UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DANIELA VIEIRA BUCHAIM

**Reparo do nervo facial com sutura epineural término-terminal e
coaptação com adesivo de fibrina em ratos associado ou não a
laserterapia**

BAURU

2014

DANIELA VIEIRA BUCHAIM

**Reparo do nervo facial com sutura epineural término-terminal e
coaptação com adesivo de fibrina em ratos associado ou não a
laserterapia**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração em Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo

BAURU

2014

Buchaim, Daniela Vieira
B851r Reparo do nervo facial com sutura epineural
 término-terminal e coaptação com adesivo de fibrina em
 ratos associado ou não a laserterapia/ Daniela Vieira
 Buchaim. – Bauru, 2014.
 105 p. : il. ; 31 cm.

Tese. (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo

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

Assinatura:

Data:

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
(CEEPA) - FOB/USP
Protocolo nº: 034/2011
Data: 20 de Dezembro de 2011

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a pessoas muito especiais.....

Ao meu esposo, ROGÉRIO LEONE BUCHAIM, acredito que mil folhas seriam insuficientes para escrever tudo o que gostaria de dizer à você, mas deixo aqui uma frase que para mim tem grande significado e talvez resuma as minhas palavras: “Agradeço a DEUS todos os dias por ter o colocado em meu caminho.....TE AMO”

Aos meus pais maravilhosos, RAUL BORGES VIEIRA e SILONEI MARTINS VIEIRA, com certeza sem vocês eu não estaria aqui! De coração, muito obrigada por iluminarem os meus caminhos, mesmo que obscuros, sempre com amor e dedicação, para que eu pudesse trilhá-lo sem medo e repleta de esperanças, rumo à conquista dos meus sonhos! AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

“Aprendi que devemos sempre agradecer por tudo que acontece em nossas vidas, nunca sabemos o que Deus tem pra nos dar, mas Ele conhece nossos corações, nossos medos, nossas ansiedades.....OBRIGADA por permitir a realização de mais uma conquista.....”

Ao **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo**, pela brilhante orientação, pela competência e ética em suas atitudes. Os seus ensinamentos e a sua mão estendida sempre que pedi por socorro foram imprescindíveis para que eu pudesse alcançar mais essa vitória. MUITO OBRIGADA!

Agradeço ao meu sogro, **Angelo Jamil Buchaim** (*in memorian*), e a minha sogra, **Olinda Leone Buchaim**, que mesmo longe sempre rezam por mim.

Aos professores de Anatomia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP), **Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues** e **Prof. Dr. André Luis Shinohara**, pelo companheirismo, incentivo e amizade.

Ao **Prof. Dr. Domingos Donizeti Roque**, companheiro de trabalho e amigo, já que assim posso chamá-lo, muito obrigada pelos ensinamentos em minha carreira docente, mas também pelos momentos agradáveis na difícil arte de ensinar.

À banca do exame de doutorado, **Prof. Dr. José Américo de Oliveira** e **Prof. Dr. Horácio Faig Leite**, pela disponibilidade e contribuições. Vocês são exemplos brilhantes na arte de ensinar Anatomia.

Ao **Prof. Dr. Antonio Marcos Orsi**, companheiro de ensino anatômico, obrigada pela amizade, conselhos e incentivo nesta caminhada.

Aos **Professores Doutores Rui Seabra Ferreira Júnior** e **Benedito Barraviera**, do CEVAP - **Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos**, pelo fornecimento do adesivo de fibrina utilizado neste trabalho.

A todos os diretores e funcionários da Universidade de Marília – UNIMAR, em especial ao Pró-Reitor de Graduação, **Prof. José Roberto Marques de Castro**, pela oportunidade e por sempre acreditar na minha carreira docente. Muito obrigada pelos seus conselhos preciosos.

Ao **Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Júnior**, companheiro e amigo, obrigado pela participação ativa nessa pesquisa, pelos momentos de descontração, apoio e força.

Ao **Prof. Dr. Cristóvam Emílio Herculian**, pelo auxílio na análise estatística.

Ao **Prof. Dr. Fábio Augusto Furlan**, pela compreensão e incentivo na minha carreira docente.

Aos **Professores Doutores José Sidney Roque, Marcelo Morgueti, Beatriz Flávia de Moraes Trazzi**, pelo apoio e torcida nessa jornada.

Aos **funcionários** da Disciplina de Anatomia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP), **Daniela Ariane Alves, Romário Moisés de Arruda, Lourisvalda de J. Celestino e Ovídio dos Santos Sobrinho**, obrigada pelo carinho.

Aos **pós-graduandos Jéssica Barbosa de Oliveira Gonçalves, Iris Jasmin Santos German, Karina Torres Pomini Puzipe, Marcelie Priscila de Oliveira Rosso, Dayane Maria Braz Nogueira, Mizael Pereira, Idvaldo Aparecido Favaretto Júnior, Gustavo Lopes Toledo, Farooque Jamaluddin Ahmed**, pelo espírito de luta e companheirismo.

Ao amigo e estudante de odontologia, **Cleuber Rodrigo de Souza Bueno**, pelo auxílio em vários momentos desta pesquisa, sempre disposto a ajudar, obrigada pela amizade e apoio.

Às estagiárias **Pérola Padilha Gregório de Góes, Mariana Marques Escobar Bueno, Rafaela Maiolo Garmes**, pelo auxílio na análise morfométrica deste estudo.

À secretária do departamento e Pós-graduação em Biologia Oral **Vera Lúcia Rufino Rosa**, que sempre nos recebe de braços abertos com toda a simpatia e competência.

Aos meus irmãos, **Carlos Alberto Martins Vieira e Rosicler Vieira Fachini**, por estarem sempre com um sorriso no rosto em todos os momentos.

Aos meus cunhados, **Antônio Carlos Fachini e Mírian Lamarca Vieira**, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao meu fiel companheiro e inseparável amigo **Raicow**, que com seu amor incondicional, preenche os meus dias de alegria.

Ao casal de amigos **Daniel Ventura Dias e Letícia Rossi Daré**, pelos momentos de alegria e que, agora mesmo distantes, estão torcendo por mim.

Ao casal **Guilherme Casari Ribeiro e Daniela Penço Leite Casari Ribeiro**, vocês são muito especiais, obrigada por compartilharem comigo mais essa vitória. *“Amizade, palavra que designa vários sentimentos que não podem ser trocados por meras coisas materiais. Deve ser guardada e conservada no coração”.*

Aos dirigentes (diretoria, vice-diretores, colegiados, comissões assessoras) da Faculdade de Odontologia de Bauru, nominando a atual diretora, **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização e formatação desta pesquisa, em

especial aos funcionários do Biotério, da Biblioteca e da secretaria de Pós-Graduação.

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 de material de consumo e permanente utilizado em nosso trabalho.

Aos familiares, amigos e colegas, agradeço muito a torcida de todos, pois sei que rezaram e vibraram em todos os momentos.

MEU ETERNO AGRADECIMENTO!!!

“Existem homens que lutam um dia e são bons; existem outros que lutam um ano e são melhores; existem aqueles que lutam muitos anos e são muito bons. Porém, existem os que lutam toda a vida. Estes são os imprescindíveis.”

Bertolt Brecht, dramaturgo e poeta alemão.

RESUMO

As lesões que envolvem nervos periféricos, especialmente os traumatismos faciais, são muito comuns e decorrentes principalmente de acidentes com veículos motorizados, lesões acidentais e quedas, que levam a fraturas do osso temporal ou lacerações da face e consequentemente lesões do nervo facial. A principal meta no estudo da regeneração nervosa é descobrir uma técnica adequada de reparo em lesões de nervos periféricos que traga como resultado a recuperação funcional das estruturas por eles inervadas. A sutura epineural é um método muito utilizado para recuperação de lesões nervosas, assim como o uso do adesivo de fibrina, que requer menor destreza do cirurgião. O adesivo derivado do veneno de serpente (CEVAP/UNESP, Botucatu-SP) é um selante biológico e biodegradável, pois não produz reações adversas, não contém sangue humano, apresenta uma boa capacidade adesiva, não transmite doenças infecciosas, e pode ser utilizado como coadjuvante em procedimentos de sutura convencional. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi comparar duas técnicas de recuperação de nervos periféricos lesionados: a sutura epineural término-terminal e o adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente, e observar se o uso da laserterapia de baixa potência influencia esse processo de regeneração. Para isso, foram utilizados 42 ratos machos (*Rattus norvegicus*, Wistar), com 60 dias de vida, separados aleatoriamente em um Grupo Controle e quatro Grupos Experimentais, assim formados: Grupo Controle (GC, $n=10$), em que foi coletado o nervo facial íntegro aos 95 e 135 dias de vida; Grupo Experimental Sutura (GES, $n=16$) e Grupo Experimental Adesivo de Fibrina (GEF, $n=16$), onde no lado direito da face o ramo bucal do nervo facial foi seccionado e realizado a sutura epineural término-terminal e, no lado esquerdo da face, o ramo bucal do nervo facial foi seccionado e utilizado o adesivo de fibrina para coaptação das extremidades; Grupo Experimental Sutura e Laserterapia (GESL, $n=16$) e Grupo Experimental Adesivo de Fibrina e Laserterapia (GEFL, $n=16$), submetidos aos mesmos procedimentos de GES e GEF, adicionada a aplicação de Laser de Arseneto de Gálio Alumínio (GaAlAs) de pulso contínuo, comprimento de onda de 830 nm, $6\text{J}/\text{cm}^2$, por 24 segundos, três vezes por semana durante cinco semanas, em três pontos dos locais operados. Os animais dos Grupos Experimentais foram eutanasiados com 95 dias (cinco semanas pós-

cirurgia) e 135 dias (dez semanas pós-cirurgia). As amostras coletadas foram submetidas à análise morfológica por microscopia óptica e eletrônica de transmissão, além de análise morfométrica da área e diâmetro da fibra, área e diâmetro do axônio, espessura e diâmetro da bainha de mielina. Observou-se brotamento axonal no coto distal do nervo facial em todos os Grupos Experimentais, com morfologia semelhante às fibras do Grupo Controle, e predomínio de fibras mielínicas sobre as amielínicas. Pode-se concluir que a reparação por meio da sutura epineural término-terminal apresentou melhores resultados em relação ao adesivo de fibrina e a laserterapia de baixa potência não influenciou o processo de regeneração.

Palavras-chave: Nervo facial. Regeneração nervosa. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. Adesivo Tecidual de Fibrina. Técnicas de Sutura.

ABSTRACT

Repair of facial nerve with epineural end-to-end suture and coaptation with fibrin adhesive in rats associated or not laser therapy

The injuries involving peripheral nerves, especially facial traumatism are very common and serious and longstanding facial paralysis lead to significant deterioration in the quality of the individual's life. The main goal in the study of nerve regeneration is finding a suitable repair technique for peripheral nerve injuries that bring results in the functional recovery of the structures innervated by them. Therefore, the aim of this study was to compare two techniques for recovery of injured peripheral nerves: the end-to-end epineural suture and fibrin adhesive derived from snake venom (CEVAP / UNESP, Botucatu-SP), and observe if the use of low-level laser therapy influences this regeneration process. For this purpose, 42 male rats (*Rattus norvegicus*, *Wistar*) were used, with 60 days of life, were randomly separated into a control group and four experimental groups, which were formed this way: Control Group (CG, $n = 10$), in which the intact facial nerve was collected at 95 and 135 days of life; Experimental Suture Group (ESG, $n = 16$) and Experimental Fibrin Adhesive Group (EFG, $n = 16$), where the right side of the face the buccal branch of the facial nerve was transected and the epineural end-to-end suture was performed and the left side of the face, the buccal branch of the facial nerve was transected and the fibrin glue was used for coaptation of the edges; Experimental Suture Laser Therapy Group (ESLG, $n = 16$) and Experimental Fibrin Adhesive Laser Therapy Group (EFLG, $n = 16$) underwent the same procedures of ESG and EFG, included the application of Laser Gallium- Aluminum-Arsenide (GaAlAs) by an 830 nm wavelength pulse continuous, 6 J/cm^2 , for 24 seconds, three times a week during five weeks at three points of the operated areas. The animals in the experimental groups were euthanized at 95 days (five weeks post-surgery) and 135 days (ten weeks post-surgery). The collected samples were subjected to morphological analysis by optical microscopy and transmission electronic microscopy, besides the morphometric analysis of the area and diameter of the fiber, area and diameter of the axon, thickness and diameter of the myelin sheath. It was observed axonal sprouting in the distal stump of the facial nerve in all experimental groups, with similar morphology to the fibers of the control group, and predominance

of myelinated fibers to amyelinated. It can be concluded that the repair by epineural end-to-end suture showed better results in relation to fibrin adhesive and the low-level laser therapy did not influence the regeneration process.

