando esta felicidade comigo, e ao meu pai **Mario Sérgio Rosso**, por toda confiança, apoio e fé que depositou em mim para chegar até aqui orgulhoso de mim. Amo vocês! Gratidão eterna!

Ao meu namorado, melhor amigo, cúmplice, companheiro, parceiro e meu futuro marido, **Rafael Gomes de Souza**, crescemos muito nestes anos juntos. Te amo sempre! Gratidão!

Agradecimentos

“Saber esperar é uma virtude!

Aceitar, sem questionar, que cada coisa tem um tempo certo para acontecer...

é ter Fé! ”

(Trecho do filme À espera de um milagre)

Primeiramente agradeço ao meu bom **Deus** pelo dom da vida, por me dar forças em todos momentos difíceis e sem respostas por quais já passei e me conceder a alegria nos momentos de felicidade. A gratidão não pode ser medida, porém somente tenho a agradecer por Deus ser meu refúgio, me guiar em meus caminhos, me ajudar a reconhecer os erros e as escolhas que não deram certo, pois com elas que vamos aprendendo, amadurecendo e vivendo. Sou grata por ter colocado pessoas incríveis em meu caminho, pessoas repletas de luz que contribuíram para minha evolução vital como pessoa. Deus não nos desampara, nos abençoa e nos ensina que o Seu tempo não é o tempo dos homens, e nem tudo que desejamos acontece no momento que queremos, e sim no tempo de Deus, que com certeza será o melhor para nós.

Àqueles que me deram o dom da vida, me educaram da melhor forma possível e fizeram dos meus sonhos, os seus sonhos, meu pai **Mario Sérgio Rosso** e minha mãe **Alice Izabel de Oliveira** (*in memoriam*). Obrigada pai por me apoiar, sofrer e me ajudar a buscar meus sonhos, aqui está a concretização de mais um deles, agradeço pelas palavras sábias ou às vezes duras em momentos difíceis de decisão. Obrigada mãe por sempre ter sido uma pessoa humilde, sincera e que amou seus filhos incondicionalmente, sei que neste momento está me abençoando e auxiliando a trilhar meus próximos passos. Meu amor por vocês não cabe nesta vida, Gratidão. Amo vocês!

Ao meu irmão **Alexandre Cristiano de Oliveira Rosso** pelo companheirismo, apoio, tentar me fazer rir em momentos difíceis, ser preocupado e ter orgulho de mim. Vocês são minha base, Gratidão e obrigada por acreditarem em mim. Amo vocês!

[...] O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece.

Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal;

Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;

Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. [...]

1 Coríntios 13

Ao meu namorado **Rafael Gomes de Souza**, por todo o apoio, companheirismo, amizade, amor, conselhos, por me fazer rir, cuidar de mim, me incentivar, me dar broncas, sonhar junto comigo e planejar nosso futuro. Os últimos anos não foram fáceis, muitas mudanças, ficamos longe, você na graduação e eu no mestrado, agora vencemos essa fase, me orgulho de você e você com certeza se orgulha de mim. Agora caminhamos lado a lado para crescermos e construirmos nosso futuro e nossa família. Agradeço a Deus por ter te colocado em meu caminho, Gratidão por estar comigo e ser minha metade! Te amo!

Aos meus futuros sogros **Denúbia Maria Gomes de Souza** e **Valdir de Souza**, obrigada por me acolherem como filha desde o primeiro encontro, e hoje são com certeza minha segunda família, sei que posso contar infinitamente com vocês, que sempre torceram, rezam por mim, sofreram e comemoraram comigo. Gratidão! Amo vocês!

Durante esses poucos anos em Bauru, vim sem conhecer ninguém, e fui acolhida pelas pessoas do Departamento de Anatomia. Acredito que a vida é um constante aprendizado, e cada pessoa que passa pela nossa vida deixa um pouco de si e leva um pouco de nós, isso é viver, é sentir o pulsar da vida, momentos tristes e felizes sempre acontecem, e estamos aqui para isso, para viver. Obrigada a todas as pessoas que fizeram parte dessa etapa em minha vida.

Um agradecimento especial ao meu Orientador **Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim**, que sem me conhecer, me deu um voto de confiança para entrar no mestrado, agarrei com todas as forças essa oportunidade única em minha vida. Estudei, me dediquei, aprendi muito, foi difícil, mas graças a Deus este sonho, que antes era somente um sonho, hoje está em fase de concretização. Professor, sou muito grata por Deus ter o colocado em minha vida e pela oportunidade que me deu, me acolheu como orientada, me ensinou, me amparou, me auxiliou nessa nova etapa e em uma nova cidade. Sou grata por todo o crescimento que a mim

foi proporcionado, grata por ser uma pessoa de bom coração como você que Deus escolheu para ser meu orientador e me colocar neste caminho. Obrigada pelas conversas, pela amizade, por ser uma ótima pessoa e exemplar profissional, pelo apoio e confiança. Gratidão sem tamanho!

Aos professores do Departamento de Anatomia **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo** e ao **Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues**, sempre atenciosos, respeitosos, dispostos a sentar do meu lado com um livro, ou um microscópio para ensinar aquela técnica cirúrgica ou aquela dúvida, agradeço a Deus por conhecer pessoas de tamanho conhecimento tanto como profissionais quanto como pessoas, quero levar seus ensinamentos por toda minha vida. E ao **Prof. Dr. André Luiz Shinohara**, pela participação constante na retirada de dúvidas e no apoio da pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, a secretária **Daniela Ariane Alves**, **Romário Moises de Arruda** e **Ovídio dos Santos Sobrinho**, que sempre me receberam muito bem, e estavam dispostos a auxiliar no que fosse necessário para darmos continuidade à pesquisa.

Às funcionárias da Pós-Graduação **Leila**, **Letícia** e **Fátima**, sempre nos auxiliando nas dúvidas, aguentando nossos desesperos, obrigada.

Aos amigos de pós-graduação **Iris Jasmin Santos German**, **Karina Torres Pomini Puzipe**, **Idvaldo**, **Aparecido Favaretto Júnior**, **Jéssica Barbosa de Oliveira Gonçalves**, **Mizael Pereira**, pessoas que me auxiliaram nas etapas desta pesquisa, as quais também aprendemos juntos, cada um com seu jeito, sei que desenvolvemos como pessoas e profissionais a cada etapa. Com cada um aprendi um pouco e sou grata pela participação que tiveram neste período de minha vida.

Em especial a amiga **Dayane Maria Braz Nogueira**, que além de companheira de mestrado foi minha amiga dividindo apartamento, alegrias tristezas, passeios, preocupações, ensinamentos e sendo minha irmã de coração, obrigada por tudo, você é uma pessoa muito especial que Deus colocou em meu caminho.

À **Prof.^a Dr.^a Daniela Vieira Buchaim**, você foi a chave para que eu pudesse conhecer meu futuro orientador e também para que eu pudesse chegar mais perto do sonho de entrar no mestrado. Agora isso se concretizou e chego ao final desse sonho, obrigada pelo incentivo, sem mesmo me conhecer no início, me deu um voto de confiança, obrigada pelo apoio. Gratidão!

Ao **Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Júnior**, pelos ensinamentos nas técnicas cirúrgicas para realização deste trabalho, pelo aprendizado e companheirismo nas longas horas de cirurgia e cuidado com os animais. Gratidão!

Também agradeço ao colega **Cleuber Bueno** que participou tanto nas cirurgias quanto na morfometria, meu muito obrigada.

*[...] E às vezes, quando os procuro [os amigos],
noto que eles não tem noção de como me são necessários,
de como são indispensáveis ao meu equilíbrio vital,
porque eles fazem parte do mundo que eu,
tremulamente, construí,
e se tornaram alicerces do meu encanto pela vida.
Se um deles morrer, eu ficarei torto para um lado.
Se todos eles morrerem, eu desabo! [...]*

Vinícius de Moraes

Aos amigos de tão longa data:

Jorge Luiz Barbosa da Silva, uma pessoa tão especial, maravilhosa e iluminada em minha vida. Já passamos por tantos momentos, alegres e tristes, não tenho palavras para agradecer tudo que já fez e faz por mim e pela minha família, só espero estarmos presentes na vida um do outro para sempre, você é muito importante para mim. Amo você!

Gabriela Regina da Silva, minha companheira de aventuras desde a adolescência, amigas inseparáveis, mesmo apesar da distância, que hoje é de um oceano, mas em todos nossos reencontros parece que nos vimos ontem. Obrigada pela amizade sem limites que nos une, e por tudo que já passamos, você me faz falta, fico muito feliz pela sua família e por fazer parte dela, Gael veio trazer alegria, saudades. Amo você!

À amiga e companheira desde os tempos de graduação, **Myriam Fernanda Merli**, nossa amizade foi instantânea, você é uma pessoa abençoada que Deus colocou em minha vida, torço muito por você. Obrigada pela amizade, sinto sua falta. Amo você!

Aos Professores membros da Banca de defesa, por aceitarem o convite. Sou grata por sua dedicação e consideração que com certeza contribuirão para o enriquecimento deste trabalho.

Aos Professores Doutores **Rui Seabra Ferreira Júnior** e **Benedito Barraviera**, do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), por fornecerem e permitirem o uso do selante de fibrina derivado de serpente utilizado nesta pesquisa.

A ex-secretária do Departamento e Pós-Graduação em Biologia Oral **Vera Lúcia Rufino Rosa**, que sempre nos recebeu com ética nos auxiliando no que era necessário com carinho e simpatia.

Aos dirigentes (diretoria, vice-diretores, colegiados e comissões assessoras) da Faculdade de Odontologia de Bauru e a atual diretora **Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (FOB – USP)**, todos os funcionários da do Biotério, Biblioteca e Pós-graduação, que participaram e contribuíram de certa forma para que esta pesquisa se concretizasse.

Ao **PAE – Programa de Aperfeiçoamento de Ensino**, fornecido pela Faculdade de Odontologia de Bauru, pelo apoio financeiro durante um semestre, fazendo parte do programa de Mestrado.

À **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, que por meio do projeto 2010/16.883-0, coordenado pelo Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim, possibilitou a aquisição do material permanente e de consumo para esta pesquisa.

À **CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pelo apoio financeiro durante um período do Mestrado.

Epígrafe

“A mente que abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

As lesões na face estão mais comuns na sociedade atual, envolvendo acidentes automobilísticos, quedas ou consequências iatrogênicas após procedimentos. Essas lesões podem afetar os nervos responsáveis pela musculatura facial repercutindo em alterações físicas, emocionais e psicossociais, por exemplo, no sistema estomatognático, na voz, na expressão e estética faciais, nos sentimentos e convívio social do indivíduo. Pesquisas atuais estão almejando melhores técnicas para o processo de reparo nervoso periférico e reabilitação funcional dessas lesões. As técnicas tradicionais como sutura epineural término-lateral e coaptação por meio de selante de fibrina são utilizadas com essa finalidade. O objetivo deste estudo foi avaliar a reparação do ramo bucal do nervo facial lesionado por meio da técnica término-lateral de duas diferentes formas: sutura epineural e o novo selante heterólogo de fibrina, associadas ou não ao tratamento com laser de baixa potência. Foram utilizados trinta e dois ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar) com 80 dias de vida, distribuídos aleatoriamente em Grupo Controle (GC; $n=8$), e Grupos Experimentais (Grupo Experimental Sutura - GES e Grupo Experimental Fibrina – GEF; $n=12$; Grupo Experimental Sutura Laser – GESL e Grupo Experimental Fibrina Laser – GEFL; $n=12$). Os animais do GC não receberam intervenção cirúrgica; no GES foi realizado, no lado direito da face, a secção do ramo bucal do nervo facial, onde o coto proximal foi suturado à tela subcutânea e o coto distal suturado de forma término-lateral ao ramo zigomático do nervo facial; no GEF, no lado esquerdo da face, foram realizados os mesmos procedimentos do GES, porém foi utilizada a coaptação com selante de fibrina do coto distal. Os grupos GESL e GEFL, além das técnicas descritas, receberam tratamento com aplicação de Laser Arseneto de Gálio Alumínio (GaAlAs), pulso contínuo, comprimento de onda de 830 nm, 6 J/cm², por 24 segundos, três vezes por semana durante cinco semanas, em três pontos dos locais operados de ambos os lados. Foi realizada também a análise funcional do movimento das vibrissas de todos os grupos na 5^a e 10^a semanas pós-cirúrgica. Os animais foram eutanasiados 10 semanas após a cirurgia e as fibras nervosas foram analisadas morfolologicamente, utilizando microscopia óptica e eletrônica, e morfometricamente por meio das medidas da área e diâmetro da fibra, área e diâmetro do axônio, espessura e diâmetro da bainha de mielina. Foi possível observar a regeneração no coto distal de fibras

mielínicas e amielínicas. Nas variáveis mensuradas, ocorreu diferença significativa na área da fibra nervosa entre os grupos GEF e GEFL. A recuperação funcional dos movimentos das vibrissas apresentou melhores resultados nos grupos com uso do selante de fibrina (GEF e GEFL), sendo que os grupos associados à laserterapia foram os que mais se aproximaram do GC. Portanto, concluiu-se que os dois métodos analisados para reparação nervosa periférica foram efetivos, permitindo o brotamento axonal no coto distal, e que a laserterapia proporcionou melhores resultados, tanto morfométricos quanto funcionais.

Palavras-chave: Adesivo tecidual de fibrina. Nervo facial. Regeneração nervosa. Terapia a laser de baixa intensidade.

ABSTRACT

Comparative study between the techniques of end-to-side suture and coaptation with fibrin sealant in the facial nerve regeneration, associated or not to the low-power laser

The injuries on the face are more common in today's society, involving motor vehicle accidents, falls or iatrogenic consequences after procedures. These injuries can affect the nerves responsible for facial muscles reflecting in physical, emotional and psychosocial changes, for example in the stomatognathic system, in voice, facial expression and aesthetics, feelings and social life of the individual. Current researches are aiming best techniques to the process of peripheral nerve repair and functional rehabilitation of these injuries. Traditional techniques such as end-to-side epineural suture coaptation by fibrin sealants are used for this purpose. The objective of this study was to evaluate the repair of buccal branch of the facial nerve injured by end-to-side technique in two different ways: epineural suture and the new heterologous fibrin sealant, associated or not to treatment with low power laser. Thirty-two rats (*Rattus norvegicus*, *Wistar*) were used. They were 80 days old and were randomly divided into Control Group (CG, $n=8$) and Experimental Groups (Experimental Suture Group – ESG and Experimental Fibrin Group - EFG; $n=12$; Experimental Suture Laser Group – ESLG and Experimental Fibrin Laser Group - EFLG; $n=12$). The CG animals did not receive surgery; the ESG was performed on the right side of the face, the section of the buccal branch of the facial nerve, where the proximal stump was sutured to the subcutaneous tissue and the distal stump sutured end-to-side portion of the zygomatic branch of the facial nerve; EFG on the left side of the face, the same procedures were carried ESG, but was used coaptation with fibrin sealant of the distal stump. The groups ESLG and EFLG, and the techniques described, have been treated with the application of Laser Gallium Aluminum Arsenide (GaAlAs), continuous pulse, wave length 830 nm, 6J /cm² for 24 seconds, three times per week for five weeks, at three points of the local operated from both sides. It also performed a functional analysis of the movement of the vibrissae of all groups in the 5th and 10th post-operativeweeks. The animals were euthanized 10 weeks after surgery and the fibers were morphologically analyzed, using light and electron microscopy, and morphometrically by means measures the area and diameter of the fiber, area and diameter of the axon, thickness and diameter of the

myelin sheath. It was possible to observe regeneration in the distal stump of myelinated and unmyelinated fibers. The measured variables, there was a significant difference in the area of the nerve fiber between the EFG and EFLG groups. Functional recovery of the movements of the vibrissae the best results in the groups with fibrin sealant use (EFG and EFLG), and the groups associated with laser therapy were the most nearly CG. Therefore, it follows that the two methods discussed for peripheral nerve repair was effective, allowing for axonal sprouting in the distal stump, and that the laser treatment yielded better results, both morphometric and functional.