Keywords: Facial nerve. Nerve regeneration. Low-Level Laser Therapy. Fibrin Tissue Adhesive. Suture Techniques.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 – Esquema dos envoltórios conjuntivos do nervo.....	32
Figura 2 – Vista esquemática dos ramos do nervo facial em ratos.....	35
Figura 3 – Esquema da classificação das lesões nervosas de acordo com Seddon.....	37
Figura 4 – Esquema da divisão dos grupos de animais.....	58
Figura 5 – Incisão (lado direito).....	59
Figura 6 – Exposição do nervo.....	59
Figura 7 – Realização da secção.....	60
Figura 8 – Nervo facial seccionado.....	60
Figura 9 – Realização da sutura.....	61
Figura 10 – Coaptação com adesivo de fibrina.....	61
Figura 11 – Laserpulse e caneta (Ibramed).....	61
Figura 12 – Micróto mo Leica® RM 2245 utilizado nos cortes para obtenção das lâminas.....	63
Figura 13 – Mensurações realizadas na morfometria.....	64

Figura 14 – Aspecto microscópico do ramo bucal do nervo facial dos grupos: A) GC; B) GES; C) GEF; D) GESL; E) GEFL.....	68
Figura 15 – Aspecto microscópico do ramo bucal do nervo facial dos grupos: A) GC; B) GES; C) GEF; D) GESL; E) GEFL.....	69
Figura 16 – Representação gráfica das variáveis mensuradas: área e diâmetro da fibra, área e diâmetro do axônio, área e espessura da bainha de mielina.....	71
Figura 17 – Representação gráfica das variáveis mensuradas: área e diâmetro da fibra, área e diâmetro do axônio, área e espessura da bainha de mielina.....	73
Figura 18 – Microscopia eletrônica de transmissão dos grupos: A) GC; B) GES; C) GEF; D) GESL; E) GEFL.....	75
Figura 19 – Microscopia eletrônica de transmissão dos grupos: A) GC; B) GES; C) GEF; D) GESL; E) GEFL.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e desvio padrão das variáveis mensuradas: área e diâmetro da fibra, área e diâmetro do axônio, área e espessura da bainha de mielina.....	72
Tabela 2 – Média e desvio padrão das variáveis mensuradas: área e diâmetro da fibra, área e diâmetro do axônio, área e espessura da bainha de mielina.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEVAP	Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos
UNESP	Universidade Estadual Paulista
pnc	Par de Nervo Craniano
mm	Milímetro
CTM-TA	Células-Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
mg	Miligrama
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
PEG	Polyethylene Glycol
NGF	Nerve Growth Factor
ATP	Adenosina Trifosfato
LLLT	Low-Level Laser Therapy
nm	Nanômetro
PGE2	Prostaglandina E2
RNA _m	Messenger Ribonucleic Acid
COX-2	Ciclooxygenase 2
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
USP	Universidade de São Paulo
CEEPA	Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
GC	Grupo Controle
GES	Grupo Experimental Sutura
GEF	Grupo Experimental Adesivo de Fibrina
GESL	Grupo Experimental Sutura Laser
GEFL	Grupo Experimental Adesivo de Fibrina Laser
µl	Microlitro
cm	Centímetro
J	Joules
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
ANOVA	Análise de Variância
µm ²	Micrômetro quadrado
GaAlAs	Gallium-Aluminum-Arsenide

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Grau Celsius
®	Marca Registrada
<	Menor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1 SISTEMA NERVOSO	31
2.1.1 Generalidades	31
2.1.2 Nervo Facial	33
2.2 REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA	36
2.2.1 Classificação das Lesões dos Nervos Periféricos	36
2.2.2 Técnicas de Reparo das Lesões dos Nervos Periféricos	38
2.2.2.1 Neurorrafias e Técnicas de Enxerto	38
2.2.2.2 Adesivo de Fibrina	43
2.2.2.3 Nervo Facial	45
2.2.3 Terapia por Laser de Baixa Potência	47
3 PROPOSIÇÃO	51
3.1 OBJETIVO GERAL	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 ANIMAIS	57
4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	59
4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	62
4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	63
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
5 RESULTADOS	65
5.1 OBSERVAÇÕES HISTOMORFOLÓGICAS	67
5.1.1 Período de Cinco Semanas pós-cirurgia	67
5.1.2 Período de Dez Semanas pós-cirurgia	69
5.2 OBSERVAÇÕES E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	70
5.2.1 Período de Cinco Semanas pós-cirurgia	70
5.2.2 Período de Dez Semanas pós-cirurgia	72
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	74
5.3.1 Período de Cinco Semanas pós-cirurgia	74
5.3.2 Período de Dez Semanas pós-cirurgia	76

6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	91
ANEXOS	103

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O nervo facial é responsável por fornecer o tônus e dinâmica da atividade dos músculos da mímica, que são vitais para a proteção ocular, o fluxo de ar nasal, articulação da fala, e continência oral (FATTAH; BORSCHHEL; ZUKER, 2011).

Apesar de o comprometimento funcional deste nervo ser uma questão importante, a atividade mimética é essencial para a interação social, especialmente na criança que está aprendendo a interagir com outras crianças e adultos. A comunicação não verbal transmitida pela expressão facial é essencial em condições de relacionamentos sociais normais, e um sorriso espontâneo e dinâmico é fundamental para tal interação comunitária. Assim, aqueles percebidos como “diferente”, podem sofrer nas mãos de seus pares, levando ao isolamento social e afetando seu desempenho escolar ou profissional. Alguns pesquisadores afirmam que é o estresse psicológico e não a incapacidade funcional o fator crítico no prejuízo do comprometimento social, e a razão para procurar cirurgias (FATTAH; BORSCHHEL; ZUKER, 2011).

Outros estudiosos seguindo a mesma direção afirmam que a paralisia facial grave e de longa data, com a perda da expressão facial, é um problema social que leva à deterioração significativa na qualidade de vida do indivíduo devido a graves dificuldades estéticas, psicológicas e econômicas (OZSOY et al., 2011).

Portanto, o interesse na recuperação de lesões do nervo facial, não é, apenas para restaurar a função, mas também para recriar o sorriso, realizando grandes benefícios psicossociais, além de resolver os problemas funcionais específicos que surgem (FATTAH; BORSCHHEL; ZUKER, 2011).

Deve ser lembrado que as lesões que envolvem nervos periféricos, especialmente os traumatismos faciais, são muito comuns e decorrentes principalmente de acidentes com veículos motorizados, lesões acidentais e quedas, que levam a fraturas do osso temporal ou lacerações da face e consequentemente lesões do nervo facial (OZSOY et al., 2011).

Além destes fatores não deve ser esquecido que existem outras lesões crônicas do nervo facial que são pós-operatórias, como por exemplo, a parotidectomia radical, a cirurgia do osso petroso, a remoção de tumores do ângulo ponte-cerebelar e lesão iatrogênica (BASCUM et al., 2000; SOOD et al., 2000;

GUNTINAS-LICHIUS; SITTEL, 2004; GUNTINAS-LICHIUS et al., 2006; GHARABAGHI et al., 2007; HUNDESHAGEN et al., 2013; SKOURAS et al., 2013).

A principal meta no estudo da regeneração nervosa é descobrir uma técnica adequada de reparo em lesões de nervos periféricos que traga como resultado a recuperação funcional das estruturas por eles inervadas (SEDDON, 1943). Assim técnicas envolvendo membrana cartilaginosa (GIANNESSI et al., 2014), enxerto arterial e venoso (FAWCETT; KEYNES, 1990; ROQUE, 2008; ROSA JUNIOR, 2013), enxerto de segmento nervoso periférico (TRUMBLE; PARVIN, 1994; WATCHMAKER; MACKINNON, 1997; LUNDBORG, 2000; ASKAR; SABUNCUOGLU, 2002), tubos de silicone e de polietileno, (LI et al., 2010; HISASUE et al., 2005), tubos de pericárdio bovino (AHMED et al., 2005), retalhos de músculos esqueléticos, (FAWCETT; KEYNES, 1990), enxertos de músculos esqueléticos combinados com veias (GEUNA et al., 2000), enxerto de músculos esqueléticos combinados com nervo (CALDER; GREEN, 1995; PAPALIA et al., 2013) tem sido desenvolvidas.

A sutura epineural é o método muito utilizado para recuperação de lesões nervosas onde houve perda de tecido nervoso, ou foi criado um “gap” entre os cotos nervosos. No entanto, esta técnica apresenta muitas desvantagens, pois requer técnicas de microcirurgia, bem como reações ao material de sutura, manuseio excessivo das extremidades nervosas, com consequentes traumas da penetração da agulha através do tecido nervoso (ATTAR et al., 2012).

Um grupo de pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP – UNESP – Botucatu, SP) desenvolveu um adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente (*Crotalus durissus terrificus*), tendo como principal objetivo produzir um adesivo de fibrina sem usar sangue humano, evitando a transmissão de doenças infecciosas. O adesivo de fibrina pode ser uma ferramenta útil clinicamente, devido à sua flexibilidade e diversidade de aplicações. É um selante biológico e biodegradável, pois não produz reações adversas, não contém sangue humano, apresenta uma boa capacidade adesiva, não transmite doenças infecciosas, e pode ser utilizado como coadjuvante em procedimentos de sutura convencional (BARROS et al., 2009).

Este adesivo de fibrina derivado de veneno de serpente foi e está sendo utilizado em vários modelos experimentais de cirurgia para recuperação de lesões

nervosas (REIS, 2000), com o objetivo de minimizar as desvantagens produzidas pela técnica da sutura epineural.

Outro elemento que tem sido usado na recuperação de nervos seccionados é o laser de baixa potência, que começou a ser utilizado no processo de regeneração e recuperação funcional de lesões nervosas periféricas na década de 80, havendo vários relatos sobre resultados obtidos. Estudos recentes demonstraram que o laser tem a capacidade de reduzir a migração de células mononucleares, que conduzem a uma diminuição na área de edema, promovendo uma regeneração mais rápida (AKGUL; GULSOY; GULCUR, 2014), além de ter um efeito imediato de proteção, mantendo a atividade funcional do nervo lesado, diminuindo a formação de tecido cicatricial no local da lesão e aumentando significativamente o crescimento axonal e mielinização (ROCHKIND et al., 2007).

Considerando-se a frequência e os males, funcionais e sociais, que as lesões do nervo facial produzem nos seres humanos; e os benefícios que o uso do adesivo de fibrina derivado de serpente e o laser de baixa potência tem produzido nas lesões nervosas que produziram “gaps”, ou perda de continuidade do nervo, pensou na realização de um trabalho para observar morfológicamente se tais benefícios poderiam ser alcançados também no nervo facial e assim minimizar os problemas produzidos pelas lesões deste nervo.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SISTEMA NERVOSO

2.1.1 Generalidades

O Sistema Nervoso é único em relação à vasta complexidade dos processos cognitivos e das funções de controle que pode executar. Ele recebe, a cada minuto, literalmente milhões de *bits* de informações provenientes de diferentes órgãos e nervos sensoriais e, então, integra-os, com o intuito de determinar as respostas a serem executadas pelo corpo (GUYTON, 2006).

A arquitetura do Sistema Nervoso, apesar de complexa, segue um conjunto relativamente simples de princípios funcionais, organizacionais e desenvolvimentais. O Sistema Nervoso apresenta dois componentes: o Sistema Nervoso Central, composto pelo encéfalo e a medula espinal, e o Sistema Nervoso Periférico, composto pelos grupos de neurônios chamados de gânglios e nervos periféricos que estão localizados fora do encéfalo e da medula espinal. Os dois sistemas são anatomicamente separados, mas interconectados funcionalmente (SCHWARTZ; JESSEL; KANDEL, 2003).

Estendendo-se do encéfalo e da medula espinal, em pares, estão: 12 nervos cranianos e 31 nervos espinais, respectivamente, formando a parte periférica do sistema nervoso que inclui não somente todas as suas ramificações mediando as funções sensitivas somáticas e motoras, mas também os nervos viscerais ou esplâncnicos ligados à parte central do sistema nervoso, formando uma parte autônoma periférica do sistema nervoso. Os nervos periféricos contêm grandes quantidades de fibras independentes e grosseiramente paralelas, exceto nos gânglios somático e autônomo. O Sistema Nervoso Periférico retransmite informações para o Sistema Nervoso Central e executa os comandos motores gerados no encéfalo e na medula espinal. A ação mais simples implica a atividade integrada de várias vias sensoriais, motoras e motivacionais no Sistema Nervoso Central (WARWICK et al., 1995).

Já a parte central contém não apenas as terminações ou corpos celulares neuronais destes axônios periféricos, mas também grandes quantidades de

neurônios completos, incluindo seus dendritos, as ramificações e sinapses que compõem a maior parte do volume do encéfalo e da medula espinal (WARWICK et al., 1995).

Os nervos são cordões esbranquiçados, constituídos por feixes de fibras nervosas reforçadas por tecido conjuntivo, que unem o sistema nervoso central aos órgãos periféricos (MACHADO, 2004). Apresentam três bainhas conjuntivas (Figura 1): o epineuro (envolve todo o nervo e emite septos para o seu interior), o perineuro (envolve os feixes de fibras nervosas) e o endoneuro (formado por uma trama delicada de tecido conjuntivo que envolve cada fibra nervosa). A função dos nervos é conduzir, por meio de suas fibras, impulsos nervosos do sistema nervoso central para a periferia (impulsos eferentes) e da periferia para o sistema nervoso central (impulsos aferentes).

Figura 1 – Esquema dos envoltórios conjuntivos do nervo (Figura adaptada de Junqueira e Carneiro, 2008).

Funcionalmente, as fibras dos nervos cranianos apresentam componentes aferentes e eferentes (MACHADO, 2004). Com relação à parte aferente, elas podem ser classificadas como:

a) Fibras aferentes somáticas gerais: originam-se em exteroceptores e proprioceptores, conduzindo impulsos de temperatura, dor, pressão, tato e propriocepção;

b) Fibras aferentes somáticas especiais: originam-se na retina e no ouvido interno, relacionadas com a visão, audição e equilíbrio,

c) Fibras aferentes viscerais gerais: originam-se em visceroreceptores e estão relacionadas com a dor visceral;

d) Fibras aferentes viscerais especiais: originam-se em receptores gustativos e olfatórios, localizados em sistemas viscerais, como os sistemas digestório e respiratório.

Já com relação à parte eferente, elas podem ser classificadas como:

a) Fibras eferentes somáticas: dirigem-se músculos estriados miotômicos;

b) Fibras eferentes viscerais especiais: dirigem-se aos músculos estriados branquioméricos

c) Fibras eferentes viscerais gerais: dirigem-se ao músculo liso, cardíaco e glândulas.

2.1.2 Nervo Facial

O nervo facial (VII par de nervo craniano - pnc) possui uma raiz motora e uma sensitiva, com a última sendo o nervo intermédio. As duas raízes emergem na margem caudal da ponte, lateral ao recesso entre a oliva inferior e o pedúnculo cerebelar caudal, com a parte motora sendo medial; o nervo vestibulo-coclear (VIII pnc) está lateral à raiz sensitiva do VII pnc. O nervo intermédio geralmente se adere, de início, mais ao nervo vestibulo-coclear do que ao nervo facial, passando para este à medida que se aproxima do meato acústico interno, frequentemente com mais de um filamento (WARWICK et al., 1995).