Keywords: Fibrin Tissue Adhesive. Facial Nerve. Nerve Regeneration. Laser Therapy, Low-Level.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Nervo facial e seus ramos superficiais.	33
Figura 2 - Anatomia do nervo facial em ratos.	35
Figura 3 - Esquema da classificação das lesões nervosas.....	39
Figura 4 - Esquema da neurografia término-lateral pura.	43
Figura 5 - (A) Incisão cirúrgica; (B) Divulsão dos tecidos.	56
Figura 6 - Exposição dos ramos bucal e zigomático do nervo facial.....	57
Figura 7 - Microscópio cirúrgico DF Vasconcelos.....	57
Figura 8 - (A) Isolamento do ramo bucal do nervo facial; (B) Isolamento do ramo zigomático do nervo facial.	57
Figura 9 - (A) Secção do ramo bucal do nervo facial com tesoura; (B) Posicionamento do ramo bucal do nervo facial de forma término-lateral ao ramo zigomático do nervo facial.....	58
Figura 10 – (A) Ramo bucal do nervo facial suturado de forma término-lateral ao ramo zigomático do nervo facial com fio 10.0; (B) Ramo bucal do nervo facial coaptado ao ramo zigomático do nervo facial com aplicação do selante de fibrina.	58
Figura 11 - Fio de sutura 10.0 utilizado para neurografia do nervo facial.	58
Figura 12 - (A) Coto proximal do ramo bucal do nervo facial suturado à tela subcutânea; (B) Pele suturada com fio de seda 4.0.....	59
Figura 13 - Aparelho Laserpulse e caneta Ibramed 830 nm utilizados.	60
Figura 14 - Aplicação do Laser nos animais.....	60
Figura 15 - Análise do movimento das vibrissas.	61
Figura 16 - Micrótomo Leica® RM 2245 utilizado para confecção dos cortes e obtenção das lâminas.	63
Figura 17 - Exemplo das mensurações feitas na morfometria.....	64
Figura 18 - Imagens de microscopia ótica dos grupos: (A) GC, (B) GES, (C) GEF, (D) GESL e (E) GEFL. A marcação (■) aponta a fibra mielínica, a (◆) indica vaso sanguíneo.....	69

Figura 19 - Gráficos com os resultados morfométricos dos grupos experimentais e grupo controle.....	71
Figura 20 - Gráficos com os resultados morfométricos dos grupos experimentais e grupo controle.....	72
Figura 21 - As imagens demonstram a MET dos grupos: (A) GC, (B) GES, (C) GEF, (D) GESL e (E) GEFL. A marcação (↓) aponta a fibra mielínica, (♦) indica região com fibras amielínicas, (●) indica fibras colágenas, (★) indica o núcleo da Célula de Schwann.	75
Figura 22 - Imagens referentes à avaliação da posição das vibrissas na 5ª semana (A) e 10ª semana (B) do GC.....	77
Figura 23 - Imagens referentes à avaliação da posição das vibrissas na 5ª semana (A) e 10ª semana (B) pós-cirúrgica do GES e GEF.	78
Figura 24 - Imagens referentes à avaliação da posição das vibrissas na 5ª semana (A) e 10ª semana (B) semana pós-cirúrgica do GESL e GEFL.....	78
Figura 25 - Resultados da análise de movimentação e posicionamento das vibrissas.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela utilizada para análise do movimento das vibrissas.....	61
---	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

µl	microlitro
µm	micrômetro
ANOVA	Análise de Variância
CEEPa	Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
CEVAP	Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos
cm	centímetro
CS	Células de Schwann
DW	Degeneração Walleriana
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
GaAIs	Arseneto de Gálio Alumínio
GC	Grupo Controle
GEF	Grupo Experimental Selante de Fibrina
GEFL	Grupo Experimental Selante de Fibrina e Laserterapia
GES	Grupo Experimental Sutura Epineural Término-lateral
GESL	Grupo Experimental Sutura Epineural Término-lateral e Laserterapia
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
mm	milímetro
nm	nanômetro
PEG	Polyethylene Glycol
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TNFα	Fator alfa de necrose tumoral
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 O SISTEMA NERVOSO	29
2.1.1 ASPECTOS GERAIS	29
2.1.2 O NERVO FACIAL	31
2.1.3 O NERVO FACIAL DOS RATOS	33
2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES NERVOSAS	35
2.2.1 A REGENERAÇÃO NERVOSA	35
2.2.2 TIPOS DE LESÕES	37
2.3 AS TÉCNICAS DE REPARO DAS LESÕES NERVOSAS	39
2.3.1 TÉCNICAS DE ENXERTO DE NERVO	41
2.3.2 NEURORRAFIAS	41
2.3.3 NEURORRAFIA TÉRMINO-LATERAL	42
2.3.4 O SELANTE DE FIBRINA	43
2.3.5 A LASERTERAPIA	47
3 PROPOSIÇÃO	49
3.1 OBJETIVO GERAL	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 OS ANIMAIS E O DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	55
4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	56
4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA	62
4.4 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DOS RESULTADOS (MORFOMETRIA)	63
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
5 RESULTADOS	65
5.1 OBSERVAÇÕES E ANÁLISES HISTOMORFOLÓGICAS (MICROSCOPIA ÓPTICA)	67
5.1.1 PERÍODO DE DEZ SEMANAS PÓS-CIRURGIA	67
5.2 OBSERVAÇÕES E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	71
5.2.1 PERÍODO DE DEZ SEMANAS PÓS-CIRURGIA	71
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	72
5.3.1 PERÍODO DE DEZ SEMANAS PÓS-CIRURGIA	72
5.4 ANÁLISE DOS MOVIMENTOS DAS VIBRISSAS	77
6 DISCUSSÃO	81
7 CONCLUSÕES	87

REFERÊNCIAS.....	91
------------------	----

ANEXO	107
-------------	-----

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O nervo facial apresenta anatomia complexa e é responsável por executar importantes funções, como a inervação de músculos da face que realizam a mímica facial, a oclusão da pálpebra e boca, movimentos nasais e articulação da fala. Está relacionado também com a gustação e controle autonômico de glândulas exócrinas (BENTO; MINITI, 1989; SALOMONE, 2012).

Quando lesado, este nervo pode causar sérias alterações na vida de uma pessoa, como a assimetria facial, problemas na mímica, causando distúrbios de sua autoimagem e reconhecimento, além de alterações psicológicas e sociais (SALOMONE, 2012).

Como consequência da paralisia facial, pode haver deformação permanente e perda funcional. Deste modo, em busca de melhores resoluções para a lesão do nervo facial estudos utilizam modelos animais a fim de estudar as técnicas de coaptação nervosa, enxertia e intervenções para uma correta regeneração axonal (HEATON et al., 2014).

A correta reinervação dos órgãos alvo é o principal objetivo da reparação nervosa, a fim de se obter uma regeneração sensorial, motora e axonal orientada. A localização, o tipo de lesão, o momento da cirurgia, o tipo de reparo a ser utilizado, o correto alinhamento dos fascículos, a técnica cirúrgica e as morbidades a serem apresentadas no pós-cirúrgico são alguns dos variados fatores que devem ser levados em consideração para prever o resultado da reparação dos nervos periféricos (MARTÍNEZ DE ALBORNOZ et al., 2011).

A neurorrafia término-lateral foi desenvolvida como uma alternativa para situações onde não poderiam ser utilizadas as técnicas ditas padrões, porém apresenta ainda muitas controvérsias na literatura. É possível observar estudos onde a aplicação da neurorrafia término-lateral apresentou baixa morbidade e bons resultados, no entanto há relatos de resultados insatisfatórios, geralmente relacionados à sensibilidade (BATISTA; ARAÚJO, 2010).

Esta técnica vem sendo aperfeiçoada e usada em diferentes nervos, como nervo facial e também no plexo braquial, com resultados de reinervação através das pontes de enxerto (SILVA, 2008; MUELLER; OLIVEIRA NETO; FRANCIOSI, 2009; HANINEC; MENCL; KAISER, 2013; LIU et al., 2014; SHEA et al., 2014).

A busca por um elemento menos invasivo levou ao desenvolvimento do selante de fibrina derivado do veneno de serpente (*Crotalus durissus terrificus*) em 1989 por pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP – UNESP – Botucatu, SP). O principal intuito desses pesquisadores foi produzir um selante de fibrina com ausência de sangue humano, a fim de evitar a transmissão de doenças infecciosas. Este selante de fibrina pode ser uma ferramenta útil clinicamente, devido à sua flexibilidade e diversidade de aplicações. É considerado um selante biológico e biodegradável, com características diferenciais, não proporcionando reações adversas, apresentando ausência de elementos do sangue humano, com uma boa capacidade adesiva, não transmitindo doenças infecciosas, atuando como um coadjuvante em procedimentos de sutura convencional (BARROS et al., 2009).

Pequenas quantidades de selante de fibrina foram suficientes para proporcionar a anastomose de terminações nervosas em coelhos. Como foi visto pela literatura, a principal vantagem é que este selante não causa reações de corpo estranho ou cicatrizes, diferenciando-se da sutura realizada com fio de nylon (JÚNIOR; VALMASEDA-CASTELLÓN; GAY-ESCODA, 2004). Desse modo, o selante de fibrina pode minimizar a manipulação dos cotos, evitando a presença de nylon no interior do tecido nervoso, pode proporcionar melhores resultados, já que é atraumática e reduzir o tempo cirúrgico (SILVA et al, 2010). O uso do selante de fibrina está sendo testado em pesquisas atuais.

Outro elemento que entra como coadjuvante no processo de regeneração nervosa é a laserterapia, que apresenta como efeitos terapêuticos, analgesia local, ação antiedematosa, anti-inflamatória e cicatrizante. Observa-se também o efeito bioestimulativo trófico tissular, como o incremento da velocidade de crescimento dos nervos seccionados (AGNE, 2008).

O uso de laser de baixa potência (780 nm) em pacientes com lesões nervosas periféricas incompletas por um período de seis meses a vários anos demonstrou efeito imediato de proteção, manutenção da funcionalidade nervosa, diminuição do tecido cicatricial e da degeneração de neurônios motores correspondentes da medula espinhal. Além de significativo crescimento axonal e mielinização (ROCHKIND, 2009).

Como autores pontuam, é de grande valia a padronização da técnica cirúrgica realizada após lesão do nervo facial e a aplicação de uma escala de

avaliação da mímica facial e das etapas da regeneração com o intuito de estudar o desenvolvimento de drogas sistêmicas que promovam uma melhor recuperação nervosa (de FARIA et al., 2006).

É nítida a importância da funcionalidade do nervo facial e o grau de alteração que sua lesão pode afetar a qualidade de vida do indivíduo que foi acometido por um trauma. A fim de aperfeiçoar as técnicas de auxílio na regeneração nervosa, por meio desta pesquisa, a atual proposta foi avaliar um novo material, o selante de fibrina derivado do veneno de serpente que, dentre suas indicações, utilizou-se sua aplicação como uma “cola” para nervos lesionados.

Apesar de tais características significativas o papel do selante de fibrina no reparo término-lateral nervoso ainda não foi completamente estabelecido na literatura vigente. Dessa forma elegeu-se pesquisar a técnica de coaptação término-lateral utilizando o selante de fibrina e a sutura epineural tradicional, e se estas sofrem influência ou não dos efeitos bioestimulativos do laser de baixa potência na regeneração nervosa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O SISTEMA NERVOSO

2.1.1 Aspectos gerais

Todas as funções orgânicas e a interação do ser vivo com o meio ambiente são controlados por um sistema especializado, o Sistema Nervoso (SN). Este sistema controla, coordena e organiza todas as funções dos sistemas do organismo. Tem ainda a função de receber os estímulos desencadeados na superfície do corpo e é capaz de interpretá-los e gerar respostas adequadas frente a determinado estímulo (DANGELO; FATINI, 2007).

O SN é dividido de forma estrutural em Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP). O SNC é composto pelas estruturas contidas no esqueleto axial (encéfalo e medula espinhal), é o receptor de estímulos, de comandos e desencadeador de respostas. Já o SNP compreende os nervos cranianos e espinhais, os gânglios e as terminações nervosas. Estas estruturas estão localizadas fora da parte central, ou seja, do esqueleto axial, e é responsável por conduzir os estímulos até que cheguem ao SNC ou por levar as respostas geradas no SNC até os órgãos efetadores (DANGELO; FATINI, 2007; MOORE; DALLEY; AGUR, 2014).

A unidade funcional do SN é chamada de neurônio, que é altamente especializado para a comunicação. As estruturas que compõem o neurônio são: o corpo celular e processos, que são os **dendritos** e o **axônio** - sua função é conduzir os impulsos para o corpo celular e para longe dele de forma respectiva; a **mielina**, constituída por camada de substância lipídica e proteica, formando a bainha de mielina que está ao redor de alguns axônios e exerce a função de aumentar a velocidade de condução do impulso. Para que haja comunicação entre os neurônios, ocorrem as sinapses, que são geradas nos pontos de contato entre eles. A liberação de neurotransmissores de um neurônio para outro pode excitar ou inibi-lo de forma a continuar ou terminar o impulso e/ou resposta (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014).

O SN apresenta também as fibras chamadas aferentes e as eferentes. Recebe o nome de aferente as fibras do SNP que levam as informações dos receptores para o SNC e de eferente as fibras que enviam os estímulos de ordem do SNC até os músculos e glândulas. O sistema eferente pode ser dividido em somático,

ou seja, envia os impulsos do SNC para os músculos esqueléticos (voluntário) e em autônomo (visceral) mandando os impulsos do SNC para a musculatura lisa, coração e glândulas (RIZZOLO; MADEIRA, 2009).

O nervo é composto por um feixe de fibras nervosas (axônios) localizados na parte periférica, unido por tecido conectivo e apresenta-se como um forte cordão esbranquiçado no ser vivo. Existem 12 pares de nervos cranianos e 31 pares de nervos espinhais que tem origem na medula e a deixam através dos forames intervertebrais da coluna vertebral (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014)

Os nervos são apoiados e protegidos por 3 envoltórios:

- Endoneuro: delicada bainha de tecido conectivo que envolve cada fibra nervosa;
- Perineuro: envolve os feixes (fascículos) de fibras nervosas;
- Epineuro: bainha espessa de tecido conectivo frouxo que envolve todo o nervo emitindo septos para seu interior, apresenta tecido gorduroso, vasos sanguíneos e linfáticos (MACHADO; HAERTEL, 2013; MOORE; DALLEY; AGUR, 2014).

Os nervos cranianos apresentam funcionalmente o componente aferente e eferente (MACHADO; HAERTEL, 2013).

O componente aferente apresenta:

- fibras aferentes somáticas gerais: conduzem impulsos de temperatura, dor, pressão, tato e propriocepção. Apresentam sua origem em exteroceptores e proprioceptores;
- fibras aferentes somáticas especiais: relacionados com visão, audição e também equilíbrio. Apresentam sua origem na retina e no ouvido interno;
- fibras aferentes viscerais gerais: impulsos relacionados com a dor visceral. Apresentam sua origem nos viscerosceptores;
- fibras aferentes viscerais especiais: localizados nos sistemas digestivo e respiratório (viscerais). Apresentam sua origem em receptores gustativos e olfatórios.

O componente eferente apresenta:

- fibras eferentes viscerais especiais: inervam músculos originados nos arcos branquiais (formações viscerais);
 - fibras eferentes viscerais gerais: inervam os músculos lisos, do coração e glândulas;
-

- fibras eferentes somáticas: inervam os músculos estriados miotônicos (MACHADO; HAERTEL, 2013).

Plexos de microvasos percorrem de forma longitudinal o epineuro e enviam ramos transversais através do perineuro para formar uma rede vascular no endoneuro. Quando há um trauma no nervo ocorre um aumento da permeabilidade dos vasos epineurais que são mais susceptíveis ao trauma por compressão do que os vasos endoneurais. Quando há níveis elevados de compressão ou por tempo prolongado também haverá lesão dos vasos endoneurais ocasionando um edema intrafascicular, podendo levar a uma lesão nervosa secundária (RYDEVIK; LUNDBORG, 1977).

2.1.2 O Nervo facial

O nervo facial é o sétimo par de nervos cranianos, apresenta uma anatomia bastante complexa e exerce funções importantes. Este nervo é responsável pela inervação dos músculos da face que realizam a mímica facial, oclusões palpebral e bucal, fechamento da válvula nasal e lubrificação da córnea com suas fibras parassimpáticas pré-ganglionares. Exerce funções também no ouvido, como a inferência do reflexo estapediano e sensibilidade do ouvido externo (BENTO; MINITI; RUOCCO, 1985; SALOMONE, 2012).

Em sua composição há componentes aferente e eferente. Apresenta origem no encéfalo, mais especificamente na ponte e penetra no meato acústico interno localizado na parte petrosa do osso temporal, no interior deste osso dá origem a um pequeno ramo eferente para o músculo estapédio, do estribo, e outros dois ramos maiores, que são os nervos petrosos maiores e corda do tímpano, formados por fibras parassimpáticas. Seu tronco principal emerge pelo forame estilomastóideo no osso temporal, aqui também dá origem a mais dois ramos, que são os nervos auriculares posteriores e digástrico, este inerva o ventre posterior do músculo digástrico, e ramo estilo-hióideo, que inerva o músculo estilo-hióideo. O nervo facial atravessa a glândula parótida, porém não a inerva e sim emite ramos para os músculos da expressão facial (FEHRENBACH; HERRING, 1998).

Este nervo também contém uma raiz motora (nervo facial) e uma raiz sensitiva (nervo intermédio), que se fusionam em um tronco único após passarem pelo meato acústico interno. No osso temporal, este nervo muda abruptamente de direção

formando o chamado joelho do nervo facial, local onde aumenta de tamanho e forma o gânglio geniculado, onde se situam os corpos de neurônios da raiz sensitiva. As fibras parassimpáticas deste nervo estão relacionadas com outros gânglios, como o pterigopalatino e o mandibular (RIZZOLO; MADEIRA, 2009).

O nervo petroso maior é responsável pela sensibilidade geral do palato mole e penetra no osso temporal através de um hiato. Possui fibras parassimpáticas secretomotoras que se unem com fibras simpáticas (nervo petroso profundo) até alcançar o gânglio pterigopalatino fazendo sinapse e chegando às glândulas lacrimal, palatinas e da mucosa da cavidade nasal pelas fibras pós-ganglionares. Distribui-se à maxila, território do nervo maxilar e o nervo corda do tímpano percorre a mandíbula, território do nervo mandibular (RIZZOLO; MADEIRA, 2009).

Ao deixar o crânio pelo forame estilomastóideo, o nervo intermédio já não pertence mais ao nervo facial, e este recebe o nervo auricular posterior, nesse momento ele passa a ser um nervo motor e não mais misto (RIZZOLO; MADEIRA, 2009).

Após passar pela glândula parótida, o nervo facial divide-se em um número variado de ramos (Figura 1), alguns destes se comunicam formando o plexo intraparotídeo. Os chamados ramos terminais do nervo facial são: temporais, zigomáticos, bucais, marginal da mandíbula e cervical, que suprem as regiões indicadas pelos próprios nomes. Os ramos temporais passam pelo arco zigomático e chegam aos músculos situados acima deste, os ramos zigomáticos vão acima do ducto parotídeo, já os bucais, para baixo deste ducto, o ramo marginal da mandíbula atinge o mento e o lábio inferior cruzando superficialmente o músculo masseter e finalmente o ramo cervical segue posteriormente a mandíbula innervando o músculo platisma. Lembrando que nenhum dos ramos do nervo facial inerva a pele da face (RIZZOLO; MADEIRA, 2009).

Fonte: LYNCH, 2006.

Figura 1 - Nervo facial e seus ramos superficiais.

2.1.3 O Nervo facial dos ratos

O tronco principal do nervo facial nos ratos emerge do forame estilomastóideo, localizado póstero-lateralmente ao canal auditivo externo. Neste local observa-se o tendão do músculo trapézio cobrindo parcialmente a saída do nervo, então deve ser afastado de forma lateralmente para uma melhor visualização. No canal auditivo, percebe-se que o tronco principal do nervo facial faz um giro de aproximadamente 75° a 80° antes que bifurque logo abaixo da glândula parótida. Aqui se pontua a diferença entre os humanos, o nervo facial passa pela glândula, porém inferiormente a ela, de modo que a remoção da glândula se torna possível, sem danificar o nervo (MATTOX; FELIX, 1987). Após deixar o crânio, este tronco principal acompanha o canal auditivo externo antes de ramificar-se, mostrando assim alguma semelhança ao nervo facial humano. Superiormente emerge o ramo auricular posterior, logo que o tronco principal emerge do forame, percorrendo um caminho em direção ao músculo auricular (YETISER et al., 2005).

A divisão temporofacial do tronco é composta pelo ramo temporal, que se direciona para o músculo orbicular do olho e pelo ramo zigomático menor, que percorre um caminho até o músculo bucinador e ao lábio superior. Já a divisão cérvico

inferior do tronco principal é composta pelos ramos zigomáticos e bucais na região superior e na inferior, há os ramos cervical e marginal da mandíbula para o lábio inferior (Figura 2) (YETISER et al., 2005).

O ramo zigomático do nervo facial em ratos pode emergir do tronco ou do nervo bucal, dessa forma sua anatomia se torna complexa e além de se entrelaçarem com as tributárias da veia jugular externa. O nervo mandibular se bifurca em seus ramos terminais e segue para músculo do lábio inferior (GREENE, 1955; HEBEL; STROMBERG, 1976; MATTOX; FELIX, 1987). Como mostrado por Hebel, Stromberg, 1976; Mattox, Felix, 1987, o segundo ramo do nervo facial, o ramo cervical posterior é o menor e primeiro ramo da divisão, já o terceiro ramo do nervo facial, o ramo cervical é o mais posterior e inferior, e está de forma inferior a jugular externa. O quinto ramo do nervo facial, denominado ramo bucal, percorre um caminho entre os músculos masseter e temporal e inferiormente ao olho em direção ao nariz. A porção infratemporal é somente motora assemelhando-se a outros nervos periféricos.

Mattox, Felix (1987) relatam que na visualização histológica o tronco do nervo facial de ratos wistar é monofascicular e apresenta em média 4650 ± 256 axônios.

Os axônios dos nervos periféricos podem formar pontes de até 10 mm, os diâmetros dos axônios medem entre 3 μ m e 20 μ m e a distância entre os nodos de Ranvier podem variar de 0,1 mm a 1,8 mm (LUNDBORG et al, 1994; LABRADOR; BUTÍ; NAVARRO, 1998; EVANS, 2000; MAY; SCHAITKIN, 2000; GROSHEVA et al, 2008a).

Dessa forma, é pontuado que o nervo facial dos ratos é um bom modelo utilizado em estudos experimentais em decorrência da fácil manipulação e dissecação do seu trajeto (YETISER et al., 2005).

O movimento mais facilmente mensurável para avaliar o nervo facial dos ratos é a excursão das vibrissas, que é produzido pela ação combinada dos músculos extrínsecos e intrínsecos ligados a cada uma dessas vibrissas e aparentemente controlada de forma dinâmica dentro de cada bloco (DÖRFL, 1985; BERMEJO; HOUBEN; ZEIGLER, 1998; HEATON et al., 2008; HILL et al., 2008).

Os músculos que movimentam as vibrissas recebem inervação principalmente pelos ramos marginal da mandíbula e bucal do nervo facial, com um ou outro ramo capaz de suportar o movimento dinâmico (HILL et al., 2008; HENSTROM et al., 2012). Estudos foram feitos com a utilização de enxerto nervoso a

fim de quantificar a recuperação desses ramos com relação à recuperação após neurografia primária, avaliando o movimento das vibrissas dos animais (HOHMAN et al., 2014).

O ramo bucal do nervo facial apresenta características especiais e grande importância na expressão facial (MELO et al., 2009). Esse ramo ativa os músculos periorais, que são responsáveis pelo movimento das vibrissas nos ratos. Hadlock et al. (2005) observaram que a perda da fibrilação das vibrissas é uma medida precisa, e pode demonstrar o processo de reinervação da musculatura. Refere a utilização desta medida no futuro como um marcador de reinervação significativo.

Fonte: Figura adaptada de HOHMAN et al., 2014.

Figura 2 - Anatomia do nervo facial em ratos.

2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES NERVOSAS

2.2.1 A Regeneração Nervosa

As lesões nervosas podem ocorrer devido a inúmeros processos traumáticos, como por exemplo, acidentes com veículos motorizados, lacerações com objetos pontiagudos, quedas, ferimentos de bala, esmagamento, secção, em uma variedade de circunstâncias, acidentes de trabalho, fraturas, luxações, ressecções tumorais e iatrogênicas (LUNDBORG; MYERS; POWELL, 1983; ROBINSON, 2000; PACHIONI et al., 2006). Cerca de 90% dos acidentes com veículos motorizados são

com motocicletas e cerca de 9% outros tipos de veículos (KOIZUME, 1992). Já a maior frequência das lesões nervosas acontece por trauma contuso, por objetos penetrantes ou outros tipos de objetos (COLOHAN; PITTS; ROSEGAY, 1996). As lesões por esmagamento trazem como consequência, isquemia, edema e alteração na permeabilidade vascular, gerando assim deficiências funcionais (LUNDBORG; MYERS; POWELL, 1983; PACHIONI et al., 2006).

As ressecções tumorais e os traumas podem causar grandes perdas no tecido nervoso gerando dessa forma uma maior dificuldade para a anastomose primária (TERZIS; FAIBISOFF; WILLIAMS, 1975).

A lesão nervosa desencadeia um processo celular devidamente arranjado que induz uma completa desintegração do segmento distal do nervo até o local da lesão, denominado Degeneração Walleriana (DW) (WALLER, 1850). Em sequência há uma desconexão entre os axônios e seus corpos celulares, sendo os axônios rapidamente fragmentados por um processo ativo intrínseco de autodestruição (SAXENA; CARONI, 2007). Devido à perda de contato axonal, a mielinização das células de Schwann (CS) mostram-se em um fenótipo imaturo, iniciam um processo de proliferação e ajudam na degeneração da mielina. Esse processo de DW desencadeia uma forte resposta neuroinflamatória, e acredita-se que as CSs desempenham importante papel nesse momento. As CSs devido a sua proximidade com os nervos são as primeiras a responder aos danos no tecido nervoso, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-1 α e IL-1 β dentro de horas após a lesão do nervo (TASKINEN et al., 2000; SHAMASH; REICHERT; ROTSHENKER, 2002; PERRIN et al., 2005).

Durante as duas ou três semanas após a injúria, todos os axônios e bainha de mielina do coto distal se desintegram e os restos são geralmente removidos, predominantemente por macrófagos e pelas CSs em atividade fagocitária (ALBERTS et al., 1997; FU; GORDON, 1997; WATCHMAKER; MACKINNON, 1997). As CSs dividem-se em no máximo 3 dias e alinham-se dentro do tubo da lâmina basal formando as bandas de Bungner, que conduzirão o caminho para as fibras regeneradas (ALBERTS et al., 1997; FU; GORDON, 1997; STOLL; MÜLLER, 1999).

O sangue contendo macrófagos preenche o espaço entre os cotos nervosos, o coágulo de fibrina é formado e preenchido por capilares, fibroblastos e terminações nervosas, então os brotos de tecido axonal seguem acompanhando as CSs (SUNDERLAND, 1991; LUNDBORG, 2000; HALL, 2001). Ao ser utilizado algum

tipo de enxerto de nervo, este acaba agindo como uma origem de CSs para a sustentação dos brotos axonais e para a condução ao coto distal. Os fatores humorais neurotróficos, neurotrópicos e de um bom alinhamento fascicular garantem a sobrevivência, o crescimento e a distância entre as fibras (LUNDBORG, 2000). Do coto proximal se originam axônios que penetram através do local de reparo e se desenvolvem lentamente, até 1 mm por dia, principalmente nos enxertos. Este é um processo que pode durar por semanas até meses para chegar à placa motora e exercer sua função. Todo o processo de maturação das fibras e sua recuperação, como reparo do volume axonal e espessamento mielínico pode demorar até 5-6 anos, isso de acordo com o local da lesão (KLINE, 1995; SUNDERLAND, 1991; LUNDBORG, 2000; HALL, 2001; BATISTA; ARAÚJO, 2010).

A lesão no nervo periférico induz a inúmeros processos de proteção a este local, produzindo feedbacks negativos para limitar a extensão da lesão no tecido (YDENS et al., 2012).

As medidas da densidade e do diâmetro axonal e a contagem total de axônios no estudo morfométrico são avaliadores do processo de regeneração neural (SZAL; MILLER, 1975; SPECTOR et al., 1993; LEWIN et al., 1997).

Windebank et al., (1985) relatam que não acontecerá o processo de mielinização se o diâmetro do axônio regenerado for menor que 0,7 μm .

Para a avaliação quantitativa da regeneração neural Ochi et al., (1995) utilizam o tamanho e a quantidade de axônios mielinizados. Referem ainda que o aumento do tamanho e da quantidade de axônios não está diretamente relacionado com a melhora funcional do nervo lesado.

2.2.2 Tipos de Lesões

Em 1943, Seddon classificou as lesões nervosas em 3 diferentes tipos, neuropraxia, neurotmele e axonotmele (Figura 3).

A forma mais branda e transitória de lesões em nervos periféricos é a neuropraxia. Considerada como uma lesão nervosa temporária, o nervo acometido se mantém íntegro e há continuidade da bainha endoneural e de seus axônios. Esse tipo de lesão pode acontecer através de trauma ou isquemia local. Como não há perda tecidual e da continuidade axonal também não se inicia a DW e a recuperação total

com função nervosa se dá de forma espontânea, geralmente poucos dias ou semanas após a lesão (SEDDON, 1943).

Já a axonotmese acontece quando há interrupção do axônio, mas a bainha endoneural continua intacta. Um forte trauma fechado, um esmagamento ou uma tração extrema do nervo podem causar esse tipo de lesão. Nesse caso há início do processo de DW ao nível da lesão e no coto distal em um ou dois nodos de Ranvier no coto proximal. Porém como ainda há presença da bainha epineural, a regeneração axonal pode se dar de 1 mm por dia ou de uma polegada por mês, dessa forma a recuperação do nervo se dá entre 2 a 6 meses (NOVAK, et al., 2004).

A forma mais grave de lesão nervosa é a neurotmese, onde há perda completa da continuidade do nervo. Os traumas que levam a esse tipo de lesão são fraturas com deslocamento desfavorável, rompimento do nervo por projéteis de arma de fogo ou ferimentos por arma branca. A recuperação nos casos de neurotmese é pobre, exceto quando as extremidades do nervo permanecerem bem próximas e com orientação apropriada para serem regeneradas (HUPP, 2000).

Em 1951, Sunderland frente a achados histológicos subdividiu as lesões em 5 tipos.

A tipo Sunderland I se caracteriza como a ausência de descontinuidade axonal, correspondendo a neuropraxia; a tipo Sunderland II há perda de continuidade do axônio com presença de endoneuro íntegro, correspondendo a axonotmese; a tipo Sunderland III há integridade do perineuro e do epineuro; a tipo Sunderland IV há rotura com perda de continuidade do perineuro e preservação do epineuro e a lesão tipo Sunderland V seria a própria neurotmese com perda de continuidade do epineuro, sendo necessário o reparo cirúrgico (SUNDERLAND, 1951; SUNDERLAND, 1978).

Fonte: SEDDON, 1943.

Figura 3 - Esquema da classificação das lesões nervosas.

2.3 AS TÉCNICAS DE REPARO DAS LESÕES NERVOSAS

Quando um nervo precisa ser reparado após sua lesão, é importante pontuar que as técnicas de reparação apresentam quatro etapas diferentes, sendo estas, a preparação da extremidade nervosa, a aproximação dessas extremidades, a coaptação e sua correta manutenção. É necessário certificar-se sobre o momento adequado da reparação e deve ser correlacionado com o tipo de lesão. Nos casos de lesões cortantes limpas, uma intervenção de forma precoce é escolhida, devido às razões neurobiológicas, porém quando há lesões cortantes já contaminadas ou infectadas, a escolha se dá após o término do quadro infeccioso (DAHLIN, 2008; LEPSKI; NIKKA; MARCHESE, 2009).

Com estudos posteriores, pode-se compreender cada vez mais a fisiopatologia da lesão nervosa, proporcionando um grande avanço no início da correção. Com os aloenxertos nervosos foi possível preencher grandes defeitos (EVANS, 2001; CAMPBELL, 2008). Devido à busca por técnicas adequadas de reparo em lesões nervosas a fim de trazer recuperação funcional das estruturas por eles inervadas (SEDDON, 1943), observa-se o aprimoramento de técnicas envolvendo enxertias e transposições.

Pode-se citar as técnicas de reparo como, a neurólise externa e interna, reparo término-terminal, reparo com interposição de enxertos e neurotizações ou transferências (LEPSKI; NIKKA; MARCHESE, 2009).