A raiz motora do nervo facial inerva os músculos da face, do couro cabeludo e do pavilhão da orelha, os músculos bucinador, platisma, estapédio, estilohióideo e o ventre posterior do digástrico. A raiz sensitiva conduz fibras gustatórias provenientes da área pré-sulcal da língua e, também dos nervos palatino e petroso maior, fibras gustatórias provenientes do palato mole; conduz ainda a inervação secretomotora parassimpática pré-ganglionar das glândulas salivares

submandibular e sublingual, glândula lacrimal e glândula da mucosa do nariz e do palato (WARWICK et al., 1995).

O núcleo motor, a partir do qual a maioria das fibras motoras faciais é derivada é profundo na formação reticular da parte caudal da ponte, posterior ao núcleo trapezoide dorsal e ventromedial ao núcleo do tracto espinal do nervo trigêmeo (V pnc). Este núcleo recebe fibras provenientes de ambos os tractos corticonucleares localizados na parte inferior da ponte, e é supostamente suprido por fibras piramidais que descem no lemnisco medial. Em contrapartida, o núcleo sensitivo do nervo facial é a extremidade rostral do núcleo solitário no bulbo. Ele recebe fibras gustatórias aferentes e, provavelmente, outras fibras aferentes provenientes da raiz sensitiva e envia fibras para os núcleos laterais do tálamo contralateral (WARWICK et al., 1995).

O nervo facial apresenta seu trajeto partindo inicialmente do encéfalo, onde as duas raízes passam ântero-lateralmente ao meato acústico interno. Na extremidade lateral do meato, o nervo penetra no canal facial onde no início, está lateralmente e acima do vestíbulo e, próximo da parede medial do recesso epitimpânico, curva-se agudamente para trás, acima do promontório e, desce então, para o forame estilomastóideo. Esta curvatura aguda é denominada joelho do nervo facial e apresenta uma tumefação avermelhada: o gânglio geniculado. Em seguida, o nervo facial corre em direção a glândula parótida, cruzando antes o processo estiloide, a veia retromandibular e a artéria carótida externa e, divide-se, posteriormente ao colo da mandíbula em ramos que perfuram a face ântero-lateral da parótida (WARWICK et al., 1995).

De acordo com Testut e Latarjet (1958), o nervo facial está dividido em ramos colaterais e ramos terminais. Dentro da divisão colateral, divide-se em ramos colaterais intrapetrosos (sendo de superior para inferior): nervo petroso superficial maior, nervo petroso superficial menor, nervo do músculo estapédio, nervo corda do tímpano e ramo anastomótico *del pneumogástrico* ou ramo da fossa jugular; e ramos colaterais extrapetrosos (fora do crânio): ramo anastomótico do glossofaríngeo, ramo auricular posterior, ramo digástrico, ramo estilomastóideo e ramo lingual. Com relação aos ramos terminais, eles se distinguem em um superior, o temporofacial, e um inferior, o cérvicofacial, de onde partem os filetes bucais inferiores, que se distribuem para a musculatura da expressão facial, músculo bucinador e metade inferior do orbicular da boca.

O nervo facial de ratos é um bom modelo para estudos experimentais (Figura 2), pois não é difícil seguir a sua trajetória até seus ramos terminais, mesmo sem o auxílio de um microscópio cirúrgico. O tronco principal do nervo facial nos ratos emerge do forame estilomastóideo, localizado póstero-lateralmente ao canal auditivo externo. O tendão do músculo trapézio cobre parcialmente a saída do nervo e deve ser afastado lateralmente para uma melhor visualização. O tronco principal do nervo facial faz um giro aproximado de 75° a 80° no canal auditivo antes da sua bifurcação que ocorre logo abaixo da glândula parótida. O nervo facial passa pela glândula, porém inferiormente a ela, de modo que a remoção da glândula se torna possível, sem danificar o nervo. Depois de emergir do crânio, o tronco principal acompanha o canal auditivo externo antes da sua ramificação, cujo padrão é semelhante aos seres humanos. O ramo auricular posterior deixa o nervo superiormente, logo que o tronco principal emerge do forame, indo em direção ao músculo auricular. A divisão temporofacial do tronco inclui o ramo temporal, que vai em direção ao músculo orbicular do olho e o ramo zigomático menor, que segue em direção ao músculo bucinador e lábio superior. A divisão cérvico inferior do tronco principal contém os ramos zigomáticos e bucais superiormente e, inferiormente, os ramos cervical e marginal da mandíbula para o lábio inferior. Assim, o nervo facial de ratos fornece uma excelente plataforma de estudos experimentais em decorrência da fácil manipulação e dissecação do seu trajeto (YETISER et al., 2005).

Figura 2 - Vista esquemática dos ramos do nervo facial em ratos (Figura adaptada de YETISER et al., 2005).

2.2 REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA

2.2.1 Classificação das Lesões dos nervos Periféricos

As lesões traumáticas dos nervos periféricos é um problema mundial e de longa data, as quais podem resultar em perdas devastadoras (WHITLOCK et al., 2009). Essas lesões podem ser resultado de diferentes tipos de traumas, como por exemplo, acidentes com veículos motorizados, lacerações com objetos pontiagudos, quedas e ferimentos de bala (ROBINSON, 2000). No caso de lesões decorrentes de acidentes com veículos motorizados, estima-se uma proporção de 90% para acidentes de motocicleta e 9% para os demais veículos (KOIZUMI, 1992).

Os nervos periféricos podem ainda ser lesados por vários processos patológicos (BELKAS; SHOICHET; MIDHA, 2004) e também por procedimentos cirúrgicos, como por exemplo, a remoção de tumores envolvendo o ângulo ponte-cerebelar, parotidectomia radical, além de lesões iatrogênicas (HUNDESHAGEN, 2013; SKOURAS et al., 2013). Dentro das lesões iatrogênicas envolvendo o nervo facial, um estudo mostrou que os procedimentos cirúrgicos maxilo-faciais são responsáveis por 40% das lesões, cirurgias envolvendo a cabeça e pescoço 25%, procedimentos otológicos 17%, procedimentos cosméticos 11% e outros procedimentos 7%. Dentro dos 40%, os procedimentos buco-maxilo, cirurgias envolvendo a ATM (articulação temporomandibular), mastoidectomia e parotidectomia apresentaram maior prevalência entre as causas de lesões do nervo facial (HOHMAN; BHAMA; HADLOCK, 2014).

As lesões envolvendo os nervos periféricos podem ser classificadas de acordo com o grau de comprometimento do nervo e de suas estruturas envolvidas, bem como as dimensões do evento traumático (LUNDBORG, 2000). Funcional e anatomicamente, as lesões podem ser classificadas em neuropráxicas, axonotímicas e neurotímicas, como descritas por Seddon (1943): o termo neuropraxia é utilizado para designar lesões decorrentes de estiramento ou compressão do nervo que alcançam a bainha de mielina, mas, no entanto, não causam descontinuidade axonal. Na axonotmese ocorre perda da continuidade axonal, porém sem causar lesão no endoneuro e, no caso da neurotmeze, as lesões do axônio são acompanhadas de seus envoltórios conectivos (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da classificação das lesões nervosas de acordo com Seddon (1943).

Com base em dados histológicos, Sunderland (1978) subdividiu as lesões em 5 graus: primeiro grau, ausência de descontinuidade axonal (neuropaxia), segundo grau, perda de continuidade axonal com endoneuro intacto (axonotmese); terceiro grau, onde o perineuro e epineuro estão intactos; quarto grau, rotura total da fibra com preservação do epineuro e quinto grau, lesão do epineuro, com necessidade de reparação cirúrgica (neurotmese).

Quando um nervo é seccionado, ocorrem alterações no corpo celular e nos segmentos proximal e distal à lesão que, sofrem um processo de degeneração semelhante, porém, no coto proximal, essa degeneração estende-se até o primeiro nódulo de Ranvier, podendo até levar a morte celular por apoptose caso a lesão ocorra próximo ao corpo celular (BURNETT; ZAGER, 2004; JOHNSON; SOUCACOS, 2008). Já no coto distal ocorre uma degeneração gradual, aproximadamente em 48-96 horas após a secção do nervo, cujo fenômeno é denominado Degeneração Walleriana, realizada por macrófagos, que fagocitam a mielina e o axônio degenerado (VERDÚ et al., 2000).

2.2.2 Técnicas de Reparo das Lesões dos nervos Periféricos

2.2.2.1 Neurorrafias e Técnicas de enxerto

Os nervos periféricos quando lesados, tem capacidade de regeneração por si só ou com auxílio de técnicas cirúrgicas em decorrência do tipo de lesão. O momento ideal do reparo de uma lesão traumática deve ser em função do tipo de lesão, revelado pela sua evolução clínica, gravidade do ferimento, extensão da lesão do nervo, além da técnica cirúrgica aplicada (VITERBO; FALEIROS, 2002; FÉLIX et al., 2013).

A reparação dos nervos periféricos, frequentemente tem apresentado resultados insatisfatórios. Os resultados obtidos com os reparos anatômico e funcional são variáveis e normalmente imprevisíveis, devido a fatores como a formação de tecido cicatricial fibroso, nível de morte celular e formação de neuromas no local da lesão. Assim, raramente a regeneração axonal consegue atingir os níveis anteriores e as sequelas acabam sendo frequentes e, este fato, tem sido alvo de inúmeros estudos para melhor compreensão e entendimento do processo de reparação na busca de alternativas que possam melhorar os resultados (SILVA et al., 2012).

É importante destacar que a técnica de reparação de nervos periféricos inclui quatro etapas importantes: preparação da extremidade do nervo, aproximação, coaptação e manutenção. Lembrando que o momento da reparação é essencial e deve estar de acordo com o tipo de lesão, como por exemplo, nas lesões cortantes limpas, onde uma intervenção precoce é preferível principalmente por razões neurobiológicas e, no caso de lesões cortantes contaminadas ou infectadas, a abordagem deve ser após o descarte do quadro infeccioso (DAHLIN, 2008; LEPSKI; NIKKA; MARCHESE, 2009).

Denomina-se neurólise externa à ampliação do espaço para o nervo, por meio da intervenção sobre as estruturas anatômicas que se encontram ao redor dele. Assim, o nervo é liberado da ação constritiva exercida por ligamentos, fáscias ou protuberâncias ósseas diretamente relacionados com ele, em determinados segmentos anatômicos. A neurólise interna ou epineurectomia é a liberação propriamente dita do nervo. Consiste em incisar o epineuro no segmento anatômico

em que seu diâmetro é maior. Objetiva diminuir o grau de pressão intraneural, aumentado pela distensão restrita da própria bainha superficial do nervo (DUERKSEN, 1997; SRINIVASAN; PALANDE, 1997).

A neurólise externa costuma ser o primeiro procedimento a ser realizado na tentativa de reparo de um nervo com lesão parcial, desde que a lesão tenha ocorrido há menos de 6 meses e o nervo encontra-se com sua continuidade preservada. Porém, na maioria dos casos, é observada a ausência de melhora nas lesões fechadas devido à formação de tecido cicatricial que impede o crescimento das fibras nervosas. No caso da neurólise interna, deve-se realizar a dissecação dos fascículos nervosos com o auxílio de um microscópio cirúrgico, técnica também utilizada no caso de lesões parciais, principalmente quando existe a dor refratária. Durante o procedimento é indicado a monitoração eletrofisiológica para máxima preservação dos fascículos funcionalmente relevantes, porém, se houver uma interrupção à passagem dos potenciais após a realização da neurólise interna, é necessário um reparo com interposição de enxertos (LEPSKI; NIKKA; MARCHESI, 2009).

Estudos realizados em pacientes que apresentaram lesão de plexo braquial mostraram que mais de 50% dos pacientes tiveram um retorno da função de um ou mais grupos musculares decorridos seis a oito semanas pós-cirurgia com utilização de enxertos, onde a neurólise externa auxiliou no processo de reparo, pois promoveu uma descompressão local do nervo, por meio da remoção dos tecidos circundantes, permitindo então a passagem das fibras nervosas em recuperação, além de restaurar a irrigação normal do nervo. Após o procedimento, é esperado que ocorra um crescimento das fibras a uma velocidade aproximada de 1mm por dia, com reinervação de proximal a distal, porém, caso não ocorra, um procedimento mais invasivo deve ser aplicado (SWARTZ; BOLAND; FEE, 2012).

Uma das metas no estudo da regeneração nervosa é justamente descobrir técnicas de reparo adequadas para cada tipo de lesão. Assim, nas lesões neurotímicas, caracterizadas pela secção completa do nervo, ou também quando a lesão em continuidade for de pequena extensão, a técnica de eleição é a sutura epineural término-terminal (JOHNSON; SOUCACOS, 2008). Nesses tipos de lesões, onde não existe perda de tecido, os cotos podem ser aproximados sem tensão exagerada e, em seguida, suturados, apresentando então uma grande chance de recuperação.

O coelho foi utilizado como modelo experimental para comparar a sutura epineural término-terminal e o adesivo de fibrina (Tissucol[®]) após transecção do nervo facial, onde foi criado um defeito de 10 mm. Foi observado que a sutura epineural término-terminal apresentou uma melhor performance na regeneração do nervo facial em relação ao adesivo de fibrina, principalmente em relação ao número de axônios regenerados (SANDRINI; PEREIRA-JÚNIOR; GAY-ESCODA, 2007).

Ainda comparando a efetividade da sutura epineural término-terminal e do adesivo de fibrina (Tisseel[®]) após transecção do nervo facial, porém em cachorros, pesquisadores observaram que, após avaliação histológica e análise estatística, não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas técnicas na regeneração do nervo facial (ATTAR et al., 2012).