De acordo com a literatura, a técnica considerada padrão-ouro para a reconstrução do nervo facial após a transecção, é a neurografia. Técnica de coaptação das extremidades nervosas separadas, realizada por meio de diferentes modalidades, considerando a reparação primária como técnica de escolha. Quando a lesão não permite ou um comprimento substancial do nervo foi perdido e não é mais possível realizar essa reparação primária, a próxima escolha se deve a interposição ou enxertia viável (OZMEN et al., 2011). Matsuda et al., (2008) observaram que o enxerto realizado de forma término-lateral é uma técnica de fácil execução e proporciona boa recuperação em nervos periféricos lesados.

Dentre outras técnicas para reparação de uma lesão nervosa há também o uso da técnica de tubulização, nesse caso podendo haver adição de fatores com capacidade regenerativa na câmara. A terapia celular juntamente com a engenharia tecidual chega com intuito de estimular e auxiliar a regeneração de nervos periféricos lesados (SEBBEN; LICHTENFELS; SILVA, 2011).

A literatura relata o uso de células-tronco, diferenciadas ou não diferenciadas da medula óssea, tecido adiposo, CS e enxertos venosos ao avesso e normal, preenchidos com plasma rico em plaquetas no processo de tratamento do nervo lesado (MIMURA et al., 2004; BRAGA SILVA et al., 2006; ROQUE, 2007; SINIS et al., 2007; BRAGA-SILVA et al., 2008; ROSA JÚNIOR, 2013; SALOMONE, 2013).

As técnicas envolvem enxertos variados, como tecidos arteriais e venosos (FAWCETT; KEYNES, 1990; TANG et al., 2008), enxerto de nervos periféricos (CHEM, 2003; HADLOCK et al., 2005; SILVA et al., 2010), colágeno, moléculas de adesão celular (BOEDTS; BONCKAERT, 1984; JIN et al., 1990; BERTELLI; MIRA, 1993), tubos de silicone, polietileno, (LI et al., 2004; HISASUE et al., 2005), pericárdio bovino (VIRMOND; PEREIRA, 2000), microssuturas (PLENTS; PARDINI; FREITAS, 2000; ATTAR et al., 2012), retalhos de músculos esqueléticos, sozinhos ou combinados com outros tecidos (CALDER; GREEN, 1995; GEUNA et al., 2000; OLIVEIRA; MAZZER; BARBIERI, 2000), extrato de ginkgo biloba (JANG; CHO; CHOI, 2012) e selante de fibrina derivada de veneno de serpente usado em ratos, coelhos e cães (SANDRINI; PEREIRA-JÚNIOR; GAY-ESCODA, 2007; SILVA et al., 2010; ATTAR et al., 2012) são utilizadas em vários modelos experimentais.

Apesar do desenvolvimento de técnicas cirúrgicas meticulosas com diferentes métodos de reparação, associado à busca por resultados totalmente funcionais, este raramente é alcançado (LEE; WOLFE, 2000).

Em casos de avulsões de raízes nervosas da medula espinhal, foram feitas tentativas experimentais para sua reimplantação utilizando suturas com fio 9.0 não reabsorvível (Ethicon®), cola de tecido (Tisseel®), cola de fibrina (Tissucol®; Baxter BV Utrecht, Holanda) e também enxertos nervosos. Devido à grande delicadeza das estruturas nervosas da medula espinhal autores aconselham a utilização de selantes teciduais (HALLIN et al., 1999; EGGERS et al., 2010; BITAR-ALATORRE et al., 2011; BARBIZAN et al., 2013).

2.3.1 Técnicas de enxerto de nervo

Quando não é possível realizar a sutura término-terminal em casos de perda de continuidade nervosa há indicação de colocação de enxerto autólogo, também servindo como fonte endógena de CSs. Porém existem relatos das desvantagens desse tipo de enxerto, como a escassez de doadores, as sequelas neurais depois de retirado o enxerto e a presença de resultados ineficientes. Já nos casos de aloenxertos estes não são bem quistos, pois precisam de imunossupressão e são comumente rejeitados (LADAK et al., 2011; KEILHOFF; FANSA, 2011; WANG et al., 2011).

A técnica de tubulização se deve a introdução das extremidades do nervo que foi seccionado em uma estrutura tubular onde pode ou não conter substâncias que promovam o processo de regeneração. A tubulização é utilizada nos casos em que há perda de grande extensão do nervo permitindo-se que o broto axonal se desenvolva de forma direcionada ao crescimento distal e também que ocorra sua mielinização (DOOLABH; HERTL; MACKINNON, 1996; BATTISTON et al., 2005).

2.3.2 Neurorrafias

Em relação à cirurgia para reparo de nervo periférico, ainda há uma controvérsia na escolha de nervos doadores para a neurotização (transferência de nervo) gerada pela falta de estudos concretos nesta área (HANINEC et al., 2013).

Em 1992, Viterbo et al. redescobrem a neurorrafia término-lateral. Técnica que se baseia na regeneração do nervo lesionado garantindo o surgimento de novos axônios, característica importante da neuroplasticidade intacta do nervo doador

(VITERBO et al., 1992). Esta técnica tem sido alvo de estudos teóricos e experimentais, porém ainda é controversa (HANINEC et al., 2013).

2.3.3 Neurorrafia Término-lateral

De acordo com a literatura, a origem da neurorrafia término-lateral não está claramente definida (PAPALIA et al., 2007). Os estudos iniciais são datados de Letievant (1873), Huber (1895) e Kennedy (1899) (apud SATO, 2005; PAPALIA et al., 2007), porém a maior parte dos autores se refere à Ballance, Ballance e Stewart (1903) como os pioneiros (SILVA, 2008).

No estudo de Ballance, Ballance e Stewart (1903) (SILVA, 2008) realizou-se neurorrafia término-lateral do nervo facial à face lateral do nervo acessório com uma abertura epineural, com o objetivo de recuperar os movimentos faciais paralisados. Observaram que ao ocorrer a movimentação da face também havia movimentos associados dos ombros. Após esse momento, não houve muitos outros estudos seguindo a linha de pesquisa desse autor, devido às complicações de confirmação e reprodução da técnica (BABCOCK, 1927; LIU et al., 1999; SILVA, 2008).

Esta técnica foi retomada por Viterbo et al., (1992) e permite a passagem dos axônios para a regeneração do nervo lesado, de forma a manter o trofismo muscular correspondente por meio de uma sutura lateral. O diferencial de tal técnica, mudando o conceito pré-existente, está relacionado à presença do perineuro que não impede a regeneração axonal ou a passagem da estimulação elétrica. É observado que há possibilidade de utilização deste tipo de sutura, permitindo uma recuperação nervosa com apenas uma extremidade distal, sendo possível a reparação sem comprometer o nervo funcionalmente. A neurorrafia término-lateral pode ser usada em uma série de lesões nervosas periféricas, como por exemplo, a paralisia facial e a paralisia do plexo braquial, através de mioneurotizações diretas, e entre outros (HUARACA; VITERBO, 2010).

A neurorrafia término-lateral é definida como a coaptação de um dos segmentos do nervo lesado à face lateral de um nervo saudável próximo (Figura 4) (OĞÜN et al., 2003; ULKÜR et al., 2003).

Fonte: HUARACA; VITERBO, 2010.

Figura 4 - Esquema da neurografia término-lateral pura.

Explica-se que a neurografia término-lateral permite, a partir do nervo íntegro, um brotamento lateral dos axônios até atingirem o órgão-alvo específico de forma a reestabelecer suas funções sensitiva e motora. Retomando que tal procedimento é rápido, relativamente simples e seguro, já que não causaria lesões no nervo doador e em nenhum outro local saudável (VITERBO et al., 1992; MENNEN, 2003). Porém autores relatam que esta seria uma excelente técnica se não apresentasse suas contradições (PANNUCCI et al., 2007). Viterbo et al. (1992) expõem que não há necessidade de uma epineurectomia prévia no nervo doador para que haja o brotamento lateral (SOUZA et al., 2011).

Diversos estudos estão aplicando a técnica de neurografia término-lateral ou adaptações desta técnica e mostrando seus benefícios (al-QATTAN; al-THUNYAN, 1998; MUELLER; OLIVEIRA NETO; FRANCIOSI, 2009; RAY et al., 2010; SOUZA et al., 2011; LIU et al., 2014; WAN et al., 2014). Estudos mostram a diminuição da atrofia muscular em casos onde se usou a neurografia término-lateral no nervo que supria o músculo se comparado a técnica de neurografia término-terminal (SHEA et al., 2014).

2.3.4 O selante de fibrina

Segundo Fattahi et al., 2004, os selantes de fibrina são utilizados no intuito de harmonizar as bordas do local da ferida ou para proporcionar uma aderência dos tecidos. A partir dessa abordagem, citam-se três tipos básicos de selantes com fibrina, os autólogos e os homólogos, originados a partir da formação de um crioprecipitado e o considerado sintético/comercial (FATTAHI et al., 2004).

O selante de fibrina derivado do veneno de serpente (*Crotalus durissus terrificus*) foi desenvolvido em 1989 por pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP – UNESP – Botucatu, SP). O principal objetivo foi produzir um selante de fibrina sem utilização de sangue humano, com o intuito de evitar a transmissão de doenças infecciosas. Esse novo selante de fibrina mostra-se como uma ferramenta útil clinicamente, devido à sua flexibilidade e diversidade de aplicações. É um selante biológico e biodegradável, com características diferenciais, que não produz reações adversas, não contém sangue humano, tem boa capacidade adesiva, não transmite doenças infecciosas, podendo assim ser utilizado como coadjuvante em procedimentos de sutura convencional (BARROS et al., 2009).

O selante de fibrina tem a capacidade hemostática, proporcionando melhores resultados devido a diminuição da perda de sangue. Apresenta a capacidade de selar os tecidos evitando a perda de fluidos e melhorando sua adesão e não deixando que ocorra formação de espaços entre eles, além de acelerar o tempo cirúrgico e suas complicações (BARROS et al., 2009).

Este selante apresenta potencial econômico efetivo, já que pode proporcionar uma redução do tempo de permanência na unidade de cuidados intensivos e do tempo de internação hospitalar. Também proporciona uma redução nos custos relacionados às complicações de transfusões (BARROS et al., 2009).

É utilizada uma fração do complexo gíoxina a partir do veneno da cobra em vez de trombina bovina. As substâncias presentes neste selante imitam os passos fisiológicos finais na cascata da coagulação, chegando ao final na formação de coágulos. Apresenta-se como uma alternativa mais econômica se comparado às colas comerciais, além de sua simples aplicação em modelos animais. Neste contexto apresenta-se com um potencial instrumento para o tratamento de lesões do SNC e SNP (BARROS et al., 2009; BARBIZAN et al., 2013).

As serino proteinases presentes no veneno de cobra além de manter várias funções do organismo como no processo de digestão, ativação do sistema complemento, na diferenciação celular e hemostasia, não são letais por si próprias, porém tem efeito tóxico ao serem associadas com outras proteínas do veneno. Dessa forma afetam os passos na cascata de coagulação sanguínea, ou agem na degradação proteolítica e com ativação ou inibição de algum fator sanguíneo

específico envolvido no processo de agregação plaquetária, de coagulação e de fibrinólise (BRAUD; BOM; WISNER, 2000; SERRANO; MAROUN, 2005).

O selante de fibrina mais conhecido no mundo é a cola de fibrina Tissucol® (Baxter AG, Viena, Áustria). Essa cola apresenta em sua composição uma parte de fibrinogênio liofilizado associado a uma solução de aprotimina e uma parte de trombina liofilizada associada a solução de cloreto de cálcio. Este fibrinogênio juntamente com a trombina são homogeneizados através de Duploject® (Baxter AG, Viena, Áustria), formando nesse momento uma solução que se solidifica, ocasionando assim uma obstrução plasmática. Como citado anteriormente, essa cola de fibrina causa a formação de um coágulo precoce, ausência de hematomas e diminui o tempo do processo de reparação nervosa (SANDRINI; PEREIRA-JÚNIOR; GAY-ESCODA, 2007).

A cola de fibrina Tissucol®, bem como o PEG (polyethylene glycol) e os cianocriolatos são alvo de pesquisa para se tornarem métodos alternativos no reparo nervoso, já que a técnica cirúrgica por sutura para reparação destes nervos necessita de prévia manipulação dos cotos, ocasionando uma alteração no alinhamento axonal, e a formação de granulomas e fibroses (SANDRINI; PEREIRA-JÚNIOR; GAY-ESCODA, 2007; ATTAR et al., 2012).

Estudos realizados em coelhos mostraram que pequenas quantidades da cola de fibrina são suficientes para a anastomose de terminações nervosas. A principal vantagem é que ela não causa reações de corpo estranho ou cicatrizes, ao contrário da sutura realizada com fio de nylon (JÚNIOR; VALMASEDA-CASTELLÓN; GAY-ESCODA, 2004). Assim, o uso do selante de fibrina pode minimizar a manipulação dos cotos, evitando a presença de nylon dentro do tecido nervoso. Pode melhorar os resultados, já que é atraumática e reduz o tempo cirúrgico (SILVA et al., 2010; KNOX et al., 2013).

Na literatura atual o uso do selante de fibrina tem sido empregado para reparação dos nervos periféricos de forma complementar ou para substituir a sutura. Porém ainda existe uma controvérsia sobre essa substituição da sutura tradicional pelo selante de fibrina (SAMEEM; WOOD; BAIN, 2011; BUCHAIM et al., 2015). O uso do selante de fibrina está sendo testado em pesquisas atuais (SILVA, 2008; BHANDARI, 2013; FÉLIX et al., 2013; BUCHAIM, 2014).

Observa-se uma necessidade frequente para que haja o reparo no nervo facial, no entanto há um número pequeno de relatos publicados abordando o uso do

selante de fibrina neste nervo, já que a maioria dos estudos anteriores foi realizada em modelos de nervo isquiático. O modelo animal que tem sido mais utilizado para observar a eficácia do selante de fibrina é o rato. Este animal é um modelo popular para que se possa analisar a regeneração do nervo facial devido à dinâmica e a mensuração dos movimentos das vibrissas do animal (HEATON et al., 2014). Até o momento, somente um pequeno número de estudos examinou o processo de recuperação de movimento após a utilização do selante de fibrina na reparação do nervo facial (MURRAY; WILLINS; MOUNTAIN, 1994; FARRAG et al., 2007; SAMEEM; WOOD; BAIN, 2011; KNOX et al., 2013). Para esta avaliação foi utilizada uma escala de 5 pontos, em vez de ser objetivamente quantificada, esta escala também foi utilizada na avaliação quando usou-se fio de sutura (de FARIA et al., 2006). Há um crescente aumento na disponibilidade de sistemas de avaliação de movimentos das associado a uma compreensão do fornecimento de motor, servindo para análise da função, com o intuito de comparar o uso do selante de fibrina e a utilização de sutura no modelo do nervo facial de ratos usando uma avaliação quantitativa (BERMEJO et al., 2004; FARRAG et al., 2007; HADLOCK et al., 2007; HEATON et al., 2008; KNOX et al., 2013).

Choi et al. (2014) encontraram bons resultados utilizando cola de fibrina para reparação do nervo facial após este ser seccionado em uma cirurgia de ressecção de Schwannoma.

A cola de fibrina disponível no comércio tem sido empregada na reparação de plexo braquial e lesões de nervos periféricos (BARBIZAN et al., 2013). Relata-se certa facilidade de execução na utilização da cola e uma redução no tempo gasto para fixação do nervo, força nos locais de coaptação e recuperação funcional final. Observou-se que para a coaptação de nervos lesados com o uso de cola de fibrina foi utilizada uma lupa para aumento, não necessitando de um microscópio para a operação. Há também a característica do local de coaptação ser suficiente para manter as extremidades unidas. A diferença mais importante no uso de cola de fibrina é a redução no tempo cirúrgico de quase 30% ao ser comparado com as técnicas de neurografia convencionais com uso de fios de sutura. Outro quesito apontado é em relação aos resultados funcionais, geralmente semelhantes aos obtidos quando se utiliza uma neurografia (BHANDARI, 2013).

2.3.5 A Laserterapia

Para melhorar a recuperação dos nervos lesionados, algumas técnicas não cirúrgicas foram desenvolvidas como complemento para o processo de reinervação. As terapias conservadoras geralmente dão enfoque ao controle da dor neuropática, algumas destas modalidades têm sido experimentadas no processo de cicatrização nervosa e restauração de sua função em modelos animais e necessitam ser traduzidas para a prática clínica (MARTÍNEZ DE ALBORNOZ et al., 2011).

A utilização da luz de baixa intensidade vem crescendo nas áreas biomédicas, da fisioterapia, quiropraxia e odontologia, com o intuito de estimular a regeneração de axônios e também em quadros dolorosos e inflamatórios (MALUF et al., 2006; HASHMI et al., 2010; BUCHAIM et al., 2015).

O significado da palavra laser é originado de uma sigla que corresponde a *light amplification by stimulated emission of radiation*, sendo traduzida como “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação”. Apresenta a capacidade de estimular organismo a desenvolver uma melhor resposta frente a um processo inflamatório, resultando em redução de edema, diminuindo a sensação de dor e gerando uma bioestimulação celular. Concluindo que a terapia por laser é uma alternativa crescente em processos inflamatórios, dolorosos e que necessitam de regeneração dos tecidos (MALUF et al., 2006; LINS et al., 2010).

A fototerapia a laser ou chamada laserterapia apresenta baixo consumo de energia e causa aumento e/ou aceleração na recuperação dos nervos periféricos lesados além de diminuir ou impedir o processo de atrofia muscular associada a lesão nervosa (ROCHKIND; GEUNA; SHAINBERG, 2009). Esta terapia altera a atividade das células nervosas induzindo a regulação de vários fatores de crescimento neurotróficos e proteínas da matriz extracelular que fazem suporte ao crescimento neuronal (ZUIJDENDORP et al., 2008). Além de seu efeito protetor imediato, a laserterapia é capaz de manter a atividade funcional do nervo lesado por um longo período, reduz a formação de cicatriz no local da lesão e também a degeneração relacionada com os neurônios motores da medula espinal e ocasiona um aumento significativo no crescimento axonal e na mielinização (ROCHKIND; GEUNA; SHAINBERG, 2009).

A laserterapia apresenta como efeitos terapêuticos, analgesia local, ação antiedematosa, anti-inflamatória e cicatrizante. Observa-se também o efeito

bioestimulativo trófico tissular, como o incremento da velocidade de crescimento dos nervos seccionados (AGNE, 2008).

Somente na década de 1980 houve um aumento do interesse científico nessa abordagem terapêutica para a reabilitação nervosa (GIGO-BENATO et al., 2005; ROCHKIND, 2009).

Estudos demonstram o estímulo bioquímico a níveis celulares e teciduais nos músculos que receberam aplicação do laser depois de ocorrida lesão no nervo isquiático de ratos por esmagamento, reconstrução término-lateral ou tubulização (ROCHKIND et al., 2007a). Observou-se o crescimento axonal de células nervosas embrionárias em cérebros de ratos referenciando futuros estudos controlados em humanos para quantificar a eficácia da laserterapia com 780 nm (ROCHKIND et al., 2007b). Também se observou achados positivos na regeneração do nervo isquiático de ratos com uso do laser com 904 nm (CÂMARA et al., 2011).

O uso de laser de baixa potência (780 nm) em pacientes com lesões nervosas periféricas incompletas por um período de seis meses a vários anos demonstrou efeito imediato de proteção, manutenção da funcionalidade nervosa, diminuição do tecido cicatricial e da degeneração de neurônios motores correspondentes da medula espinhal. Além de significativo crescimento axonal e mielinização (ROCHKIND, 2009).

Alcântara et al. (2013) observaram em seu estudo que o laser de baixa intensidade modula o processo inflamatório na fase aguda da recuperação do nervo lesado, causando um aumento principalmente MMP-9 e do fator alfa de necrose tumoral (TNF α), do teor de proteína, não modificando a expressão dos genes inflamatórios. A utilização clínica do laser de baixa intensidade após uma lesão pode estimular o processo de reabilitação assim resultando em uma maior recuperação funcional.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o processo de reparação do ramo bucal do nervo facial lesionado utilizando a técnica término-lateral de duas diferentes formas, com o selante de fibrina derivado do veneno de serpente (CEVAP, UNESP/Botucatu, SP, Brasil) e a sutura epineural tradicional, associadas ou não ao tratamento com laser de baixa potência.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Comparar a regeneração nervosa do nervo facial submetido à neurrorrafia epineural término-lateral por meio de sutura convencional com a coaptação utilizando selante de fibrina derivado do veneno de serpente;

b) Verificar a influência da laserterapia na regeneração do nervo facial submetido à neurrorrafia epineural término-lateral por meio de sutura convencional com a coaptação utilizando selante de fibrina derivado do veneno de serpente;

c) Analisar a recuperação dos movimentos das vibrissas do rato, utilizando-se a sutura epineural e o selante de fibrina derivado do veneno de serpente, com a associação ou não da laserterapia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Toda esta pesquisa foi conduzida frente à aprovação do Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA) sob N° 007/2013, da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (FOB – USP).

As técnicas cirúrgicas descritas, processamento histológico e morfométrico foram realizados no Laboratório de Anatomia da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (FOB – USP).

4.1 OS ANIMAIS E O DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para esta pesquisa foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, com 80 dias de idade, pesando entre 220-250 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru (Universidade de São Paulo – FOB/USP).

Os animais foram separados em 4 (quatro) grupos experimentais e 1 (um) grupo controle, assim constituídos:

1. Grupo Experimental Sutura Epineural Término-lateral (GES) e Grupo Experimental Selante de Fibrina (GEF), constituído por 12 animais, onde no lado direito da face o ramo bucal do nervo facial foi seccionado e seu coto proximal foi suturado à tela subcutânea e o coto distal realizado a sutura epineural término-lateral ao ramo zigomático do nervo facial. No lado esquerdo da face foram realizados os mesmos procedimentos descritos, porém utilizou-se o selante de fibrina.

2. Grupo Experimental Sutura Epineural Término-lateral e Laserterapia (GESL) e Grupo Experimental Selante de Fibrina e Laserterapia (GEFL) constituído por 12 animais, onde no lado direito da face o ramo bucal do nervo facial foi seccionado e seu coto proximal suturado à tela subcutânea e o coto distal realizada a sutura epineural término-lateral ao ramo zigomático do nervo facial. No lado esquerdo da face foram realizados os mesmos procedimentos descritos, porém utilizou-se o selante de fibrina derivado de veneno de serpente, para coaptação das extremidades, ambos os locais operados foram submetidos à aplicação de Laser GaAIs de pulso contínuo.

3. Grupo Controle – GC: Constituído de oito animais, que não foram submetidos à cirurgia e nem ao laser.

4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais foram previamente pesados e submetidos à anestesia geral com injeção do anestésico Zoletil 50® (Virbac do Brasil) que contém a proporção 1:1 (125:125 mg) de Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepam (0,15 ml/kg/IM). O lado direito da face foi tricotomizado e recebeu assepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo (PVPI 10% de Iodo Ativo, Rioquímica, São Paulo, Brasil) e os animais foram posicionados em decúbito lateral em goteira cirúrgica. Em seguida, foi realizada uma incisão linear no lado direito da face com aproximadamente 1 cm de comprimento (Figura 5A). Após a incisão, realizou-se a divulsão e afastamento dos tecidos (Figura 5B) para exposição dos ramos bucal e zigomático do nervo facial sobre o músculo masseter (Figura 6).

Em sequência, com auxílio do microscópio cirúrgico (DF Vasconcelos) (Figura 7) pode-se isolar os ramos bucal e zigomático do nervo facial (Figuras 8A e 8B) e em seguida ocorreu a secção do ramo bucal do nervo facial com tesoura cirúrgica de ponta reta (Figura 9A). Após a secção, o coto distal do ramo bucal do nervo facial foi posicionado de forma término-lateral ao ramo zigomático do nervo facial (Figura 9B). No coto distal foi realizada sutura epineural término-lateral ao ramo zigomático do nervo facial utilizando fio de nylon 10-0 Ethicon Ethilon® (Johnson & Johnson do Brasil) (Figuras 10A e 11).

Figura 5 - (A) Incisão cirúrgica; (B) Divulsão dos tecidos.

Figura 6 - Exposição dos ramos bucal e zigomático do nervo facial.

Figura 7 - Microscópio cirúrgico DF Vasconcelos.

Figura 8 - (A) Isolamento do ramo bucal do nervo facial; (B) Isolamento do ramo zigomático do nervo facial.

Figura 9 - (A) Secção do ramo bucal do nervo facial com tesoura; (B) Posicionamento do ramo bucal do nervo facial de forma término-lateral ao ramo zigomático do nervo facial.

Figura 10 – (A) Ramo bucal do nervo facial suturado de forma término-lateral ao ramo zigomático do nervo facial com fio 10.0; (B) Ramo bucal do nervo facial coaptado ao ramo zigomático do nervo facial com aplicação do selante de fibrina.

Figura 11 - Fio de sutura 10.0 utilizado para neurorrafia do nervo facial.

Os mesmos procedimentos citados anteriormente também foram realizados no lado esquerdo da face do animal. Porém após a secção do ramo bucal do nervo facial, seu coto distal foi coaptado de forma término-lateral com o ramo zigomático do nervo facial através da técnica do selante de fibrina, derivado do veneno de serpente, utilizando uma micropipeta da marca Guibson (Figura 10B). O selante

de fibrina derivado de veneno de serpente foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP (CEVAP), cujos componentes e fórmula de aplicação constam das suas patentes (Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360). No momento do uso os componentes foram previamente descongelados, reconstituídos, misturados e aplicados de acordo com o protocolo do presente projeto (THOMAZINI-SANTOS et al., 2001; BARROS et al., 2009; BARROS et al., 2011; GASPAROTTO et al. 2014; FERREIRA JUNIOR, 2014).

Este selante é composto por três soluções separadas e homogêneas antes de sua aplicação, totalizando 8 µl. O primeiro frasco possui fibrinogênio obtido a partir de sangue de búfalo (5 µl), o segundo contém cloreto de cálcio (2 µl) e, o último frasco possui uma fração de trombina-like (1 µl). As soluções foram mantidas no freezer para sua adequada conservação.

Ao final da aplicação dos três componentes, houve espera de 10 segundos para secagem do selante e logo em seguida realizada uma leve tração dos nervos para certificação da aderência.

O coto proximal do ramo bucal de cada face do animal foi suturado à tela subcutânea da face (Figura 12A). Para finalizar o procedimento cirúrgico, a pele de ambos os lados recebeu suturas utilizando-se fio de seda 4-0 Ethicon Ethilon® (Johnson & Johnson do Brasil) (Figura 12B). Ao término da cirurgia os animais foram mantidos em caixas aquecidas para prevenção de hipertermia, até que se recuperassem da anestesia.

Figura 12 - (A) Coto proximal do ramo bucal do nervo facial suturado à tela subcutânea; (B) Pele suturada com fio de seda 4.0.

Os animais do GESL e GEFL receberam tratamento com Laser GaAIAs (Arseneto de Gálio Alumínio) com aparelho (Laserpulse IBRAMED, Amparo, SP, Brasil) (Figura 13). A aplicação foi efetuada com a caneta Laser de comprimento de onda de 830 nm, utilizando-se 6 J/cm², em 3 diferentes pontos da cirurgia de cada lado, em pulso contínuo, durante 24 segundos. A distância da caneta Laser ao tecido alvo foi de aproximadamente 4 mm (Figura 14). As aplicações iniciaram-se no pós-cirúrgico e três vezes por semana, durante cinco semanas (GIGO-BENATO et al., 2005). Em todas as aplicações, as emissões do feixe de laser receberam calibração no próprio aparelho.

Figura 13 - Aparelho Laserpulse e caneta Ibramed 830 nm utilizados.

Figura 14 - Aplicação do Laser nos animais.

Nos animais do GC foi realizada a coleta do ramo bucal do nervo facial para a análise do nervo íntegro, sem cirurgias e sem aplicação de laser.

Durante as dez semanas pós-cirurgia os animais foram submetidos à observação da mímica facial de forma espontânea e com estímulo do observador. O animal foi avaliado individualmente em uma caixa de papelão com a face interna na cor preta (para maior clareza na observação das vibrissas) (Figura 15). O observador aplicou estímulos ao bater as palmas das mãos de 3 a 4 vezes para desencadear melhor movimentação das vibrissas. A observação foi feita sempre pelo mesmo avaliador. As médias das medidas foram verificadas na quinta e décima semana após a cirurgia. O observador classificou os movimentos das vibrissas de acordo com a escala abaixo (de FARIA et al., 2006) (Tabela 1).

Figura 15 - Análise do movimento das vibrissas.

Tabela 1 - Tabela utilizada para análise do movimento das vibrissas.

ESCALA DE OBSERVAÇÃO DAS VIBRISSAS		
PONTUAÇÃO	MOVIMENTO	POSIÇÃO
1	Sem Movimento	Posterior
2	Tremor Leve	Posterior
3	Tremor Maior	Posterior
4	Movimento Normal	Posterior
5	Movimento Normal	Anterior

Os animais foram mantidos, no pré e pós-cirúrgico, em caixas com água e ração "ad libitum", respeitando-se ciclos de 12 horas de luz. Decorridas 10 semanas pós-cirurgia, doze animais de cada Grupo Experimental e oito animais do Grupo Controle, foram eutanasiados por injeção de *overdose* de anestésico.

4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA

Depois de colhidas todas as amostras dos nervos, estas foram fixadas primeiramente em solução de Karnovsky durante 24 horas. Após este momento, as amostras foram lavadas 3 vezes em tampão fosfato durante 5 minutos para retirada do fixador e logo em seguida, desidratadas. Para este passo, as amostras permaneceram em solução de álcool 70% por 24 horas, e em seguida, por mais 2 horas em solução de álcool 95% juntamente com a resina (Leica® Histoiresin) pelo período de 8 horas.

Logo após, foi realizado o processo de infiltração, sendo que as amostras permaneceram em resina (Leica® Histoiresin) por 8 horas. Em sequência, iniciou-se a inclusão das amostras, onde os fragmentos foram posicionados adequadamente em moldes plásticos e devidamente identificados. Nesse momento, os moldes foram preenchidos com historesina juntamente com o endurecedor. Para a polimerização completa, as amostras permaneceram em estufa à 60°C durante 48 horas.

Após certificado o endurecimento das amostras, foi iniciado o processo de cortes histológicos, realizados em micrótomo semiautomático (Model RM2245, Leica Microsystems®, Germany) (Figura 16) com espessura de 5 µm. Os cortes obtidos foram capturados no banho histológico e, as lâminas, permaneceram em estufa à 60°C durante 2 horas para a completa secagem.

Em seguida, foi utilizado Azul de Toluidina a 1% nas lâminas para coloração dos cortes. Terminada a coloração, os cortes foram analisados em microscópio óptico para a seleção de áreas específicas para a MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão).

Para realização da MET, os blocos foram retrimados, seccionados com 60 a 80 nm de espessura no ultramicrotomo LBK BROMA 8800 ULTRATOME. Receberam acetato de Uranila e citrato de Chumbo para coloração e analisados e

fotografados no MET PHILLIPS EM 301 do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, UNESP - Campus de Botucatu.

Figura 16 - Micrótomo Leica® RM 2245 utilizado para confecção dos cortes e obtenção das lâminas.

4.4 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DOS RESULTADOS (MORFOMETRIA)

Para a realização da análise morfológica e morfométrica, após a coleta, fixação, inclusão e coloração dos cortes obtidos dos 5 grupos, as imagens foram capturadas no microscópio Olympus® BX50 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) com a câmera digital acoplada (Olympus DP 71, Tokyo, Japan).

Foram mensurados na morfometria, a área e o diâmetro da fibra nervosa, a área e o diâmetro do axônio e a área e espessura da bainha de mielina, por meio de contagem de 220 fibras de cada nervo por animal de cada grupo para a análise morfológica quanto à presença de axônios (habituais ou regenerados) e distribuição das fibras (Figura 17).

Figura 17 - Exemplo das mensurações feitas na morfometria.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise quantitativa foi realizada no computador através do programa Image Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetics; Bethesda, MD, USA), todos instalados no Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP/Bauru. Para análise estatística utilizou-se o teste de análise de variância ANOVA com pós-teste de Tukey. O nível de significância para as comparações determinado foi $p < 0,05$. Para análise funcional das vibrissas foram determinados os valores médios dos grupos nos períodos avaliados

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 OBSERVAÇÕES E ANÁLISES HISTOMORFOLÓGICAS (MICROSCOPIA ÓPTICA)

De maneira geral, na avaliação por microscopia óptica feita junto às lâminas histológicas dos nervos, observou-se presença de fibras mielínicas e também fibras amielínicas nos grupos experimentais. As fibras apresentaram-se irregulares e com diâmetros heterogêneos, caracterizando o processo de regeneração. A seguir serão descritos os resultados após 10 semanas de cirurgia dos grupos experimentais e do grupo controle.