A neurorrafia término-terminal associada a dupla inervação muscular com secção de nervos sadios é mais uma técnica que tem sido utilizada para o tratamento da paralisia facial. Esse experimento foi realizado em ratos utilizando os nervos tibial e fibular. A dupla inervação muscular não ocorreu por meio da neurorrafia término-terminal e o nervo tibial não foi capaz de manter a inervação muscular após a secção do nervo fibular, porém, ocorreu a reinervação muscular 30 dias após a secção do nervo fibular, sugerindo que para que ocorra o crescimento axonal do nervo doador para o nervo receptor, é necessário que ocorra a degeneração Walleriana e a desnervação muscular, para que então a reinervação ocorra por meio da sutura término-lateral (STIPP-BRAMBILLA et al., 2012).

Além da neurorrafia término-terminal, uma alternativa desenvolvida, foi a sutura epineural término-lateral, onde o coto distal de um nervo pode ser suturado com a lateral de um nervo adjacente intacto (VITERBO et al., 1992). Essa técnica pode ser utilizada principalmente nos casos onde a lesão em continuidade seja extensa e a utilização de enxertos seja impraticável (VITERBO et al., 2009).

Um estudo comparando novos métodos com a sutura epineural término-lateral em ratos foi realizado: em um grupo o nervo peroneal foi seccionado e o coto distal ligado à lateral do nervo tibial (doador); em outro grupo realizou-se os mesmos procedimentos, porém associou-se a estimulação elétrica. Após seis meses foi avaliada a massa muscular e realizada a morfometria do coto distal no nervo fibular demonstrando que a estimulação elétrica foi um método eficaz na manutenção funcional do músculo, melhorando a regeneração nervosa (MACIEL et al., 2013).

Apesar das técnicas de neurorrafia serem amplamente utilizadas para restabelecer a união entre os cotos proximal e distal de nervos periféricos quando cuidadosamente indicadas, elas apresentam muitas desvantagens, não sendo indicada como o método ideal na recuperação de algumas lesões de nervos. Estas desvantagens incluem reações ao material de sutura, manuseio excessivo das extremidades nervosas, danos anatômicos e funcionais devido a penetração da agulha no tecido nervoso, além do conhecimento de técnicas de microcirurgia (ATTAR et al., 2012).

Nos casos em que a distância entre os cotos nervosos é excessiva apresentando um valor superior a 3 mm (MILLES, 1981), e a aproximação para a realização de uma sutura epineural término-terminal não seja possível sem tensão exagerada, o que pode provocar efeitos inibitórios no processo de regeneração neural, é necessário à interposição de enxertos, os chamados “cable graft”, que tem por finalidade a orientação do crescimento axonal (IJKEMA-PASSEN; MEEK; GRAMSBERGEN, 2005).

Os enxertos autólogos de nervo são amplamente utilizados nos casos de lesões extensas ou que sofreram grande perda tecidual, onde é realizada a remoção de um segmento de nervo sensitivo de outra área sem causar comprometimento funcional, diminuindo os efeitos de reação a corpo estranho. Nessa técnica geralmente é utilizado o nervo sural. (NICHTERWITZ et al., 2010).

Essa técnica também apresenta fatores limitantes, como por exemplo, o comprimento e calibre dos nervos disponíveis para o enxerto, perda da função sensitiva da área doadora, além da formação de neuromas, bem como a necessidade de abertura de duas lojas cirúrgicas aumentando consequentemente o risco de infecções (HANNA; DEMPSEY, 2010).

Em virtude dessas situações adversas, pesquisas continuaram a ser desenvolvidas buscando novas técnicas e materiais que apresentassem melhores resultados no processo de regeneração. A literatura apresenta vários tipos de enxertos desenvolvidos como alternativas para a recuperação de lesões de nervos periféricos, como os materiais biológicos (colágeno, artérias, veias) e não biológicos (tubos de silicone e polietileno) (LE BEAU; ELLISMAN; POWELL, 1988; HISASUE et al., 2005; MATSUMINE et al., 2014).

No caso das técnicas de reparo tubular ou tubulização, o tubo ideal deveria apresentar algumas características como ser biocompatível, diâmetro e

espessura adequada, bem como fácil manipulação e implantação (TARAS; NANAVATI; STEELMAN, 2005; MAGNAGHI et al., 2011; MATURANA et al., 2013).

Já existem trabalhos onde os tubos usados na técnica de tubulização são preenchidos com substâncias que visam acelerar a regeneração nervosa. Um estudo buscando regenerar o nervo ciático em “gap” de 10 mm mediante tubulização com veia normal e ao avesso, sendo preenchida ou não com o músculo tibial caudal e utilizando a veia jugular externa como enxerto venoso em ratos demonstrou que ocorreu regeneração do nervo em todos os grupos analisados e que os melhores resultados foram encontrados nos grupos da veia ao avesso com e sem preenchimento, bem como na veia normal sem preenchimento (ROQUE, 2007; ROQUE, 2008).

Pesquisas recentes utilizando as células-tronco, preenchendo a tubulização, têm apresentado resultados promissores, como uma terapêutica alternativa no processo da regeneração nervosa (HU et al., 2013; CHENG et al., 2013).

A combinação de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-TA) e plasma rico em plaquetas (PRP) na tubulização do nervo fibular comum, também confirma que essa associação propicia o reparo de lesões nervosas periféricas em nível morfométrico e funcional. Nesse trabalho, realizado em ratos, a veia jugular foi utilizada como tubo, mostrando que os melhores resultados funcionais foram encontrados no grupo onde se utilizou as células-tronco (CTM-TA) associadas ao PRP, quando comparados aos demais grupos experimentais (ROSA JUNIOR, 2013).

Como foi dito anteriormente, um dos problemas encontrados nas técnicas de neurorrafia que usam sutura são reações ao material de sutura, manuseio excessivo das extremidades nervosas, danos anatômicos e funcionais devido a penetração da agulha no tecido nervoso, além do conhecimento de técnicas de microcirurgia (ATTAR et al., 2012).

Algumas pesquisas têm sido realizadas para solucionar ou minimizar os problemas das suturas em um nervo, e um dos métodos alternativos é o uso adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente que foi e está sendo utilizada em vários modelos experimentais (REIS, 2000), podendo ser uma ferramenta muito útil na clínica devido a sua flexibilidade e diversidade de aplicações (BARROS et al., 2009),

sendo portanto uma opção promissora no processo de recuperação de lesões nervosas.

2.2.2.2 Adesivo de Fibrina

O conceito de produção de um novo adesivo de fibrina foi proposto em 1989 por um grupo de pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), São Paulo, Botucatu, Brasil. O principal objetivo deste projeto era produzir um adesivo de fibrina que não utilizasse componentes do sangue humano. Assim, um crioprecipitado extraído a partir de animais de grande porte foi produzido para substituir o fibrinogênio humano.

Uma fração do complexo gíroxina, extraída a partir do veneno de serpentes (*Crotalus durissus terrificus*), foi usada em vez da trombina bovina. A gíroxina, um componente neurotóxico isolado do veneno de serpente, pertencente ao grupo de enzimas semelhantes à trombina, e é uma fonte importante de serinaproteinase.

Os venenos de serpentes, principalmente da família Viperidae, contêm quantidades abundantes de enzimas proteolíticas e são divididos em dois grupos: proteases de serina e de metaloproteinases, sendo que ambas afetam o sistema hemostático em uma variedade de mecanismos (JIA et al., 2003; COSTA et al., 2009). Estas enzimas não são letais por si só, mas contribuem para os efeitos adversos do veneno quando associadas com outras proteínas do veneno. Estas enzimas afetam muitos passos na cascata de coagulação do sangue (LAFFORT et al., 2000), divididas em pró-coagulante, anti-coagulante, inibidores da função plaquetária e ativadores do sistema fibrinolítico (MARKLAND, 1998; MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000; MARSH; WILLIAMS, 2005).

Existem diversas proteases de serina, tais como as proteinases de calicreína-semelhantes, que exercem uma ação hipotensiva, libertando bradicinina; e a enzima do gênero trombina responsável pela formação de um coágulo de fibrina no final da cascata de coagulação. O isolamento de enzimas semelhantes à trombina é de interesse por causa do desenvolvimento de reagentes de diagnóstico e para o tratamento de alterações hemostáticas, o que é importante na produção de adesivos de fibrina (MARSH; WILLIAMS, 2005).

O adesivo de fibrina do veneno de serpente é mais barato do que as colas comerciais, fácil de aplicar e exequível para utilização em modelos animais. Neste sentido, pode ser considerada como uma potencial alternativa para o tratamento de lesões do SNC / SNP (BARBIZAN et al., 2013).

A cola de fibrina Tissucol[®] (Baxter AG, Viena, Áustria), adesivo mais utilizado e conhecido comercialmente, é composta por uma solução de fibrinogênio (fibrinogênio liofilizado e solução de aprotimina) e a solução de trombina (trombina liofilizada e solução de cloreto de cálcio) que, misturadas por meio de sistema de Duploject[®] (Baxter AG, Viena, Áustria), solidifica e forma uma obstrução plasmática. A cola de fibrina provoca a formação do coágulo precocemente, evita hematomas e acelera o processo de reparação (SANDRINI; PEREIRA-JÚNIOR; GAY-ESCODA, 2007).

Vários pesquisadores têm utilizado a cola de fibrina Tissucol[®], bem como o PEG (polyethylene glycol) e os cianocriolatos como métodos alternativos na reconstrução de nervos periféricos, pois o reparo de nervo por sutura requer manipulação dos cotos, o que pode potencialmente distorcer o alinhamento axonal, além da formação de granulomas, fibroses e desorganização axonal em volta de cada fio de sutura (SANDRINI; PEREIRA-JÚNIOR; GAY-ESCODA, 2000; ATTAR et al., 2012).

Na configuração de reparo em nervo periférico humano, como por exemplo, na reconstrução do plexo braquial, a cola ideal deve apresentar propriedades biológicas próprias, mínimo risco de transmissão de doenças, antigenicidade e toxicidade, além de não induzir a formação de fibrose que pode levar a compressão dos nervos. Finalmente, deve ser versátil para ser utilizada em diferentes cenários clínicos e proporcionar adequada resistência mecânica, evitando a ruptura na reparação inicial e durante o pós-operatório (TSE; KO, 2012).

Estudos histopatológicos demonstraram que a cola de fibrina (Tisseel[®], Baxter AG, Viena, Áustria) promove uma inflamação menos significativa bem como um melhor alinhamento das fibras e maior velocidade de condução do nervo quando comparada as outras técnicas de microcirurgia, sendo uma modalidade mais rápida e de fácil aplicabilidade (GOSK et al., 2006; SAMEEM; WOOD; BAIN, 2011).

Outro estudo que associou os efeitos do reparo nervoso término-lateral e cola de fibrina Tisseel[®] com 2,5 mg de fator de crescimento NGF (Nerve Growth Factor) demonstrou que a técnica término-lateral apresentou o mesmo padrão de

recuperação independente do tipo de reparo utilizado, porém a adição do fator de crescimento na cola de fibrina foi insuficiente para a potencialização dos resultados obtidos (SILVA et al., 2012).

A cola de fibrina de origem humana liofilizado, por ser derivado do sangue, apresenta riscos inerentes a sua utilização, como: infecções decorrentes de transfusões sanguíneas, parvovirose, sensibilização e risco de embolização (KAWAMURA et al., 2002), além do alto custo.

O adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente é um concentrado biológico derivado de plasma de uso tópico, cujo mecanismo de ação é similar ao último estágio da coagulação fisiológica (formação de fibrinogênio). O coágulo formado pelo adesivo é um componente fisiológico encontrado na reparação de tecidos, e isto faz com que seja diferente de outros tipos de cola, tais como os cianoacrilatos, os quais apresentam alta formação de fibrina, e é muito difícil de usar em tecido úmido, podendo ser tóxicos. O adesivo de fibrina não provoca reação de corpo estranho ou formação de tecido cicatricial, e também reduz a manipulação dos cotos nervosos e evitar o uso de fios de nylon, que permanecem em contato com o tecido nervoso (SANDRINI; PEREIRA-JÚNIOR; GAY-ESCODA, 2007).

O adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente foi produzido com o principal objetivo de se obter um novo adesivo sem usar sangue humano, como já exposto anteriormente, dessa forma, além de ser um selante biológico e biodegradável, não produz reações adversas, apresenta uma boa capacidade adesiva e pode ser coadjuvante em procedimentos de sutura convencionais (MARTINS et al., 2005; BARROS et al., 2009). Diferentemente da recuperação de nervos periféricos, pesquisas têm demonstrado que algumas substâncias encontradas no veneno de serpente também apresentam um grande potencial como agente anti-tumoral (VYAS et al., 2013).

2.2.2.3 Nervo Facial

Como foi dito anteriormente o nervo facial é responsável por fornecer o tônus e dinâmica da atividade musculatura da expressão facial, que é vital para a proteção ocular, para o fluxo de ar nasal, a articulação da fala, e continência oral, além de outras atividades. Apesar de o comprometimento funcional ser uma questão importante, a atividade mimética é essencial para a interação social, especialmente

na criança que está aprendendo a interagir com outras crianças e adultos. Aquelas percebidas como "diferente" podem sofrer nas mãos de seus pares, levando ao isolamento social produzido pelo estresse psicológico e consequentemente afetando seu desempenho em várias atividades. Portanto, a restauração das lesões do nervo facial é importante para restaurar a função dos músculos da expressão facial, recriar o sorriso e produzir grandes benefícios psicossociais (FATTAH; BORSCHEL; ZUKER, 2011).

Segundo alguns pesquisadores, a paralisia facial grave e de longa data com a perda da expressão facial é um problema social que leva à deterioração significativa na qualidade de vida do indivíduo devido a graves dificuldades estéticas, psicológicas e econômicas (OZSOY et al., 2011). Apesar da paralisia causada por lesões do nervo facial ser um quadro clínico grave e comum, a literatura não apresenta muitos dados sobre as técnicas cirúrgicas que visam recuperar ou minimizar este tipo de lesão.