5.1.1 Período de dez semanas pós-cirurgia

Características morfológicas observadas nas secções transversais do coto distal do ramo bucal do nervo facial (Figura 18):

- Em nervo íntegro, no GC, as fibras mielínicas apresentaram conformação de regularidade (Figura 18A);
 - Nos grupos experimentais GES e GEF observou-se presença de vasos sanguíneos, e as fibras mielínicas regeneradas apresentaram desigualdades na conformação em relação à morfologia e disposição dos axônios (Figuras 18B e 18C);
 - Nos grupos GESL e GEFL manteve-se o padrão de irregularidades para as fibras mielínicas, axônios com disposição desiguais, caracterizando o processo de regeneração, com predomínio de fibras mielínicas (Figuras 18D e 18E).
-
-

Figura 18 - Imagens de microscopia ótica dos grupos: (A) GC, (B) GES, (C) GEF, (D) GESL e (E) GEFL. A marcação (↓) aponta a fibra mielínica, a (◆) indica vaso sanguíneo.

5.2 OBSERVAÇÕES E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

5.2.1 Período de dez semanas pós-cirurgia

Características histomorfométricas das variáveis mensuradas:

Os gráficos a seguir mostram os resultados das áreas da fibra, do axônio e da bainha de mielina (Figura 19). Observou-se diferença significativa somente em relação à área da fibra nervosa entre os grupos GEF e GEFL ($p < 0,05$).

Figura 19 - Gráficos com os resultados morfométricos dos grupos experimentais e grupo controle.

Os gráficos a seguir mostram os resultados do diâmetro da fibra, do axônio e espessura da bainha de mielina (Figura 20). Observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos estudados ($p < 0,05$).

Figura 20 - Gráficos com os resultados morfométricos dos grupos experimentais e grupo controle.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

5.3.1 Período de dez semanas pós-cirurgia

Características observadas nas amostras na microscopia eletrônica de transmissão (Figura 21):

- No GC observa-se a uniformidade das fibras mielínicas quanto ao seu diâmetro e formato, além de evidentes núcleos das células de Schwann (Figura 21A);
 - Nos grupos experimentais GES e GEF as fibras mielínicas estão presentes e dispostas de forma ordenada, porém com irregularidades em seu formato, se comparado às amielínicas. Evidenciaram-se também núcleos das células de Schwann (Figuras 21B e 21C);
 - Nos grupos experimentais GESL e GEFL, as fibras mielínicas presentes estão semelhantes ao GES e GEF, assim como ocorreu a presença de fibras colágenas (Figuras 21D e 21E).
-
-

Figura 21 - As imagens demonstram a MET dos grupos: (A) GC, (B) GES, (C) GEF, (D) GESL e (E) GEFL. A marcação (↓) aponta a fibra mielínica, (◇) indica região com fibras amielínicas, (●) indica fibras colágenas, (★) indica o núcleo da Célula de Schwann.

5.4 ANÁLISE DOS MOVIMENTOS DAS VIBRISSAS

O GC foi utilizado como parâmetro de normalidade de acordo com a literatura para os movimentos e a posição das vibrissas (Figuras 22A e 22B), sendo classificado com 5 pontos os parâmetros da Tabela 1 (página 37).

Figura 22 - Imagens referentes à avaliação da posição das vibrissas na 5ª semana (A) e 10ª semana (B) do GC.

Na 5ª semana após a cirurgia, o GES e GEF obtiveram pontuação média de 4 e 4,2 respectivamente (Figura 23A), já o GESL e GEFL, que receberam aplicação do laser de baixa intensidade tiveram valores médios de 4,4 e 4,6 respectivamente (Figuras 24A).

Na 10ª semana após a cirurgia, foi observado que GES e GEF obtiveram pontuação média de 4,4 e 4,6 respectivamente (Figura 23B). Já GESL e GEFL tiveram valores médios de 4,7 e 4,8 respectivamente (Figura 24B). A escala refere pontuação 4 como movimento normal com posicionamento posterior das vibrissas e pontuação 5 como movimento normal das vibrissas com posicionamento anterior.

Figura 23 - Imagens referentes à avaliação da posição das vibrissas na 5ª semana (A) e 10ª semana (B) pós-cirúrgica do GES e GEF.

Figura 24 - Imagens referentes à avaliação da posição das vibrissas na 5ª semana (A) e 10ª semana (B) semana pós-cirúrgica do GESL e GEFL.

Nos gráficos (Figura 25) são apresentados os valores médios em relação à pontuação da movimentação e posicionamento das vibrissas, no período de 5 e 10 semanas, em todos os grupos.

Figura 25 - Resultados da análise de movimentação e posicionamento das vibrissa

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo comparar o processo de regeneração do ramo bucal do nervo facial fazendo uso da técnica de coaptação término-lateral de duas diferentes formas, utilizando o novo selante heterólogo de fibrina derivado do veneno de serpente e a sutura epineural tradicional, associadas ou não ao tratamento com laserterapia de baixa potência. Os resultados permitiram concluir que a utilização do selante de fibrina é um método eficaz na reparação de nervos periféricos lesados e que a laserterapia auxilia nesse processo.

A lesão do nervo facial pode acarretar inúmeras consequências, tanto sociais quanto psicológicas, devido às alterações na expressão facial. Desse modo estudos tem abordado o presente tema a fim de elucidar sobre uma melhor forma de reparo (BORIN et al., 2006; de FARIA et al., 2006; MAGILL et al., 2010; HONTANILLA; MARRE; CABELLO, 2013; TOROS et al., 2013; VITERBO et al., 2014; HUANG et al., 2015; MATSUDA et al., 2015; OKOCHI et al., 2015).

Os achados da presente pesquisa demonstram que a sutura epineural término-lateral apresentou bons resultados relacionados ao processo de regeneração nervosa equiparando-se ao padrão-ouro da literatura (término-terminal). Estudos realizados por Johnson; Soucacos (2008) e Cruz Filho; Aquino; Oliveira (2013) apontam que para a reparação nervosa a técnica de eleição é a sutura epineural término-terminal. Porém, quando a extremidade proximal do nervo lesado não está presente para possibilitar a reparação tradicional, a sutura epineural término-lateral sem utilização de janela epineural é descrita como opção e apresenta o diferencial de não alterar a função nervosa (HUARACA; VITERBO, 2010). Estudos apontam que a técnica de neurografia término-lateral ou adaptações desta técnica apresentam benefícios (al-QATTAN; al-THUNYAN, 1998; MUELLER; OLIVEIRA NETO; FRANCIOSI, 2009; RAY et al., 2010; SOUZA et al., 2011; LIU et al., 2014; WAN et al., 2014), como por exemplo, redução da atrofia muscular (SHEA et al., 2014).

O rato macho foi o modelo animal de eleição para este estudo, assim como experimentos anteriores descritos na literatura. O rato apresenta seu nervo facial comparável ao dos seres humanos, tem manejo fácil para cirurgia e pode ser mantido em gaiolas coletivas além de ser capaz de alimentar-se tecnicamente bem apesar da lesão nervosa (BORIN et al., 2006; de FARIA et al., 2006; HUNDESHAGEN et al.,

2013; BUCHAIM et al., 2015). Existem relatos de estudos sobre o nervo facial com diversos outros animais como coelho (SPECTOR et al., 1991), hamster (KINDERMAN; JONES, 1994) e camundongos (FAWCETT, 1998).

Foi possível observar a presença de fibras mielínicas e também fibras amielínicas regeneradas em todos os grupos experimentais desta pesquisa. As fibras apresentaram-se irregulares e com diâmetros heterogêneos, características de fibras em processo de regeneração. Estes resultados caminham em concordância com Matsuda et al. (2015), Okochi et al. (2015) e Tos et al. (2014) que apontam a utilização de enxerto nervoso com sutura término-lateral como uma técnica de fácil realização, exige menos material e é eficaz em modelos experimentais. Em tais estudos houve presença de axônios em regeneração, sua distribuição para os nervos receptores e exibição de cotos reinervados, concluindo ser uma opção útil na reconstrução do nervo facial. Os resultados também estão de acordo com estudo de Buchaim (2014) onde observaram vasos sanguíneos nos animais dos grupos experimentais, firmando ser um importante fator no processo de regeneração para os tecidos que compõe o organismo.

Dentre as variáveis analisadas na histomorfometria, foi verificado que a área da fibra nervosa apresentou diferença significativa entre os grupos GEF e GEFL, sendo que o GEFL obteve melhores resultados provavelmente pela associação da laserterapia. Ochi et al. (1995) relataram que o aumento e largura do axônio pode não repercutir diretamente na melhoria funcional, mas diferentemente Grosheva et al. (2008b) discorrem que se houver falha na orientação do crescimento axonal, as medidas de espessura e diâmetro do axônio podem distorcer o resultado funcional adequado (SALOMONE et al., 2013). Como descrito em estudos, ao penetrar nos tecidos, a luz do laser, pode estimular o aumento da produção de ATP mitocondrial, do aporte sanguíneo, das células de Schwann, da síntese de colágeno com melhor organização e da proliferação celular, além de seus efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-edematosos. Também há relação entre axônios mielínicos de maior diâmetro e uma melhora da marcha no nervo isquiático em ratos, tornando a recuperação nervosa mais rápida e eficiente (ENDO et al., 2008; BARBOSA et al., 2010; MARCOLINO et al., 2010; CÂMARA et al., 2011; MEDALHA et al., 2012; ALCÂNTARA et al., 2013; AKGUL; GULSOY; GULCUR, 2014; CHEN et al., 2014; GUERRA et al., 2014).

Após avaliação pela microscopia eletrônica de transmissão, em todos os grupos, foram observadas fibras mielínicas dispostas ordenadamente, porém com formato irregular nos grupos experimentais, além da presença de fibras amielínicas, núcleos das células de Schwann e fibras colágenas. Tais achados são pontuados em estudos envolvendo a regeneração nervosa, com presença de fibras mielínicas e amielínicas próximas ao núcleo e fibras colágenas caracterizando uma orientação ainda aleatória do tecido em regeneração (BUCHAIM, 2014). Assim como descrito, as fibras colágenas oferecem sustentação biológica para o crescimento e diferenciação das células (WAITAYAWINYU et al., 2007; MOORE et al., 2012), que estavam presentes também nos grupos que receberam a laserterapia, confirmando o descrito na literatura, que o laser proporciona síntese de colágeno com melhor organização (LINS et al., 2010; MARCOLINO et al., 2010; AKGUL; GULSOY; GULCUR, 2014; CHEN et al., 2014;

Os achados deste trabalho em relação à funcionalidade demonstram a recuperação parcial dos movimentos das vibrissas na 5ª semana pós-cirurgia dos grupos experimentais e equiparando-se ao grupo controle nos movimentos ao final da 10ª semana. Tais resultados vão ao encontro com a literatura, já que o movimento das vibrissas está relacionado com a funcionalidade do movimento facial associado ao correto processo de regeneração do nervo facial (FRYKMAN; MCMILLAN; YEGGE, 1988; HEATON et al., 2014). Existem variados modelos de escalas clínicas para avaliação do movimento das vibrissas (JONES, 1993; JONES; BROWN; DAMASER, 2001) sendo que neste estudo foi selecionada a escala sugerida por de FARIA et al. (2006), em virtude da viabilidade e facilidade de condução e análise.

Dentre os grupos experimentais, nos dois períodos analisados, os que apresentaram melhor recuperação funcional foram GESL e GEFL, em especial o grupo que utilizou o selante de fibrina associado à laserterapia (GEFL). O uso do selante de fibrina apresentou os resultados funcionais, com maiores médias, em relação aos grupos com sutura, divergindo do estudo de Farrag et al. (2007) que perceberam uma melhor recuperação dos movimentos das vibrissas utilizando a sutura se comparado ao selante de fibrina (Tisseel®, Baxter Health Care, Westlake Village, CA). Na atual pesquisa, os achados vão ao encontro da maioria dos autores mostrando que a laserterapia tende a resultados mais funcionais, e divergindo da pesquisa de Dias et al. (2013), onde demonstraram que a laserterapia em nervo isquiático esmagado não foi tão eficiente em sua recuperação.

Foi observado no presente estudo que o selante de fibrina reduz o tempo cirúrgico e apresenta maior facilidade de aplicação, mantendo a funcionalidade e sendo uma alternativa para o reparo nervoso periférico (BUCHAIM et al., 2015). De forma semelhante aos moldes do estudo de Knox et al. (2013), onde não houve diferença significativa para a amplitude, velocidade ou aceleração das vibrissas dos animais onde a técnica utilizada foi a sutura epineural e o selante de fibrina. No entanto, ao ser aplicado o selante de fibrina, houve redução em 70% no tempo cirúrgico se comparado à sutura epineural.

Tanto a neurografia término-lateral quanto a coaptação término-lateral proporcionaram neste estudo e, também em estudos semelhantes (SANTOS, 2007; BUCHAIM et al., 2015), a migração de axônios para o coto distal. O selante de fibrina apresenta a vantagem e propriedades de ser uma substância adesiva, que não utiliza sangue humano, reduzindo o risco de contaminação (BARROS et al., 2009).

O uso da terapia por laser de baixa intensidade e, se possível, de forma mais precoce, é recomendável após a lesão do nervo periférico. Decorridas 10 semanas de pós-cirúrgico foi possível evidenciar uma regeneração axonal e recuperação funcional eficiente com a laserterapia. Estes resultados vão ao encontro com o estudo de Buchaim (2014) realizado nos moldes da presente pesquisa, porém utilizando a técnica término-terminal para neurografia ou coaptação com selante de fibrina. A aplicação do laser de baixa intensidade acelerando a recuperação de lesões nervosas se torna uma importante ferramenta de áreas da saúde como, por exemplo, fisioterapia, odontologia e medicina, no processo de reabilitação pós-traumática (GIGO-BENATO et al., 2005).

Tendo em vista a rápida e constante evolução nas pesquisas sobre o assunto, ocorreram limitações neste estudo como, por exemplo, análises que envolvam eletromiografia e estudo da condução de impulso nervoso. Perspectivas futuras de novos estudos se apresentam principalmente envolvendo a utilização do novo selante heterólogo de fibrina como um sistema de armação associado a células tronco em técnicas de regeneração tecidual.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Ao final desta pesquisa, utilizando a metodologia específica e analisando os dados obtidos, foi possível concluir que:

- a) Os dois métodos analisados para reparação nervosa periférica foram efetivos, permitindo o brotamento axonal no coto distal;
 - b) A laserterapia proporcionou os melhores resultados, demonstrando inclusive diferença significativa na análise da área da fibra nervosa na comparação entre GEF e GEFL;
 - c) A recuperação funcional baseada na análise da movimentação das vibrissas apresentou melhores resultados nos grupos com uso do selante de fibrina, sendo que os grupos associados à laserterapia (GESL e GEFL) foram os que mais se aproximaram do GC.
-
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

(Formato Vancouver)

- Agne JE. Laserterapia. In: Agne JE. Eletrotermoterapia – Teoria e Prática. Santa Maria: Orium; 2008. p. 309-328.
- Akgul T, Gulsoy M, Gulcur HO. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan;29(1):351-7.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Ralf M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.
- Alcântara CC, Gigo-Benato D, Salvini TF, Oliveira AL, Anders JJ, Russo TL. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute neural recovery and inflammation-related gene expression after crush injury in rat sciatic nerve. *Lasers Surg Med*. 2013 Apr;45(4):246-52.
- al-Qattan MM, al-Thunyan A. Variables affecting axonal regeneration following end-to-side neurorrhaphy. *Br J Plast Surg*. 1998 Apr;51(3):238-42.
- Attar BM, Zalzal H, Razavi M, Ghoreishian M, Rezaei M. Effectiveness of fibrin adhesive in facial nerve anastomosis in dogs compared with standard microsuturing technique. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Oct;70(10):2427-32.
- Babcock WW. A standard technique for operations on peripheral nerves with special reference to the closure of large gaps. *Surg Gynecol Obstet*. 1927;45:364-78.
- Ballance CA, Ballance HA, Stewart P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. *Br Med J*. 1903 May 2;1(2209):1009-13.
- Barbizan R, Castro MV, Rodrigues AC, Barraviera B, Ferreira RS, Oliveira AL. Motor recovery and synaptic preservation after ventral root avulsion and repair with a fibrin sealant derived from snake venom. *PLoS One*. 2013 May 7;8(5):e63260.
- Barbosa RI, Marcolino AM, de Jesus Guirro RR, Mazzer N, Barbieri CH, de Cássia Registro Fonseca M. Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci*. 2010 May;25(3):423-30.
- Barros LC, Ferreira RS Jr, Barraviera SR, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJ, et al. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2009 Oct;12(8):553-71.
- Barros LC, Soares AM, Costa FL, Rodrigues VM, Fuly AL, Giglio JR, et al. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2011;17(1):23-33.
- Batista KT, Araújo HJ. Microcirurgia das lesões traumáticas de nervo periférico do membro superior. *Rev. Bras. Cir. Plást*. 2010; 25(4):708-14.
-

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. *Microsurgery*. 2005;25(4):258-67.

Bento RF, Miniti A. Comparison between fibrin tissue adhesive, epineural suture and natural union in intratemporal facial nerve of cats. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1989;465:1-36.

Bento RF, Miniti A, Ruocco JR. Traumatic peripheral facial palsy. In: Portmann M. *Facial Nerve*. Paris; 1985. p. 299-303.

Bermejo R, Houben D, Zeigler HP. Optoelectronic monitoring of individual whisker movements in rats. *J Neurosci Methods*. 1998 Sep 1;83(2):89-96.

Bermejo R, Szwed M, Friedman W, Ahissar E, Zeigler HP. One whisker whisking: unit recording during conditioned whisking in rats. *Somatosens Mot Res*. 2004 Sep-Dec;21(3-4):183-7.

Bertelli JA, Mira JC. Nerve repair using freezing and fibrin glue: immediate histologic improvement of axonal coaptation. *Microsurgery*. 1993;14(2):135-40.

Bhandari PS. Use of fibrin glue in the repair of brachial plexus and peripheral nerve injuries. *The Indian Journal of Neurotrauma*. 2013;10:30-32.

Bitar-Alatorre WE, Segura-Torres JE, Rosales-Corral SA, Jiménez-Avila JM, Huerta-Viera M. Quadriplegia recovery after hemi-section and transplant model of spinal cord at the level of C5 and C6. *Neurosci Lett*. 2011 Mar 10;491(1):18-22.

Boedts D, Bouckaert JI. [Nerve anastomoses. Sutures or fibrinogen glue? Preliminary results]. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 1984;38(2):107-12.

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 Nov-Dec;72(6):775-84.

Braga Silva J, Gehlen D, Javier ARR, Menta C, Atkinson EA, Machado DC, et al. Efeitos das células-tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em rato. *Acta Ortop Bras*. 2006;14(5):273-5.

Braga-Silva J, Gehlen D, Padoin AV, Machado DC, Garicochea B, Costa da Costa J. Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human median and ulnar nerves? *J Hand Surg Eur Vol*. 2008 Aug;33(4):488-93.

Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. 2000 Sep-Oct;82(9-10):851-9.

Buchaim DV. Reparo do nervo facial com sutura epineural térmico-terminal e coaptação com adesivo de fibrina em ratos associado ou não a laserterapia [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2014.

Buchaim RL, Andreo JC, Barraviera B, Ferreira Junior RS, Buchaim DV, Rosa Junior GM, et al. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. *Injury*. 2015 Apr;46(4):655-60.

Calder JS, Green CJ. Nerve-muscle sandwich grafts: the importance of Schwann cells in peripheral nerve regeneration through muscle basal lamina conduits. *J Hand Surg Br*. 1995 Aug;20(4):423-8.

Câmara CN, Brito MV, Silveira EL, Silva DS, Simões VR, Pontes RW. Histological analysis of low-intensity laser therapy effects in peripheral nerve regeneration in Wistar rats. *Acta Cir Bras*. 2011 Feb;26(1):12-8.

Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol*. 2008 Sep;119(9):1951-65.

Chem EM. Uso da cola de fibrina na anastomose nervosa: estudo comparativo experimental, em ratos [dissertação]. Porto Alegre (RS): Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.

Chen YJ, Wang YH, Wang CZ, Ho ML, Kuo PL, Huang MH, et al. Effect of low level laser therapy on chronic compression of the dorsal root ganglion. *PLoS One*. 2014 Mar 4;9(3):e89894.

Choi KS, Kim MS, Jang SH, Kim OL. Preservation of Facial Nerve Function Repaired by Using Fibrin Glue-Coated Collagen Fleece for a Totally Transected Facial Nerve during Vestibular Schwannoma Surgery. *J Korean Neurosurg Soc*. 2014 Apr;55(4):208-11.

Colohan AR, Pitts LH, Rosegay H. Injury to the peripheral nerves. In: Feliciano DV, Moore EE, Mattox KL (Eds.) *Trauma* 3rd ed. Stamford, Conn: Appleton & Lange; 1996. p. 853-862.

Cruz Filho NÁ, Aquino JE, Oliveira LF. Facial nerve grafting and end-to-end anastomosis in the middle ear: tympanic cavity and mastoid. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2013 Aug;79(4):441-5.

Dahlin LB. Techniques of peripheral nerve repair. *Scand J Surg*. 2008;97(4):310-6.

Dangelo JG, Fattini CA. Anatomia humana sistêmica e segmentar. 3ed. São Paulo: Atheneu; 2007.

de Faria SD, Testa JR, Borin A, Toledo RN. Standardization of techniques used in facial nerve section and facial movement evaluation in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006 May-Jun;72(3):341-7.

Dias FJ, Issa JP, Iyomasa MM, Coutinho-Netto J, Calzzani RA, Iyomasa DM, et al. Application of a low-level laser therapy and the purified protein from natural latex (*Hevea brasiliensis*) in the controlled crush injury of the sciatic nerve of rats: a morphological, quantitative, and ultrastructural study. *Biomed Res Int*. 2013;2013:597863.

Doolabh VB, Hertl MC, Mackinnon SE. The role of conduits in nerve repair: a review. *Rev Neurosci*. 1996 Jan-Mar;7(1):47-84.

Dörfl J. The innervation of the mystacial region of the white mouse: A topographical study. *J Anat*. 1985 Oct;142:173-84.

Eggers R, Tannemaat MR, Ehlert EM, Verhaagen J. A spatio-temporal analysis of motoneuron survival, axonal regeneration and neurotrophic factor expression after lumbar ventral root avulsion and implantation. *Exp Neurol*. 2010 May;223(1):207-20.

Endo C, Barbieri CH, Mazzer N, Fasan VS. Low-power laser therapy accelerates peripheral nerves' regeneration. *Acta Ortop Bras*. 2008; 16(5):305-10.

Evans GR. Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol*. 2000 Oct - Nov;19(3):312-8.

Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec*. 2001 Aug 1;263(4):396-404.

Farrag TY, Lehar M, Verhaegen P, Carson KA, Byrne PJ. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *Laryngoscope*. 2007 Jan;117(1):157-65.

Fattahi T, Mohan M, Caldwell GT. Clinical applications of fibrin sealants. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Feb;62(2):218-24.

Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 1990;13:43-60.

Fawcett JP, Bamji SX, Causing CG, Aloyz R, Ase AR, Reader TA, et al. Functional evidence that BDNF is an anterograde neuronal trophic factor in the CNS. *J Neurosci*. 1998 Apr 15;18(8):2808-21.

Fehrenbach MJ, Herring S. Sistema Nervoso. In: Fehrenbach MJ, Herring S. *Anatomia ilustrada da cabeça e do pescoço*. São Paulo: Editora Manole. 1998. p. 195-215.

Félix SP, Pereira Lopes FR, Marques SA, Martinez AM. Comparison between suture and fibrin glue on repair by direct coaptation or tubulization of injured mouse sciatic nerve. *Microsurgery*. 2013 Sep;33(6):468-77.

Ferreira Junior RS. Autologous or heterologous fibrin sealant scaffold: which is the better choice? *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2014 Jul 18;20:31.

- Frykman GK, McMillan PJ, Yegge S. A review of experimental methods measuring peripheral nerve regeneration in animals. *Orthop Clin North Am.* 1988 Jan;19(1):209-19.
- Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997 Feb-Apr;14(1-2):67-116.
- Gasparotto VP, Landim-Alvarenga FC, Oliveira AL, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera B, et al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2014 Jun10;5(3):78.
- Geuna S, Tos P, Fornaro M, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG. New insights into nerve fiber regeneration along non-nervous grafts used to bridge peripheral nerve defects. In: 5^o Workshop Internacional de Microcirurgia e Cirurgia de Mão, Unesp Botucatu, 2000. p.23
- Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle Nerve.* 2005 Jun;31(6):694-701.
- Greene EC. The anatomy of the rat. Michigan: Hafner Pub; 1955.
- Grosheva M, Guntinas-Lichius O, Angelova SK, Kuerten S, Alvanou A, Streppel M, et al. Local stabilization of microtubule assembly improves recovery of facial nerve function after repair. *Exp Neurol.* 2008 Jan;209(1):131-44.(a)
- Grosheva M, Guntinas-Lichius O, Arnhold S, Skouras E, Kuerten S, Streppel M, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation does not improve quality of muscle reinnervation or recovery motor functional after facial nerve transection in rats. *Biol Chem* 2008;389:873–888.(b)
- Guerra FR, Vieira CP, dos Santos de Almeida M, Oliveira LP, Claro AC, Simões GF, et al. Pulsed LLLT improves tendon healing in rats: a biochemical, organizational, and functional evaluation. *Lasers Med Sci.* 2014 Mar;29(2):805-11.
- Hadlock T, Kowaleski J, Mackinnon S, Heaton JT. A novel method of head fixation for the study of rodent facial function. *Exp Neurol.* 2007 May;205(1):279-82.
- 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 Jan- Feb;7(1):17-20.
- Hall S. Nerve repair: a neurobiologist's view. *J Hand Surg Br.* 2001 Apr;26(2):129-36.
- Hallin RG, Carlstedt T, Nilsson-Remahl I, Risling M. Spinal cord implantation of avulsed ventral roots in primates; correlation between restored motor function and morphology. *Exp Brain Res.* 1999 Feb;124(3):304-10.
- Haninec P, Mencl L, Kaiser R. End-to-side neurorrhaphy in brachial plexus reconstruction. *J Neurosurg.* 2013 Sep;119(3):689-94.
-

Hashmi JT, Huang YY, Sharma SK, Kurup DB, De Taboada L, Carroll JD, et al. Effect of pulsing in low-level light therapy. *Lasers Surg Med*. 2010 Aug;42(6):450-66.

Heaton JT, Kowaleski JM, Bermejo R, Zeigler HP, Ahlgren DJ, Hadlock TA. A system for studying facial nerve function in rats through simultaneous bilateral monitoring of eyelid and whisker movements. *J Neurosci Methods*. 2008 Jun 30;171(2):197-206.

Heaton JT, Sheu SH, Hohman MH, Knox CJ, Weinberg JS, Kleiss IJ, et al. Rat whisker movement after facial nerve lesion: evidence for autonomic contraction of skeletal muscle. *Neuroscience*. 2014 Apr 18;265:9-20.

Hebel R, Stromberg MW. *Anatomy of the laboratory rat*. Baltimore: Williams Wilkins Co; 1976.

Henstrom D, Hadlock T, Lindsay R, Knox CJ, Malo J, Vakharia KT, et al. The convergence of facial nerve branches providing whisker pad motor supply in rats: implications for facial reanimation study. *Muscle Nerve*. 2012 May;45(5):692-7.

Hill DN, Bermejo R, Zeigler HP, Kleinfeld D. Biomechanics of the vibrissa motor plant in rat: rhythmic whisking consists of triphasic neuromuscular activity. *J Neurosci*. 2008 Mar 26;28(13):3438-55.

Hisasue S, Kato R, Sato Y, Suetomi T, Tabata Y, Tsukamoto T. Cavernous nerve reconstruction with a biodegradable conduit graft and collagen sponge in the rat. *J Urol*. 2005 Jan;173(1):286-91.

Hohman MH, Kleiss IJ, Knox CJ, Weinberg JS, Heaton JT, Hadlock TA. Functional recovery after facial nerve cable grafting in a rodent model. *JAMA Facial Plast Surg*. 2014 Jan-Feb;16(1):20-4.

Hontanilla B, Marre D, Cabello A. Facial reanimation with gracilis muscle transfer neurotized to cross-facial nerve graft versus masseteric nerve: a comparative study using the FACIAL CLIMA evaluating system. *Plast Reconstr Surg*. 2013 Jun;131(6):1241-52.

Huang JT, Wang GD, Wang da L, Liu Y, Zhang XY, Zhao YF. A novel videographic method for quantitatively tracking vibrissal motor recovery following facial nerve injuries in rats. *J Neurosci Methods*. 2015 Jul 15;249:16-21.

Huaraca WF, Viterbo F. Historia de la Neurorrafia Término-Lateral - Revisión de Técnica Quirúrgica. *Revista Médica de Nuestros Hospitales*. 2010;16(1):5-9.

Hundeshagen G, Szameit K, Thieme H, Finkensieper M, Angelov DN, Guntinas-Lichius O, et al. Deficient functional recovery after facial nerve crush in rats is associated with restricted rearrangements of synaptic terminals in the facial nucleus. *Neuroscience*. 2013 Sep 17;248:307-18.

Hupp JR. *Neuropatologia Facial*. In: *Cirurgia Maxilofacial Contemporânea*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 678-691, 2000.

Jang CH, Cho YB, Choi CH. Effect of ginkgo biloba extract on recovery after facial nerve crush injury in the rat. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012 Dec;76(12):1823-6.

Jin Y, Dehesdin D, Hemet J, Bagot D'arc C, Creissard P, Tadie M. [Comparative experimental study of nerve repairs by classical suture or biological adhesive]. *Neurochirurgie*. 1990;36(6):378-82.

Johnson EO, Soucacos PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides. *Injury*. 2008 Sep;39 Suppl 3:S30-6.

Jones KJ, Brown TJ, Damaser M. Neuroprotective effects of gonadal steroids on regenerating peripheral motoneurons. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001 Nov;37(1-3):372-82.

Jones KJ. Recovery from facial paralysis following crush injury of the facial nerve in hamsters: differential effects of gender and androgen exposure. *Exp Neurol*. 1993 May;121(1):133-8.

Júnior ED, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C. Facial nerve repair with epineural suture and anastomosis using fibrin adhesive: an experimental study in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Dec;62(12):1524-9.

Keilhoff G, Fansa H. Mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration - a real hope or just an empty promise? *Exp Neurol*. 2011 Dec;232(2):110-3.

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 Mar;126(1):144-8.

Kline DG. Mechanisms and pathology of injury. In: Kline DG, Hudson AR, eds. *Nerve injuries: operative results for major nerve injuries, entrapments, and tumors*. Philadelphia:WB Saunders;1995.

Knox CJ, Hohman MH, Kleiss IJ, Weinberg JS, Heaton JT, Hadlock TA. Facial nerve repair: fibrin adhesive coaptation versus epineurial suture repair in a rodent model. *Laryngoscope*. 2013 Jul;123(7):1618-21.

Koizume, MS. Padrão das lesões nas vítimas de acidentes de motocicleta. *Rev Saúde Pública*. 1992 Oct; 26(5):306-315.

Labrador RO, Butí M, Navarro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol*. 1998 Jan;149(1):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 Apr;228(2):242-52.

Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg*. 2000 Jul-Aug;8(4):243-52.

Lepski G, Nikka G, Marchese AJT. Neurosurgery of peripheral Nerves. In: Treaty of operatoria technique in neurosurgery. Atheneu, São Paulo; 2009 (1): 621-627.

Lewin SL, Utlely 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 Jul;107(7):992-9.

Li J, Yan JG, Ai X, Hu S, Gu YD, Matloub HS, et al. Ultrastructural analysis of peripheral-nerve regeneration within a nerve conduit. *J Reconstr Microsurg*. 2004 Oct;20(7):565-9.

Lins RD, Dantas EM, Lucena KC, Catão MH, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An Bras Dermatol*. 2010 Nov-Dec;85(6):849-55.

Liu HF, Chen ZG, Fang TL, Arnold P, Lineaweaver WC, Zhang J. Changes of the donor nerve in end-to-side neurorrhaphies with epineurial window and partial neurectomy: a long-term evaluation in the rat model. *Microsurgery*. 2014 Feb;34(2):136-44.

Liu K, Chen LE, Seaber AV, Goldner RV, Urbaniak JR. Motor functional and morphological findings following end-to-side neurorrhaphy in the rat model. *J Orthop Res*. 1999 Mar;17(2):293-300.

Lundborg G, Dahlin L, Danielsen N, Zhao Q. Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg*. 1994 Sep;10(5):345-54.