Um estudo realizado em ratos após transecção do nervo facial e sutura epineural analisou quantitativamente a movimentação das vibrissas, e demonstrou que a estimulação mecânica no período pós-operatório produziu uma melhora significativa na recuperação dos movimentos (LINDSAY et al., 2010).

Outro trabalho descreveu as características da desnervação da musculatura facial em decorrência da transecção unilateral do nervo facial em ratos e mostrou que, após a sutura epineural término-terminal e análise quantitativa e eletrofisiológica dos feixes musculares dos músculos levantador do lábio superior e dilatador do nariz, houve diferença estatisticamente significativa entre o lado normal e o lado manipulado, principalmente na porcentagem das células musculares e das fibras nervosas (HADLOCK et al, 2013).

Utilizando enxerto de nervo autólogo, com nervo e artéria mediana, em lesões do ramo bucal do nervo facial em ratos, em defeitos de 7 mm, pesquisadores analisaram o número de fibras mielinizadas, diâmetro do axônio, espessura da bainha de mielina e observaram que o enxerto do nervo mediano vascularizado apresentou uma melhora significativa no processo de regeneração do nervo facial (MATSUMINE et al, 2014).

Salomone et al. (2013) afirmam que a expressão dos sentimentos pela face é uma das habilidades mais singulares do ser humano e que, uma lesão envolvendo o nervo facial, causada por traumas ou vírus, apresenta como

consequência a paralisia e a decorrente assimetria da face, trazendo transtornos gravíssimos para a pessoa afetada. O estudo envolvendo as células-tronco diferenciadas em células de Schwann e não diferenciadas, associadas a um tubo de silicone, foi realizado em ratos submetidos a neurotmeze, pois trata-se do tipo mais grave de lesão. Os resultados encontrados constataram que em todos os animais nos quais foram implantadas as células-tronco (indiferenciadas ou já diferenciadas), obtiveram uma melhora expressiva, confirmando a hipótese de que essa nova técnica pode realmente contribuir para o reparo de um nervo.

Foi realizado um estudo em sete pacientes que tiveram lesão do nervo facial, onde em cinco a lesão foi decorrente de procedimentos iatrogênicos e dois por projéteis de armas de fogo. Em quatro pacientes foi realizada a técnica de enxerto (em três foi utilizado o nervo sural e em um paciente o nervo auricular) e em três pacientes foi realizada a sutura epineural término-terminal. Foi observado, em princípio, que a técnica de escolha é a sutura, mas, quando existe tração mínima nos cotos do nervo facial, deve-se optar pelo enxerto. Em ambas as técnicas ocorreram em média 70% da recuperação motora dos pacientes (CRUZ FILHO; AQUINO; OLIVEIRA, 2013).

2.2.3 Terapia por Laser de Baixa Potência

A luz de baixa intensidade é uma modalidade crescente utilizada em fisioterapia, quiropraxia e várias áreas biomédicas, visando estimular a regeneração de axônios (HASHIMI et al., 2010) . Começou a ser utilizada no processo de regeneração e recuperação funcional de lesões nervosas periféricas na década de 80, havendo vários relatos sobre os resultados obtidos, e tem sido considerada uma grande aliada na terapêutica da regeneração de nervos periféricos (ROCHKIND et al., 1988; GIGO-BENATO; GEUNA; ROCHKIND, 2005). O principal objetivo da terapia por laser de baixa intensidade é o de modular a resposta inflamatória, acelerar o processo de reparo tecidual e atenuar a degeneração em muitas situações neurológicas. (GONÇALVES et al., 2007; LINS et al., 2010).

O efeito produzido pelo uso do laser se caracteriza pelo princípio da biomodulação, isto é, a utilização da própria matéria prima produzida por nosso organismo para formar alterações a nível tecidual, que por sua vez, contribui para a recuperação de diversas condições patológicas (JAYASREE et al., 2001).

Adicionalmente, a terapia proporciona os efeitos antiálgico, antiinflamatório, antiedematoso e normalizador circulatório.

Especificamente no caso dos nervos periféricos, pesquisas demonstraram que com a absorção da energia luminosa pelo tecido nervoso, ocorre uma maior produção de ATP e, conseqüentemente da proliferação celular, o que leva a um aumento do metabolismo axonal, fato que auxilia a cicatrização no processo de regeneração (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005)

Estudos comparando a reparação de nervos periféricos por meio das técnicas de neurorrafia e utilização da cola de fibrina Tissucol[®] associado a terapia por laser de baixa intensidade mostraram que houve pequenas diferenças a favor do grupo tratado com laser, em termos de cura de feridas no local da reparação, não ocorrendo diferenças significantes em relação ao número e diâmetro dos axônios, sendo, portanto, a terapia uma alternativa interessante no processo de regeneração (MENOVSKY; BEEK, 2001).

Um estudo piloto realizado para investigar a eficácia do laser de baixa intensidade (LLLT) no tratamento de pacientes que sofreram lesões do plexo braquial, sugere que a fototerapia com comprimento de onda de 780 nm pode melhorar progressivamente a função do nervo, o que leva a uma recuperação funcional significativa (ROCHKIND et al., 2007).

Ainda citando o uso do laser na recuperação de nervos periféricos, pesquisas acreditam que a irradiação por laser pulsado associado a enxertos de tubos de silicone pode apresentar um efeito duplo: pode promover a regeneração, mas também evitar que eles se recuperem, sendo de extrema importância o uso de protocolos seguros (CHEN et al., 2005).

Em termos de protocolos utilizados, estudos foram realizados para verificar as diferenças entre o uso precoce e tardio na terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) na recuperação funcional e morfológica do nervo periférico (nervo isquiático) e constataram que não existem diferenças importantes em relação ao tempo de uso e que a luz tem a capacidade de reduzir a migração de células mononucleares, levando a uma diminuição da área do edema e regeneração mais rápida, porém mais estudos são necessários para esclarecer o assunto (AKGUL; GULSOY; GULGUR, 2014).

Ainda dentro do tópico de protocolos, autores afirmam que existem diferenças entre os efeitos da luz pulsada e contínua, comprimento de onda a ser

aplicado, tempo de exposição, ou seja, ainda não existem protocolos padronizados (HASHIMI et al., 2010).

No caso do efeito antiálgico, estudos comprovaram que a laserterapia pode provocar uma diminuição na expressão de substâncias que provocam dor como a PGE2, RNAm de COX-2, além de diminuição na formação de edemas (SNYDER; WILENSKY; FORTIN, 2002).

Enfim, nos últimos anos, a terapia por laser de baixa potência tornou-se uma alternativa crescente especialmente nas áreas que envolvem a medicina e reabilitação, incluindo acidentes vasculares cerebrais, infarto do miocárdio e doenças degenerativas cerebrais ou traumáticas (HASHIMI et al., 2010). Mas, apesar dos resultados benéficos obtidos em pesquisas clínicas e experimentais e, de alguns efeitos adversos relatados na literatura, é importante que mais estudos sejam realizados para definir os efeitos da laserterapia na reparação de nervos periféricos.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar duas técnicas de recuperação de nervos periféricos lesionados: a sutura epineural término-terminal e o adesivo de fibrina, e observar se o uso da laserterapia de baixa potência auxilia nesse processo de regeneração.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a reparação nervosa do nervo facial submetido à sutura epineural término-terminal, com a coaptação por meio de adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente;
- Verificar a influência da laserterapia na regeneração nervosa do nervo facial submetido à sutura epineural término-terminal;
- Verificar a influência da laserterapia na regeneração nervosa do nervo facial submetido a coaptação por meio de adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente;
- Comparar a reparação nervosa do nervo facial submetido à sutura epineural término-terminal, com coaptação por meio de fibrina derivado do veneno de serpente submetidos ou não à laserterapia.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 42 ratos machos da linhagem Wistar, com 60 dias de vida, pesando em média 250 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB-USP) – Campus de Bauru – São Paulo. O rato foi escolhido para o estudo porque essa espécie é a mais utilizada em pesquisas de reparo de nervos periféricos. Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados em reunião pela CEEPA – Proc. 034/2011 (Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais).

Todos os animais foram mantidos em caixas apropriadas e receberam água e ração “*ad libitum*”, sem restrições na movimentação, respeitando o regime de 12 horas de claro/escuro, pelo uso de “timer” na sala de manutenção dos animais, assim como a temperatura aproximada de 22°C.

Os 42 animais foram separados aleatoriamente em um grupo controle e quatro grupos experimentais, assim formados:

1. Grupo Controle (GC): Constituído por 10 animais. Os animais não passaram por procedimento cirúrgico e nem a laserterapia de baixa potência e foram eutanasiados com 95 e 135 dias semelhante aos grupos experimentais. O nervo facial foi coletado em razão da avaliação morfológica e morfométrica, para o cálculo da área e do diâmetro do axônio, área e diâmetro da fibra nervosa e a área e espessura da bainha de mielina.

2. Grupo Experimental Sutura Epineural Término-terminal (GES) e Grupo Experimental Adesivo de Fibrina (GEF): Constituído por 16 animais, onde no lado direito da face o ramo bucal do nervo facial foi seccionado e realizada a sutura epineural término-terminal. Já no lado esquerdo da face o ramo bucal do nervo facial foi seccionado e utilizado o adesivo de fibrina derivado de veneno de serpente, para coaptação das extremidades. Os animais foram eutanasiados com 95 dias (cinco semanas pós-cirurgia) e 135 dias (dez semanas pós-cirurgia).

3. Grupo Experimental Sutura Epineural Término-terminal e Laserterapia (GESL) e Grupo Experimental Adesivo de Fibrina e Laserterapia (GEFL): Constituído por 16 animais, onde no lado direito da face o ramo bucal do nervo facial foi seccionado e realizada a sutura epineural término-terminal. Já no lado esquerdo da face o ramo bucal do nervo facial foi seccionado e utilizado o adesivo de fibrina derivado de veneno de serpente, para coaptação das extremidades. Nesse grupo, em ambos locais operados foram submetidos à aplicação de Laser de baixa intensidade. Os animais foram eutanasiados com 95 dias (cinco semanas pós-cirurgia) e 135 dias (dez semanas pós-cirurgia).

O esquema da divisão dos grupos controle e experimentais está representado na figura abaixo:

Figura 4 - Esquema da divisão dos grupos de animais.

4.2 Procedimentos Cirúrgicos

Para o procedimento cirúrgico, aos 60 dias de idade, nos grupos experimentais (GES, GEF, GESL e GEFL), todos os animais foram pesados e submetidos à anestesia geral através de injeção intramuscular de 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).

Após serem adotadas técnicas de antisepsia para a realização do procedimento, foi realizada a tricotomia em todos os animais e os mesmos foram posicionados em decúbito lateral na placa de cortiça.

Após incisão na face com lâmina de bisturi nº 15 (aproximadamente do trágus da orelha em direção a comissura labial), procedeu-se a dissecação por planos até a exposição do ramo bucal do nervo facial (Figuras 5 e 6).

Figura 5 - Incisão (lado direito).

Figura 6 - Exposição do nervo.

O ramo bucal do nervo facial foi seccionado com tesoura de ponta reta (Figuras 7 e 8), sem remoção de fragmentos, ressaltando que todo o procedimento cirúrgico foi realizado com auxílio de microscópio cirúrgico.

Figura 7 - Realização da secção.

Figura 8 - Nervo facial seccionado.

No grupo GES, após secção do ramo bucal do nervo facial, no lado direito da face, foi realizada a sutura epineural término-terminal com fio de nylon 10-0 Ethicon® (Figura 9). Já no grupo GEF, após os mesmos procedimentos descritos acima, os cotos foram aproximados e realizou-se a coaptação com o adesivo de fibrina (Figura 10) derivado do veneno de serpente (*Crotalus durissus terrificus*). O adesivo de fibrina, fornecido pelo CEVAP (Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, UNESP/BOTUCATU-SP), é composto por três soluções separadas e homogêneas antes de sua aplicação, totalizando 80µl. O primeiro frasco possui fibrinogênio obtido a partir de sangue de búfalo (50µl), o segundo contém cloreto de cálcio (20µl) e, o último frasco possui uma fração de trombina-like (10µl). Foram utilizadas micropipetas para a aplicação do adesivo de fibrina. Para finalizar o procedimento cirúrgico, a pele foi suturada utilizando-se fio de seda 4-0 Ethicon®.

Figura 9 – Realização da sutura.

Figura 10 - Coaptação com adesivo de fibrina.

Já nos grupos GESL e GEFL, os animais passaram pelos mesmos procedimentos cirúrgicos expostos acima, porém foi realizada a aplicação do laser de pulso contínuo pós-cirurgia, utilizando uma caneta de 830 nm (comprimento de onda), 6 J/cm², por 24 segundos em três pontos dos locais operados, três vezes por semana durante cinco semanas (Figura 11). O laser utilizado foi o Laserpulse (Ibramed, Amparo, SP, Brasil).

Figura 11- Laserpulse e caneta (Ibramed).

Em seguida, os ratos foram colocados em caixas aquecidas por luz incandescente, com o objetivo de evitar a hipotermia, decorrente da anestesia geral.

Decorridas cinco e dez semanas após o procedimento operatório, em cada período, cinco animais do Grupo Controle e dezesseis animais dos Grupos Experimentais, foram eutanasiados por “*overdose*” de anestésico de Cloridrato de Tiletamina associado ao Cloridrato de Zolazepam, para coleta do ramo bucal do nervo facial íntegro no Grupo Controle, e do coto distal do ramo bucal do nervo facial nos animais dos Grupos Experimentais.

4.3 Processamento das amostras

Todas as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky por 24 horas. Para a retirada do fixador, as amostras foram lavadas 3 vezes em tampão fosfato durante 5 minutos. Logo após a fixação, as amostras foram desidratadas. Primeiramente, ficaram em uma solução de álcool 70% por 24 horas. Em seguida, por mais 2 horas em solução de álcool 95% juntamente com resina (Leica[®] Histoiresin), por 8 horas.