Lundborg G, Myers R, Powell H. Nerve compression injury and increased endoneurial fluid pressure: a "miniature compartment syndrome". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1983 Dec;46(12):1119-24.

Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am*. 2000 May;25(3):391-414.

Lynch PJ. Head facial nerve superflcial branches. Dec 2006. Disponível em: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Head_facial_nerve_branches.jpg. Acessado em: 20/04/2015.

Machado A, Haertel LM. Neuroanatomia funcional, 3ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2013.

Magill CK, Moore AM, Borschel GH, Mackinnon SE. A new model for facial nerve research: the novel transgenic Thy1-GFP rat. *Arch Facial Plast Surg*. 2010 Sep-Oct;12(5):315-20.

Maluf AP, Ughini GC, Maluf RP, Pagnoncelli RM. Utilização de laser terapêutico em exodontia de terceiros molares inferiores. *RGO*. 2006;54:182-4.

Marcolino AM, Barbosa RI, Neves LMS, Vinas TS, Duarte DTB, Mazzer N, et al. Laser de baixa intensidade (830 nm) na recuperação funcional do nervo isquiático de ratos. *Acta ortop. bras.* [Internet]. 2010 [cited 2015 Nov 07]; 18(4): 207-211. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-78522010000400007&lng=en.

Martínez de Albornoz P, Delgado PJ, Forriol F, Maffulli N. Non-surgical therapies for peripheral nerve injury. *Br Med Bull.* 2011;100:73-100.

Matsuda K, Kakibuchi M, Kubo T, Tomita K, Fujiwara T, Hattori R, et al. A new model of end-to-side nerve graft for multiple branch reconstruction: end-to-side cross-face nerve graft in rats. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008 Nov;61(11):1357-67.

Matsuda K, Kakibuchi M, Sotsuka Y, Kubo T, Shibata M, Hosokawa K. End-to-side "loop" graft for total facial nerve reconstruction: Over 10 years experience. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2015 Aug;68(8):1054-63.

Mattox DE, Felix H. Surgical anatomy of the rat facial nerve. *Am J Otol.* 1987 Jan;8(1):43-7.

May M, Schaitkin BM. *The facial nerve.* 2ed New York: Thieme; 2000.

Medalha CC, Di Gangi GC, Barbosa CB, Fernandes M, Aguiar O, Faloppa F, et al. Low-level laser therapy improves repair following complete resection of the sciatic nerve in rats. *Lasers Med Sci.* 2012 May;27(3):629-35.

Melo CGS, Shinohara AL, Andreo JC, Rodrigues AC. Morphological Study of Myoneural Interaction between the Levator Labii Superioris Muscle and its Motor Nerve in Rats. *Int. J. Morphol.* 2009;27(3):627-34.

Mennen U. End-to-side nerve suture in clinical practice. *Hand Surg.* 2003 Jul;8(1):33-42.

Mimura T, Dezawa M, Kanno H, Sawada H, Yamamoto I. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J Neurosurg.* 2004 Nov;101(5):806-12.

Moore AC, Mark TE, Hogan AK, Topczewski J, LeClair EE. Peripheral axons of the adult zebrafish maxillary barbel extensively remyelinate during sensory appendage regeneration. *J Comp Neurol.* 2012 Dec 15;520(18):4184-203.

Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. *Anatomia orientada para a clínica.* 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

Mueller SF, Oliveira Neto FV, Franciosi LF. Modelo experimental do uso da neurografia término-lateral em plexo braquial de ratos. *Rev. Bras. Cir. Plást.* 2009; 24(4): 420-4.

Murray JA, Willins M, Mountain RE. A comparison of glue and a tube as an anastomotic agent to repair the divided buccal branch of the rat facial nerve. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1994 Jun;19(3):190-2.

Novak CB, Mackinnon SE, Baratz ME. Peripheral Nerves Injuries. *Plast. Reconstr. Surg.* 2004;114(7):1802-1814 and discussion -1815-1817.

Ochi M, Noda M, Nakamitsu K, Deie M, Ikuta Y, Maki Y, et al. Promotion of sciatic nerve regeneration in rats by a new neurotrophic pyrimidine derivative MS-430. *Gen Pharmacol.* 1995 Jan;26(1):59-64.

Oğün TC, Ozdemir M, Senaran H, Ustün ME. End-to-side neurorrhaphy as a salvage procedure for irreparable nerve injuries. Technical note. *J Neurosurg.* 2003 Jul;99(1):180-5.

Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH. Use of a skeletal muscle basal membrane graft to treat segmentary nerve lesions experimental study in the sciatic nerve of rats. In: 5^o Workshop Internacional de Microcirurgia e Cirurgia de Mão, Unesp Botucatu, 2000, p.6.

Okochi M, Ueda K, Okochi H, Asai E, Sakaba T, Kajikawa A. Facial reanimation using hypoglossal-facial neurorrhaphy with end-to-side coaptation between the jump interpositional nerve graft and hypoglossal nerve: Outcome and duration of preoperative paralysis. *Microsurgery.* 2015 Aug 28. doi: 10.1002/micr.22393. [Epub ahead of print]

Ozmen OA, Falcioni M, Lauda L, Sanna M. Outcomes of facial nerve grafting in 155 cases: predictive value of history and preoperative function. *Otol Neurotol.* 2011 Oct;32(8):1341-6.

Pachioni CAS, Mazzer N, Barbieri CH, Fazan VP, Padovani CR, Moro CA, et al. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. *Acta Ortopédica Brasileira.* 2006;14(4):203-207.

Pannucci C, Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hayashi A. End-to-side nerve repair: review of the literature. *Restor Neurol Neurosci.* 2007;25(1):45-63.

Papalia I, Geuna S, D'Alcontres FS, Tos P. Origin and history of end-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery.* 2007;27(1):56-61.

Perrin FE, Lacroix S, Avilés-Trigueros M, David S. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1alpha and interleukin-1beta in Wallerian degeneration. *Brain.* 2005 Apr;128(Pt 4):854-66.

Plents EG, Pardini AG, Freitas AD. Sensitive evaluation after end-to-side neurorrhaphy of digital colateral nerves. In: 5^o Workshop Internacional de Microcirurgia e Cirurgia de Mão, Unesp Botucatu, 2000. p.20.

Ray WZ, Kasukurthi R, Yee A, Mackinnon SE. Functional recovery following an end to side neurorrhaphy of the accessory nerve to the suprascapular nerve: case report. *Hand (N Y).* 2010 Sep;5(3):313-7.

Rizzolo RJC, Madeira MC. Sistema Nervoso. In: Rizzolo RJC, Madeira MC. Anatomia Facial com fundamentos de anatomia geral, 3ed., São Paulo: Sarvier; 2009. p.225-232.

Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. Muscle Nerve. 2000 Jun;23(6):863-73.

Rochkind S, Drory V, Alon M, Nissan M, Ouaknine GE. Laser phototherapy (780 nm), a new modality in treatment of long-term incomplete peripheral nerve injury: a randomized double-blind placebo-controlled study. Photomed Laser Surg. 2007 Oct;25(5):436-42. (b)

Rochkind S, Geuna S, Shainberg A. Chapter 25: Phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration. Int Rev Neurobiol. 2009;87:445-64.

Rochkind S, Leider-Trejo L, Nissan M, Shamir MH, Kharenko O, Alon M. Efficacy of 780-nm laser phototherapy on peripheral nerve regeneration after neurotube reconstruction procedure (double-blind randomized study). Photomed Laser Surg. 2007 Jun;25(3):137-43. (a)

Rochkind S. Phototherapy in peripheral nerve regeneration: From basic science to clinical study. Neurosurg Focus. 2009 Feb;26(2):E8.

Roque JS. Enxertos venosos ao avesso e normal, preenchidos com plasma rico em plaquetas em nervo misto de rato. [tese]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2007.

Rosa Junior GM. Reparo de Nervo periférico utilizando a veia Jugular como tubo associado à cultura de Células-Tronco extraídas de tecido Adiposo. Estudo no rato [tese]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2013

Rydevik B, Lundborg G. Permeability of intraneural microvessels and perineurium following acute, graded experimental nerve compression. Scand J Plast Reconstr Surg. 1977;11(3):179-87.

Salomone R. Regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos após implantação de células multipotentes do estroma mesenquimal indiferenciadas e diferenciadas *in vitro* que apresentam fenótipo de células de Schwann. [tese]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Salomone R, Bento RF, Costa HJ, Azzi-Nogueira D, Ovando PC, Da-Silva CF, et al. Bone marrow stem cells in facial nerve regeneration from isolated stumps. Muscle Nerve. 2013 Sep;48(3):423-9.

Sameem M, Wood TJ, Bain JR. A systematic review on the use of fibrin glue for peripheral nerve repair. Plast Reconstr Surg. 2011 Jun;127(6):2381-90.

Sandrini FA, Pereira-Júnior ED, Gay-Escoda C. Rabbit facial nerve anastomosis with fibrin glue: nerve conduction velocity evaluation. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2007 Mar-Apr;73(2):196-201.

Santos NB. Estudo da regeneração axonal em enxerto nervoso sensitivo (n.sural) autó logo a partir de nervo craniano intacto (n.vago) [dissertação na internet]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25142/tde-25052010-140810/> [acesso 06.11.15].

Sato KM. Comparação de neurorrafias término-terminais e término-laterais na reconstrução do nervo mediano: pesquisa experimental em ratos Wistar adultos [monografia]. Florianópolis (SC): Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.

Saxena S, Caroni P. Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. *Prog Neurobiol*. 2007 Oct;83(3):174-91.

Sebben AD, Lichtenfels M, Silva JLB. Regeneração de nervos periféricos: terapia celular e fatores neurotróficos. *Rev Bras Ortop*. 2011;46(6):643-49.

Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain*, 1943;66:237-88.

Serrano SM, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. 2005 Jun 15;45(8):1115-32.

Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci*. 2002 Apr 15;22(8):3052-60.

Shea JE, Garlick JW, Salama ME, Mendenhall SD, Moran LA, Agarwal JP. Side-to-side nerve bridges reduce muscle atrophy after peripheral nerve injury in a rodent model. *J Surg Res*. 2014 Mar;187(1):350-8.

Silva DN, Coelho J, Frazílio Fde O, Odashiro AN, Carvalho Pde T, Pontes ER, et al. End-to-side nerve repair using fibrin glue in rats. *Acta Cir Bras*. 2010 Apr;25(2):158-62.

Silva DN. Anastomose nervosa término-lateral utilizando cola de fibrina. Estudo experimental em ratos [dissertação]. Campo Grande (MS): Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2008.

Sinis N, Schaller HE, Becker ST, Schlosshauer B, Doser M, Roesner H, et al. Long nerve gaps limit the regenerative potential of bioartificial nerve conduits filled with Schwann cells. *Restor Neurol Neurosci*. 2007;25(2):131-41.

Souza FI, Santos GB, Silva CF, Mattar Júnior R, Zumiotti AV. Avaliação histológica da neurorrafia término-lateral. Estudo experimental em ratos. *Acta Ortop Bras*. 2011;19(3):129-31.

Spector JG, Lee P, Derby A, Friedrich GE, Neises G, Roufa DG. Rabbit facial nerve regeneration in NGF-containing silastic tubes. *Laryngoscope*. 1993 May;103(5):548-58.

Spector JG, Lee P, Derby A, Roufa DG. Early stages of facial nerve regeneration through silicone chambers in the rabbit. *Laryngoscope*. 1991 Oct;101(10):1109-23.

Stoll G, Müller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol*. 1999 Apr;9(2):313-25.

Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*. 1951 Dec;74(4):491-516.

Sunderland S. Nerve injuries and their repair. A critical appraisal. Edinburgh:Churchill Livingstone; 1991.

Sunderland, S. Nerves and nerve injuries. New York: Churchill Livingstone, 1978.

Szal GJ, Miller T. Surgical repair of facial nerve branches. An analysis of different sheathing and suturing techniques. *Arch Otolaryngol*. 1975 Mar;101(3):160-5.

Tang J, Wang XM, Hu J, Luo E, Qi MC. Autogenous standard versus inside-out vein graft to repair facial nerve in rabbits. *Chin J Traumatol*. 2008 Apr;11(2):104-9.

Taskinen HS, Olsson T, Bucht A, Khademi M, Svelander L, Røyttä M. Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN-gamma, IL-10 and TNF-alpha mRNA. *J Neuroimmunol*. 2000 Jan 3;102(1):17-25.

Terzis J, Faibisoff B, Williams B. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg*. 1975 Aug;56(2):166-70.

Thomazini-Santos IA, Barraviera SRCS, Mendes-Giannini MJS, Barraviera B. Surgical adhesives. *J Venom Anim Toxins*. 2001;7(2):159-71.

Toros SZ, Karaca ÇT, Güneş P, Oysu Ç, Ertugay ÇK, Naiboğlu B, et al. Hyperbaric oxygen versus steroid in facial nerve injury: an experimental animal study. *Am J Otolaryngol*. 2013 Sep-Oct;34(5):530-6.

Tos P, Colzani G, Ciclamini D, Titolo P, Pugliese P, Artiaco S. Clinical applications of end-to-side neurorrhaphy: an update. *Biomed Res Int*. 2014;2014:646128.

Ulkür E, Yüksel F, Açikel C, Okar I, Celiköz B. Comparison of functional results of nerve graft, vein graft, and vein filled with muscle graft in end-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery*. 2003;23(1):40-8.

Virmond M, Pereira HR. Tubular repair of the sciatic nerve in the rat with preserved bovine pericardium. In: 5^o Workshop Internacional de Microcirurgia e Cirurgia de Mão, Unesp Botucatu, 2000. p.27.

Viterbo F, Romão A, Brock RS, Joethy J. Facial reanimation utilizing combined orthodromic temporalis muscle flap and end-to-side cross-face nerve grafts. *Aesthetic Plast Surg*. 2014 Aug;38(4):788-95.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Latero-terminal neurotaphy without removal of the epineural sheath. Experimental study in rats. *Rev Paul Med*. 1992 Nov-Dec;110(6):267-75. Erratum in: *Rev Paul Med* 1993 Nov-Dec;111(6):479.

Waller A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Phil Transact Royal Soc London* 1850, 140:423–429.

Wan H, Zhang L, Li D, Hao S, Feng J, Oudinet JP, et al. Hypoglossal-facial nerve "side"-to-side neurotaphy for persistent incomplete facial palsy. *J Neurosurg*. 2014 Jan;120(1):263-72.

Wang X, Luo E, Li Y, Hu J. Schwann-like mesenchymal stem cells within vein graft facilitate facial nerve regeneration and remyelination. *Brain Res*. 2011 Apr 6;1383:71-80.

Waitayawinyu T, Parisi DM, Miller B, Luria S, Morton HJ, Chin SH, Trumble TE. A comparison of polyglycolic acid versus type 1 collagen bioabsorbable nerve conduits in a rat model: an alternative to autografting. *J Hand Surg Am*. 2007 ec;32(10):1521-9.

Watchmaker GP, Mackinnon SE. Advances in peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg*. 1997 Jan;24(1):63-73.

Windebank AJ, Wood P, Bunge RP, Dyck PJ. Myelination determines the caliber of dorsal root ganglion neurons in culture. *J Neurosci*. 1985 Jun;5(6):1563-9.

Ydens E, Cauwels A, Asselbergh B, Goethals S, Peeraer L, Lornet G, et al. Acute injury in the peripheral nervous system triggers an alternative macrophage response. *J Neuroinflammation*. 2012 Jul 20;9:176.

Yetiser S, Kahraman E, Satar B, Karahatay S, Akcam T. Anatomy of the Extratemporal Facial Nerve in Rats. *Mediterr J Otol*. 2005;1:117-121.

Zuijendorp HM, Smit X, Blok JH, Caruelle JP, Barritault D, Hovius SE, et al. Significant reduction in neural adhesions after administration of the regenerating agent OTR4120, a synthetic glycosaminoglycan mimetic, after peripheral nerve injury in rats. *J Neurosurg*. 2008 Nov;109(5):967-73.

ANEXOS

ANEXO

Anexo 1 – Carta de aprovação do comitê de ética

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 007/2013

Bauru, 08 de maio de 2013.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Regeneração do ramo bucal do nervo facial com sutura epineural término-lateral ou coaptação com adesivo de fibrina associado à terapia por laser**, de autoria de Marcelie Priscila de Oliveira Rosso, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão realizada no dia **15 de abril de 2013**.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rogério Leoni Buchaim

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73

e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356

<http://www.fob.usp.br>