Em seguida realizou-se a infiltração, onde as amostras ficaram na resina (Leica[®] Histoiresin) durante 8 horas. Para a inclusão das amostras, os fragmentos foram posicionados em moldes plásticos e devidamente identificados. Os moldes foram preenchidos com histoiresina e endurecedor. O tempo para a polimerização completa foi de 48 horas, em estufa a 60°C.

Após o endurecimento, os cortes foram realizados por um micrótomo semiautomático (Model RM2245, Leica Microsystems[®], Germany) com espessura de 5 µm (Figura 12). Os cortes obtidos foram capturados no banho histológico e, as lâminas, secadas em estufa à 60°C por 2 horas.

Figura 12 - Micrótomo Leica® RM 2245 utilizado nos cortes para obtenção das lâminas.

Depois de secas, as lâminas foram coradas com Azul de Toluidina e Borato de Sódio a 1% em água destilada. Os cortes foram então analisados em microscópio óptico e também selecionadas áreas específicas para a MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão).

Para a MET, os blocos foram retrimados, seccionados com 60 a 80 nm de espessura no ultramicrotomo LBK BROMA 8800 ULTRATOME. A seguir, os cortes foram corados com acetato de Uranila e citrato de Chumbo, analisados e fotografados no MET PHILLIPS EM 301 do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, UNESP - Campus de Botucatu.

4.4 Análise Morfométrica

Para a análise morfológica e morfométrica, após a coleta, fixação, inclusão e coloração, as imagens foram capturadas no microscópio Olympus® BX50 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

Além da análise morfológica das imagens capturadas, quanto à presença de axônios (habituais ou regenerados) e distribuição das fibras, foram realizadas as seguintes mensurações na morfometria (Figura 13): área e diâmetro da fibra

nervosa, área e diâmetro do axônio e área e espessura da bainha de mielina. Foi realizada a mensuração de 220 fibras de cada nervo por animal de cada grupo.

Figura 13 - Mensurações realizadas na morfometria.

4.5 Análise Estatística

A análise quantitativa foi realizada no computador, utilizando-se o programa ImagePro-Plus® 6.0 (Media Cybernetics; Bethesda, MD, USA). Para a compreensão estatística, foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA com pós-teste de Tukey. O nível de significância para as considerações foi determinado em $p < 0.05$.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Observações Histomorfológicas

Em todos os animais dos grupos experimentais foi observado nos cortes transversais dos nervos tecido conjuntivo denso em substituição ao tecido nervoso. De um modo geral, nos grupos experimentais, as fibras mielínicas apresentaram-se irregulares com diâmetros heterogêneos e também a presença de fibras amielínicas. Os resultados serão descritos a seguir de acordo com os períodos de eutanásia (95 e 135 dias de vida), pois desse modo temos um padrão de comparação entre os grupos.

5.1.1 Período de Cinco Semanas pós-cirurgia

Observações morfológicas das secções transversais do ramo bucal do nervo facial:

- a-) nos animais do GC observa-se a presença de fibras mielínicas, apresentando disposição e diâmetros regulares (A);
- b-) nos animais dos grupos GES e GSF as fibras nervosas apresentam uma disposição irregular, com diâmetros heterogêneos das fibras mielínicas (B e C);
- c-) nos animais dos grupos GESL e GEFL pode-se observar a regeneração dos axônios no coto distal do nervo, com predomínio de fibras mielínicas (D e E);
- d-) em todos os grupos fibras amielínicas também foram observadas.

Figura 14 – Aspecto microscópico do ramo bucal do nervo facial dos grupos: A) GC; B) GES; C) GEF; D) GESL; E) GEFL. Fibras mielínicas (➡) e amielínicas (★).

5.1.2 Período de Dez Semanas pós-cirurgia

Observações morfológicas das secções transversais do ramo bucal do nervo facial:

a-) nos animais do GC observa-se fibras mielínicas com aspecto regular semelhante ao período anterior (A);

b-) nos animais dos grupos GES e GEF as fibras mielínicas apresentam uma heterogeneidade, visualizando-se uma maior quantidade de axônios em relação ao período anterior e disposição irregular (B e C);

c-) nos animais dos grupos GESL e GEFL pode-se observar os axônios em regeneração, com predomínio de fibras mielínicas (D e E).

Figura 15 – Aspecto microscópico do ramo bucal do nervo facial dos grupos: A) GC; B) GES; C) GEF; D) GESL; E) GEFL. Fibras mielínicas (➡).

5.2 Observações e Análise Histomorfométrica

5.2.1 Período de Cinco Semanas pós-cirurgia

Observações histomorfométricas das variáveis mensuradas:

a-) na área da fibra observa-se diferença significativa entre o GC e todos os grupos experimentais, bem como entre o GEF e GESL;

b-) observa-se diferença significativa entre o GC e todos os grupos experimentais, bem como entre o GEF e GESL no diâmetro da fibra;

c-) houve diferença significativa entre todos os grupos na variável área do axônio;

d-) observa-se diferença significativa no diâmetro do axônio entre o GC e todos os grupos experimentais, bem como entre o GEF e todos os demais grupos;

e-) houve diferença significativa entre o GC e todos os grupos experimentais com relação a área da bainha de mielina;

f-) na espessura da bainha de mielina observa-se diferença significativa entre GC e GEF, bem como entre o GC e GEFL.

Figura 16 - Representação gráfica das variáveis mensuradas: área e diâmetro da fibra, área e diâmetro do axônio, área e espessura da bainha de mielina. a,b,c,d - Letras diferentes indicam diferença significativa.

	Área da fibra (μm^2)	Diâmetro da fibra (μm)	Área do axônio (μm^2)	Diâmetro do axônio (μm)	Área da bainha de mielina (μm^2)	Espessura da bainha de mielina (μm)
GC	21,83 $\pm$ 1,90 ^a	5,50 $\pm$ 0,24 ^a	7,36 $\pm$ 0,48 ^a	3,29 $\pm$ 0,15 ^a	14,47 $\pm$ 1,84 ^a	2,20 $\pm$ 0,39 ^a
GES	12,91 $\pm$ 1,00 ^b	4,25 $\pm$ 0,23 ^b	5,06 $\pm$ 0,31 ^b	2,57 $\pm$ 0,16 ^b	7,85 $\pm$ 0,81 ^b	1,68 $\pm$ 0,34 ^{ac}
GEF	11,94 $\pm$ 0,83 ^{bc}	3,94 $\pm$ 0,18 ^{bc}	3,89 $\pm$ 0,24 ^c	2,32 $\pm$ 0,14 ^c	8,05 $\pm$ 0,83 ^b	1,61 $\pm$ 0,16 ^{bc}
GESL	13,98 $\pm$ 0,80 ^{bd}	4,43 $\pm$ 0,27 ^{bd}	5,60 $\pm$ 0,36 ^d	2,70 $\pm$ 0,11 ^b	8,38 $\pm$ 0,80 ^b	1,73 $\pm$ 0,37 ^{ac}
GEFL	13,22 $\pm$ 0,66 ^b	4,14 $\pm$ 0,22 ^b	4,43 $\pm$ 0,30 ^e	2,61 $\pm$ 0,11 ^b	8,79 $\pm$ 0,78 ^b	1,53 $\pm$ 0,32 ^{bc}

Tabela 1 - Média e desvio padrão das variáveis mensuradas: área e diâmetro da fibra, área e diâmetro do axônio, área e espessura da bainha de mielina. a,b,c,d - Letras diferentes indicam diferença significativa.

5.2.2 Período de Dez Semanas pós-cirurgia

Observações histomorfométricas das variáveis mensuradas:

a-) na área da fibra observa-se diferença significativa entre o GC e GES, bem como entre o GC e GEF e GC e GEFL;

b-) houve diferença significativa entre o GC e GEF, bem como entre o GC e GEFL, e GEF e GESL com relação ao diâmetro da fibra;

c-) nota-se diferença significativa entre o GC e todos os grupos experimentais na variável área do axônio;

d-) no diâmetro do axônio observa-se diferença significativa entre o GC e GES, bem como entre o GC e GEF e GC e GEFL.

Figura 17 - Representação gráfica das variáveis mensuradas: área e diâmetro da fibra, área e diâmetro do axônio, área e espessura da bainha de mielina. a,b,c,d - Letras diferentes indicam diferença significativa.

	Área da fibra (μm^2)	Diâmetro da fibra (μm)	Área do axônio (μm^2)	Diâmetro do axônio (μm)	Área da bainha de mielina (μm^2)	Espessura da bainha de mielina (μm)
GC	50,19 $\pm$ 2,66 ^a	11,34 $\pm$ 1,31 ^a	18,92 $\pm$ 1,12 ^a	6,84 $\pm$ 0,42 ^a	31,27 $\pm$ 3,55 ^a	4,50 $\pm$ 1,09 ^a
GES	45,43 $\pm$ 3,17 ^{bc}	10,02 $\pm$ 0,80 ^{ac}	14,93 $\pm$ 0,91 ^b	6,06 $\pm$ 0,45 ^{bc}	30,50 $\pm$ 2,94 ^a	3,96 $\pm$ 0,95 ^a
GEF	42,92 $\pm$ 1,99 ^{bc}	8,91 $\pm$ 0,52 ^{bc}	14,36 $\pm$ 1,25 ^b	5,58 $\pm$ 0,44 ^{bc}	28,56 $\pm$ 3,03 ^a	3,33 $\pm$ 0,35 ^a
GESL	46,21 $\pm$ 2,17 ^{ac}	10,23 $\pm$ 0,70 ^{ad}	15,05 $\pm$ 0,91 ^b	6,12 $\pm$ 0,33 ^{ac}	31,15 $\pm$ 2,25 ^a	4,11 $\pm$ 0,66 ^a
GEFL	44,01 $\pm$ 2,38 ^{bc}	9,48 $\pm$ 0,85 ^{bc}	14,71 $\pm$ 1,62 ^b	5,84 $\pm$ 0,51 ^{bc}	29,29 $\pm$ 3,72 ^a	3,63 $\pm$ 0,79 ^a

Tabela 2 - Média e desvio padrão das variáveis mensuradas: área e diâmetro da fibra, área e diâmetro do axônio, área e espessura da bainha de mielina. a,b,c,d - Letras diferentes indicam diferença significativa.

5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

5.3.1 Período de Cinco Semanas pós-cirurgia

Observações das amostras na microscopia eletrônica de transmissão:

a-) nos animais do GC as fibras mielínicas apresentam aspecto e diâmetro regulares (A);

b-) nos animais dos grupos GES e GEF há um predomínio de fibras mielínicas, porém com aspecto e diâmetros irregulares quando comparadas ao GC (B e C);

c-) nos animais dos GESL e GEFL as fibras nervosas apresentam aspecto e diâmetros semelhantes ao GES e GEF, com maior quantidade de fibras mielínicas em relação as fibras amielínicas (D e E).

Figura 18 – Microscopia eletrônica de transmissão dos grupos: A) GC; B) GES; C) GEF; D) GESL; E) GEFL. Fibras mielínicas ( ) e amielínicas ( ).

5.3.2 Período de Dez Semanas pós- cirurgia

Observações das amostras na microscopia eletrônica de transmissão:

a-) nos animais do GC as fibras mielínicas apresentam aspecto e diâmetro regulares, presença do núcleo da célula de Schwann (A);

b-) nos animais dos grupos GES e GEF há um predomínio de fibras mielínicas, com melhor organização do fascículo quando comparadas ao período anterior (B e C);

c-) nos animais dos GESL e GEFL também observamos o predomínio de fibras mielínicas e organização do fascículo, bem como a presença de fibras colágenas nos animais do GEF (D e E).

Figura 19 – Microscopia eletrônica de transmissão dos grupos: A) GC; B) GES; C) GEF; D) GESL; E) GEF. Fibras mielínicas ( ) Núcleo da célula de Schwann ( ) Fibras colágenas ( ) Mastócito ( ) e Fibras amielínicas ( ).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho buscou-se comparar a reparação do nervo facial por meio de duas técnicas: a sutura epineural término-terminal e o adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente, e verificar a influência da laserterapia de baixa potência nesse processo de regeneração. Foi observado que a reparação por meio da sutura epineural término-terminal apresentou melhores resultados em relação ao adesivo de fibrina, porém, o adesivo também é um método eficaz na regeneração de nervos periféricos seccionados e a terapia por laser de baixa não influencia o processo de reparação.

A reparação do nervo facial por meio da sutura epineural término-terminal tem se mostrada efetiva como um veículo para a regeneração dos axônios, estando indicada nos casos de lesões neurotímicas, que não apresentam perda tecidual e os cotos podem ser aproximados sem tensão. No presente estudo, o ramo bucal do nervo facial foi seccionado sem a remoção de fragmentos, permitindo a aproximação dos cotos e a realização da sutura epineural com resultados satisfatórios. Esses dados concordam com pesquisas anteriores onde autores afirmam que a técnica de eleição nos casos onde o nervo sofreu secção e lesões de pequenas extensões é a sutura epineural término-terminal (JOHSON; SOUCACOS, 2008; LEPSKI; NIKKA; MARCHESE, 2009).

Na análise histomorfológica, nos cortes transversais do ramo bucal do nervo facial, observou-se, nos grupos experimentais, de um modo geral, predomínio de fibras mielínicas com disposição e diâmetros irregulares, mas também a presença de fibras amielínicas em todos os grupos. Nos animais do GESL e GEFL, nos períodos de cinco e dez semanas pós-cirurgia, pode-se observar a regeneração dos axônios no coto distal do nervo, com predomínio de fibras mielínicas. Já no GC encontra-se a presença de fibras mielínicas com diâmetros mais regulares e homogêneos. Em concordância com esses dados, trabalhos realizados a partir da técnica de tubulização utilizando a veia jugular externa preenchida ou não com o músculo tibial caudal e ou associada à cultura de células tronco extraídas de tecido adiposo na reparação de nervos periféricos, constataram a presença de fibras mielínicas e amielínicas com diâmetros heterogêneos, com melhor organização do

fascículo nos grupos experimentais no período de doze semanas quando comparado com o menor período pós-operatório (ROQUE, 2007; ROQUE, 2008; ROSA JUNIOR, 2013).

No período de dez semanas pós-cirurgia, visualizou-se a presença de fibras mielínicas com disposição irregular, mas com uma maior quantidade de axônios em relação ao período anterior de cinco semanas pós-cirurgia, verificando um estágio de evolução nos grupos experimentais. Nesse estudo o tempo para avaliação final da reparação nervosa foi de 135 dias (dez semanas), estando de acordo com Barcelos et al. (2003), que também encontraram uma boa regeneração nervosa no período de dez semanas. A literatura apresenta dados em que a melhora morfofuncional em relação ao processo de reparo nervoso alcança o valor máximo por volta da 12^a semana, período em que se podem observar diferenças significantes entre os grupos (LI et al., 2013; MOIMAS et al., 2013).

Nas observações histomorfológicas notou-se, em todos os animais dos grupos experimentais, a presença de vasos sanguíneos, que é um fator importante na regeneração de qualquer tecido do organismo. Além disso, encontrou-se tecido conjuntivo denso, distribuído na periferia e parte central, fato esse relevante para a regeneração de nervos periféricos, conforme descrições semelhantes encontradas na literatura (RODRIGUES; SILVA, 2001; XU; MIDHA; ZOCHODNE, 2010).

Com relação à análise morfométrica, o GESL apresentou os melhores resultados em algumas das variáveis mensuradas quando comparado aos demais grupos experimentais. Esse resultado está de acordo com a literatura onde a técnica de sutura epineural é considerada um padrão ouro no processo de regeneração de nervos periféricos (JOHSON; SOUCACOS, 2008) e que a associação da laserterapia é uma alternativa interessante na regeneração periférica, levando a uma recuperação funcional significativa (MENOVSKY; BEEK, 2001; ROCHKIND et al., 2007).

Na variável área da bainha de mielina, no período de dez semanas pós-cirurgia, o GC obteve a média de 31,27 ($\pm 3,55$) μm^2 , sendo que o GESL atingiu a média de 31,15 ($\pm 2,25$) μm^2 , apresentado resultados próximos ao padrão do nervo original intacto, além do fato de que o GC e os grupos experimentais obtiveram resultados estatisticamente semelhantes, demonstrando que as duas técnicas de reparo, associadas ou não a laserterapia, são eficientes no processo de regeneração nervosa. Com relação a espessura da bainha de mielina, observou-se

que o GC obteve a média de 4,5 ($\pm 1,09$) μm e o GESL atingiu a média de 4,11 ($\pm 0,66$) μm , apresentando também resultados próximos ao padrão do nervo intacto, pois no GC e nos grupos experimentais encontraram-se resultados estatisticamente semelhantes, resultados que concordam com a literatura consultada, que demonstraram resultados satisfatórios em relação ao grau de maturação das fibras nervosas (TOLEDO, 2011; ATTAR et al., 2012).

Pesquisas procurando comparar a reparação de nervos periféricos por meio da sutura epineural, adesivo de fibrina e laser de baixa potência, relataram que tanto a sutura epineural quanto o adesivo de fibrina são efetivos no processo de reparo e que não houve diferenças significantes entre as três técnicas quanto à mensuração da espessura e diâmetro dos axônios, bem como o grau de mielinização das fibras (MENOVSKY; BEEK, 2001; BARCELOS et al., 2003; ROSA JUNIOR, 2013), dados que concordam com os resultados encontrados em nosso trabalho, e que existiu uma tendência de axônios mais mielinizados nos segmentos dos nervos que utilizaram a laserterapia de baixa potência.

Comparando-se o GES com o GEF no período de dez semanas pós-cirurgia, observa-se que não houve diferença significativa em todas as variáveis mensuradas, indicando que o adesivo de fibrina também é um método eficaz na reparação de nervos periféricos seccionados. Durante os procedimentos de cirurgia experimental, demonstrou ser de fácil utilização e manipulação, além de apresentar boas propriedades de adesão. Esses dados concordam com outros estudos onde se relatou que o adesivo de fibrina pode ser considerado uma técnica em potencial para o tratamento de lesões periféricas, pois apresentam fácil aplicação e custo inferior em relação às colas comerciais (BARBIZAN et al., 2013).

O adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente utilizado em nosso trabalho não contém sangue humano, evitando assim a transmissão de doenças infecciosas, além de apresentar uma boa capacidade adesiva. Assim, é um selante biológico e biodegradável, podendo ser coadjuvante em procedimentos de suturas convencionais (BARROS et al., 2009). Pesquisas apontam que o adesivo de origem humana liofilizado, por ser derivado do sangue, pode levar a infecções e outras reações adversas, além de apresentar alto custo (KAWAMURA et al., 2002).

De acordo com estudos pode-se ainda afirmar que o reparo por meio das suturas epineurais necessita da manipulação dos cotos, o que leva a formação de fibroses e desorganização axonal (SANDRINI; PEREIRA-JÚNIOR, GAY-ESCODA,

2007), além de requerer maior habilidade e precisão do cirurgião (KARALEZLI et al., 2008; WHITLOCK et al., 2010; SAMEEM; WOOD; BAIN, 2011). O adesivo de fibrina foi utilizado na reconstrução do plexo braquial em humanos e demonstrou que pode proporcionar resistência mecânica, evitando assim a ruptura do nervo durante o período pós-operatório, sendo uma alternativa eficaz no tratamento da regeneração de nervos periféricos devido a sua flexibilidade e versatilidade nas aplicações clínicas (TSE; KO, 2012).

De um modo geral, os dados encontrados demonstraram que o nervo facial apresentou uma boa regeneração axonal após a transecção, concordando com outras pesquisas realizadas com o nervo facial, utilizando uma metodologia semelhante à empregada no presente estudo, obtiveram os mesmos resultados, sugerindo que tanto as técnicas de neurografia, como o adesivo de fibrina, associadas ou não a terapia por laser de baixa intensidade, podem ser empregadas no processo de regeneração do nervo facial, pois permitem um aumento no número e diâmetro das fibras mielinizadas no coto distal do nervo (MENOVSKY; BEEK, 2001; JÚNIOR; VALMASEDA-CASTELLÓN; GAY-ESCODA, 2004; ATTAR et al., 2012; HADLOCK et al., 2013).

Com relação à utilização da luz de baixa potência no processo de regeneração e recuperação de lesões nervosas periféricas, estudos mostram que o laser provoca a expressão de fatores neurotróficos que leva a um aumento da taxa de regeneração, além de promover uma diminuição da dor inflamatória e formação de edema (JAYASREE et al., 2001). No presente trabalho, com base nos dados estatísticos, observou-se que entre o GES e GESL, na maioria das variáveis mensuradas, apresentaram resultados semelhantes ao GEF e GEFL em ambos os períodos. Pesquisas realizadas com o objetivo de verificar o efeito da irradiação do laser com comprimento de onda de 830 nm, semelhante ao utilizado em nosso trabalho, no comportamento do nervo isquiático em ratos submetidos à lesão por esmagamento permitiram observar, por meio de análise histomorfológica, que não houve diferença significativa entre os grupos com relação a degeneração axonal, e que quanto ao infiltrado inflamatório, nas lâminas do grupo de 14 dias, foi encontrado uma quantidade significativamente menor em relação ao demais grupos, mostrando que o laser contribui para a redução do processo inflamatório decorrente da lesão (VINCK et al., 2003; GONÇALVES et al., 2010).

Em termos de protocolo, nos animais do GESL e GEFL utilizou-se o laser de pulso contínuo pós-cirurgia, utilizando um comprimento de onda de 830 nm GaAlAs, 6 J/cm^2 , de acordo com as instruções do equipamento (Laserpulse, Ibramed). Estudos buscando analisar se existe diferença entre a aplicação do laser no pós-operatório imediato ou sete dias pós-operatório em lesões de esmagamento do nervo isquiático em ratos, utilizando um comprimento de onda de 650 nm (laser diodo) e 10 J/cm^2 , mostraram que não houve diferença significativa entre os períodos de aplicação e que o comprimento de onda de 650 nm é eficiente no tratamento de lesões de nervos periféricos, pois a análise morfológica indica que a luz de baixa intensidade tem a capacidade de reduzir a migração de células mononucleares do nervo danificado, levando a uma diminuição do edema, promovendo uma regeneração mais rápida (AKGUL; GULSOY; GULCUR, 2014).

Existem ainda trabalhos relatando evidências que a luz pulsada tem efeitos diferentes daqueles da luz de onda contínua e que a luz de baixa intensidade tem sido uma modalidade crescente utilizada nas áreas médicas visando à melhora no processo de cicatrização de feridas e regeneração dos tecidos, alívio da dor e inflamação e atenuar a degeneração em processos neurológicos (HASHIMI et al., 2010). Mas, apesar dos resultados satisfatórios encontrados nas pesquisas clínicas e experimentais e a terapia por laser estar se firmando como um recurso terapêutico na reparação de nervos periféricos, estamos de acordo com dados encontrados em várias pesquisas (ROCHKIND et al., 2007; AKGUL; GULSOY; GULCUR, 2014) que afirmam a necessidade da realização de estudos futuros para obtenção da comprovação dos efeitos do laser sobre a reparação de nervos periféricos, bem como a padronização dos protocolos aplicados, pois existe uma diversidade entre os estudos, desde o comprimento de onda do laser até os tipos de lesões provocadas, bem como os parâmetros de avaliação.

Na observação das amostras na microscopia eletrônica de transmissão no período de dez semanas pós-cirurgia, nos animais dos grupos GES e GEF, nota-se a presença de fibras mielinizadas com melhor organização do fascículo nervoso em relação ao período de cinco semanas, bem como a presença de fibras colágenas. Esses dados concordam com outros trabalhos envolvendo o processo de reparo do nervo facial, onde com base na microscopia eletrônica observou-se a presença de fibras mielínicas e amielínicas ao redor de um núcleo desorganizado. As células mais abundantes eram grandes e irregulares, cheias de retículo

endoplasmático rugoso, características típicas de fibroblastos, grande fonte de colágeno. Além disso, foi encontrado feixes de fibras colágenas em secções transversais, oblíquas e longitudinais, indicando uma orientação aleatória das fibras no tecido em regeneração. De acordo com a literatura, de uma maneira geral, o colágeno fornece suporte biológico para o crescimento celular, aumentando a diferenciação de vários tipos celulares (WAITAYAWINYU et al., 2007; MOORE et al., 2012).

Os resultados do presente trabalho indicam que as duas técnicas avaliadas, tanto a sutura epineural como o adesivo de fibrina podem ser utilizadas em procedimentos de neurorrafia dos nervos periféricos, assim como foi encontrado na literatura a associação de ambas as técnicas (MARTINS et al., 2005). A terapia por laser de baixa intensidade é uma alternativa promissora auxiliar no processo de recuperação de lesões nervosas, porém mais estudos são necessários para comprovação de sua eficácia, pois os mecanismos biológicos da interação tecido e laser ainda não estão totalmente elucidados. Além do fato da diversidade da metodologia de aplicação, como o comprimento de onda, número de aplicações e período de irradiação. Uma investigação futura buscando analisar fatores neurotróficos do sistema nervoso, análise funcional e alterações no protocolo da laserterapia de baixa potência, após a lesão nervosa, poderá complementar os resultados encontrados.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Considerando a metodologia empregada e os dados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- a reparação nervosa do nervo facial submetido à sutura epineural término-terminal apresentou melhores resultados em relação ao adesivo de fibrina;
- a laserterapia não influenciou o processo de regeneração nervosa do nervo facial quando submetido à sutura epineural término-terminal;
- a laserterapia não influenciou o processo de regeneração nervosa do nervo facial quando submetido a coaptação por meio do adesivo de fibrina;
- o GESL apresentou os resultados que mais se aproximaram do GC, em algumas das variáveis mensuradas.

Referências

REFERÊNCIAS**(Formato Vancouver)**

Ahmed MR, Vairamuthu S, Shafiuzama M, Basha SH, Jayakumar R. Microwave irradiated collagen tubes as a better matrix for peripheral nerve regeneration. *Brain Res.* 2005 Jun 7;1046(1-2):55-67.

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.

Askar I, Sabuncuoglu BT. Superficial or deep implantation of motor nerve after denervation: an experimental study--superficial or deep implantation of motor nerve. *Microsurgery.* 2002;22(6):242-8.

Attar BM, Zalzali 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.

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.

Barcelos AS, Rodrigues AC, Silva MD, Padovani CR. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. *Microsurgery.* 2003;23(1):66-71.

Barros LC, Ferreira RS Jr, Barraviera SR, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJ, Toscano E, Barraviera B. 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.

Bascom DA, Schaitkin BM, May M, Klein S. Facial nerve repair: a retrospective review. *Facial Plast Surg.* 2000;16(4):309-13.

Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol Res.* 2004 Mar;26(2):151-60.

Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus.* 2004 May 15;16(5):E1.

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.

Costa FL, Rodrigues RS, Izidoro LF, Menaldo DL, Hamaguchi A, Homs-Brandeburgo MI, Fuly AL, Soares SG, Selistre-de-Araújo HS, Barraviera B, Soares AM, Rodrigues VM. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon.* 2009 Nov;54(6):725-35.

Chen YS, Hsu SF, Chiu CW, Lin JG, Chen CT, Yao CH. Effect of low-power pulsed laser on peripheral nerve regeneration in rats. *Microsurgery*. 2005;25(1):83-9.

Cheng FC, Sheu ML, Su HL, Chen YJ, Chen CJ, Chiu WT, Sheehan J, Pan HC. The effect of exercise on mobilization of hematopoietic progenitor cells involved in the repair of sciatic nerve crush injury. *J Neurosurg*. 2013 Mar;118(3):594-605.

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.

Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jun;49(6):2329-35.

Duerksen, E. Tratamento cirúrgico da neurite hansênica. In: Duerksen, E, Virmond, M. *Cirurgia reparadora e reabilitação em hanseníase*. Bauru: ALM International. 1997:107-17.

Fattah A, Borschel GH, Zuker RM. Reconstruction of facial nerve injuries in children. *J Craniofac Surg*. 2011 May;22(3):782-8.

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

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.

Geuna S, Tos P, Battiston B, Guglielmone R, Giacobini-Robecchi MG. Morphological analysis of peripheral nerve regenerated by means of vein grafts filled with fresh skeletal muscle. *Anat Embryol (Berl)*. 2000 Jun;201(6):475-82.

Gharabaghi A, Heckl S, Kaminsky J, Torka W, Nägele T, Tatagiba M, Löwenheim H. [Cranial nerve deficits caused by uncommon skull base lesions of the cavernous sinus]. *HNO*. 2007 Apr;55(4):278-80.

Giannessi E, Coli A, Stornelli MR, Miragliotta V, Pirone A, Lenzi C, Burchielli S, Vozzi G, De Maria C, Giorgetti M. An Autologously Generated Platelet-Rich Plasma Suturable Membrane May Enhance Peripheral Nerve Regeneration after Neurotomy in an Acute Injury Model of Sciatic Nerve Neurotmesis. *J Reconstr Microsurg*. 2014 May 16.

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.

Gonçalves RB, Marques JC, Monte-Raso VV, Zamarioli A, Carvalho LC, Fazan VP, Tavares MR. Efeitos da aplicação do laser de baixa potência na regeneração do nervo isquiático em ratos. *Fisioterapia e pesquisa.*, São Paulo 2010 Jan/Mar; 17(1): 34-9.

Gonçalves WL, Souza FM, Conti CL, Cirqueira JP, Rocha WA, Pires JG, Barros LA, Moysés MR. Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Jun;40(6):877-84.

Gosk J, Knakiewicz M, Wiacek R, Reichert P. [The use of the fibrin glue in the peripheral nerves reconstructions]. *Polim Med.* 2006;36(2):11-5.

Guntinas-Lichius O, Sittel C. [Diagnostics of diseases and the function of the facial nerve]. *HNO.* 2004 Dec;52(12):1115-30; quiz 1131-2.

Guntinas-Lichius O, Klusmann JP, Wittekindt C, Stennert E. Parotidectomy for benign parotid disease at a university teaching hospital: outcome of 963 operations. *Laryngoscope.* 2006 Apr;116(4):534-40.

Guyton, A.C. *Tratado de Fisiologia Médica.* 4ed Ed: Elsevier, Rio de Janeiro; 2006.

Hadlock TA, Kim SW, Weinberg JS, Knox CJ, Hohman MH, Heaton JT. Quantitative analysis of muscle histologic method in rodent facial nerve injury. *JAMA Facial Plast Surg.* 2013 Mar 1;15(2):141-6.

Hanna AS, Dempsey R. Nanofibrous channels: a potential alternative to nerve grafting. *Neurosurgery.* 2010 Oct;67(4):N14-5.

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

Hohman MH, Bhama PK, Hadlock TA. Epidemiology of iatrogenic facial nerve injury: a decade of experience. *Laryngoscope.* 2014 Jan;124(1):260-5.

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.

Hu N, Wu H, Xue C, Gong Y, Wu J, Xiao Z, Yang Y, Ding F, Gu X. Long-term outcome of the repair of 50 mm long median nerve defects in rhesus monkeys with marrow mesenchymal stem cells-containing, chitosan-based tissue engineered nerve grafts. *Biomaterials.* 2013 Jan;34(1):100-11.

Hundeshagen G, Szameit K, Thieme H, Finkensieper M, Angelov DN, Guntinas-Lichius O, Irintchev A. Deficient functional recovery after facial nerve crush in rats is associated with restricted rearrangements of synaptic terminals in the facial nucleus. *Neuroscience.* 2013 Jun 24;248C:307-318.

IJkema-Paassen J, Meek MF, Gramsbergen A. Long-term reinnervation effects after sciatic nerve lesions in adult rats. *Ann Anat.* 2005 Apr;187(2):113-20.

Jayasree RS, Gupta AK, Rathinam K, Mohanan PV, Mohanty M. The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. *J Biomater Appl.* 2001 Jan;15(3):176-86.

Jia YH, Jin Y, Lü QM, Li DS, Wang WY, Xiong YL. Jerdonase, a novel serine protease with kinin-releasing and fibrinogenolytic activity from *Trimeresurus jerdonii* venom. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai).* 2003 Aug;35(8):689-94.

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

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.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* São Paulo: KOOGAN; 11a. ed: 2009.

Karalezli A, Kucukerdonmez C, Akova YA, Altan-Yaycioglu R, Borazan M. Fibrin glue versus sutures for conjunctival autografting in pterygium surgery: a prospective comparative study. *Br J Ophthalmol.* 2008 Sep;92(9):1206-10.

Kawamura M, Sawafuji M, Watanabe M, Horinouchi H, Kobayashi K. Frequency of transmission of human parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during thoracic surgery. *Ann Thorac Surg.* 2002 Apr;73(4):1098-100.

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

Laffort P, Roudaut R, Roques X, Lafitte S, Deville C, Bonnet J, Baudet E. Early and long-term (one-year) effects of the association of aspirin and oral anticoagulant on thrombi and morbidity after replacement of the mitral valve with the St. Jude medical prosthesis: a clinical and transesophageal echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Mar 1;35(3):739-46.

Le Beau JM, Ellisman MH, Powell HC. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. *J Neurocytol.* 1988 Apr;17(2):161-72.

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

Li BC, Jiao SS, Xu C, You H, Chen JM. PLGA conduit seeded with olfactory ensheathing cells for bridging sciatic nerve defect of rats. *J Biomed Mater ResA.* 2010 Sep 1;94(3):769-80.

-
- Li Y, Zhang Y, Han W, Hu F, Qian Y, Chen Q. TRO19622 promotes myelin repair in a rat model of demyelination. *Int J Neurosci*. 2013 Nov;123(11):810-22.
- Lindsay RW, Heaton JT, Edwards C, Smitson C, Vakharia K, Hadlock TA. Daily facial stimulation to improve recovery after facial nerve repair in rats. *Arch Facial Plast Surg*. 2010 May-Jun;12(3):180-5.
- 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.
- 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.
- Maciel FO, Viterbo F, Chinaque LFC, Souza BM. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neurorrhaphy of the peroneal nerve in rats. *Acta Cir Bras*. 2013 Jan;28(1):39-47.
- Machado A. *Neuroanatomia Funcional*. 2a. Ed: Atheneu, 2004.
- Magnaghi V, Conte V, Procacci P, Pivato G, Cortese P, Cavalli E, Pajardi G, Ranucci E, Fenili F, Manfredi A, Ferruti P. Biological performance of a novel biodegradable polyamidoamine hydrogel as guide for peripheral nerve regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Jul;98(1):19-30.
- Marsh N, Williams V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*. 2005 Jun 15;45(8):1171-81.
- Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 1998 Dec;36(12):1749-800.
- Martins RS, Siqueira MG, Silva CF, Godoy BO, Pereira JP. Electrophysiological evaluation of sciatic nerve regeneration rat, with use of suture, fibrin glue or combination of both techniques. *Arq Neuropsiquiatr* 2005;63(3-A):601-604.
- Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 7;1477(1-2):146-56.
- Maturana LG, Pierucci A, Simões GF, Vidigal M, Duek EA, Vidal BC, Oliveira AL. Enhanced peripheral nerve regeneration by the combination of a polycaprolactone tubular prosthesis and a scaffold of collagen with supramolecular organization. *Brain Behav*. 2013 Jul;3(4):417-30.
- Matsumine H, Sasaki R, Tabata Y, Matsui M, Yamato M, Okano T, Sakurai H. Facial nerve regeneration using basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014 Apr 16.

Menovsky T, Beek JF. Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves: a comparative functional, histological, and morphometric study in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg*. 2001 Oct;95(4):694-9.

Millesi H. Reappraisal of nerve repair. *Surg Clin North Am*. 1981 Apr;61(2):321-40.

Moimas S, Novati F, Ronchi G, Zacchigna S, Fregnan F, Zentilin L, Papa G, Giacca M, Geuna S, Perroteau I, Arnež ZM, Raimondo S. Effect of vascular endothelial growth factor gene therapy on post-traumatic peripheral nerve regeneration and denervation-related muscle atrophy. *Gene Ther*. 2013 Oct;20(10):1014-21.

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.

Nichterwitz S, Hoffmann N, Hajosch R, Oberhoffner S, Schlosshauer B. Bioengineered glial strands for nerve regeneration. *Neurosci Lett*. 2010 Oct 29;484(2):118-22.

Ozsoy U, Hizay A, Demirel BM, Ozsoy O, Bilmen Sarikcioglu S, Turhan M, Sarikcioglu L. The hypoglossal-facial nerve repair as a method to improve recovery of motor function after facial nerve injury. *Ann Anat*. 2011 Jul;193(4):304-13.

Papalia I, Raimondo S, Ronchi G, Magaudo L, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S. Repairing nerve gaps by vein conduits filled with lipoaspirate-derived entire adipose tissue hinders nerve regeneration. *Ann Anat*. 2013 May;195(3):225-30.

Reis FA. A comparative study of axonal sprouting from the vagus nerve in autologous nerve graft. *J. Venom. Anim*. 2000 May;6(1):120-120 .

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

Rochkind S, Nissan M, Lubart R, Avram J, Bartal A. The in-vivo-nerve response to direct low-energy-laser irradiation. *Acta Neurochir (Wien)*. 1988;94(1-2):74-7.

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.

Rodrigues Ade C, Silva MD. Inside-out versus standard artery graft to repair a sensory nerve in rats. *Microsurgery*. 2001;21(3):102-7.

Roque DD. Enxerto venoso ao avesso e normal, com ou sem preenchimento de músculo, em regeneração nervosa de ratos. 2008. 127f. Tese (Doutorado em Bases gerais de Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual paulista, Botucatu.

Roque JS. Enxertos venosos ao avesso e normal, preenchidos com plasma rico em plaquetas em nervo misto de rato. 2007. 128f. Tese (Doutorado em Bases gerais de Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual paulista, Botucatu.

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. 2013. 154f. Tese (Doutorado em Bases gerais de Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Salomone R, Bento RF, Costa HJ, Azzi-Nogueira D, Ovando PC, Da-Silva CF, Zanatta DB, Strauss BE, Haddad LA. 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.

Schwartz JH, Jessell TM, Kandel ER. *Princípios Da Neurociência*. 4ed. Barueri: Manole, 2003

Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain*, Oxford. 1943 (66):37-288.

Silva DN, Silva AC, Aydos RD, Viterbo F, Pontes ER, Odashiro DN, Castro RJ, Augusto DG. Nerve growth factor with fibrin glue in end-to-side nerve repair in rats. *Acta Cir Bras*. 2012 Apr;27(4):325-32.

Skouras E, Pavlov S, Bendella H, Angelov DN. Stimulation of trigeminal afferents improves motor recovery after facial nerve injury: functional, electrophysiological and morphological proofs. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2013;213:1-105, vii.

Snyder MJ, Wilensky JA, Fortin JD. Current applications of electrotherapeutics in collagen healing. *Pain Physician*. 2002 Apr;5(2):172-81.

Sood S, Anthony R, Homer JJ, Van Hille P, Fenwick JD. Hypoglossal-facial nerve anastomosis: assessment of clinical results and patient benefit for facial nerve palsy following acoustic neuroma excision. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2000 Jun;25(3):219-26.

Srinivasan, H., Palande, D. *Essencial surgery in leprosy — techniques for district hospitals*. Genebra: WHO, 1997:137.

Stipp-Brambilla EJ, Viterbo F, Labbé D, Garbino JA, Bernardelli MM. Double muscle innervation using end-to-side neurorrhaphy in rats. *Sao Paulo Med J*. 2012;130(6):373-9.

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

Swartz KR, Boland M, Fee DB. External neurolysis may result in early return of function in some muscle groups following brachial plexus surgery. *Clin Neurol Neurosurg*. 2012 Jul;114(6):768-75.

Taras JS, Nanavati V, Steelman P. Nerve conduits. *J Hand Ther*. 2005 Apr-Jun;18(2):191-7.

Testut y Latarget A. Nervios craneales. In: *Tratado de Anatomia Humana*. 3a. Barcelona: Salvat Editores; 1958. p. 57-209.

Toledo GL. Enxerto com tubo de polietileno poroso preenchido com gordura autóloga no reparo de nervo periférico: uma nova proposta. 2011. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru.

Trumble TE, Parvin D. Physiology of peripheral nerve graft incorporation. *J Hand Surg Am*. 1994 May;19(3):420-7.

Tse R, Ko JH. Nerve glue for upper extremity reconstruction. *Hand Clin*. 2012 Nov;28(4):529-40.

Verdú E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst*. 2000 Dec;5(4):191-208.

Vyas VK, Brahmbhatt K, Bhatt H, Parmar U, Patidar R. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013 Feb;3(2):156-62.

Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2003;18(2):95-9.

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

Viterbo F, Faleiros HRP. Técnicas de neurorrafia. In: Mélega JM *Cirurgia Plástica: Fundamentos e Arte*. Rio de Janeiro; 2002 p. 477-483.

Viterbo F, Amr AH, Stipp EJ, Reis FJ. End-to-side neurorrhaphy: past, present, and future. *Plast Reconstr Surg*. 2009 Dec;124(6 Suppl):e351-8.

Xu Q, Midha R, Zochodne DW. The microvascular impact of focal nerve trunk injury. *J Neurotrauma*. 2010 Mar;27(3):639-46.

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.

Whitlock EL, Tuffaha SH, Luciano JP, Yan Y, Hunter DA, Magill CK, Moore AM, Tong AY, Mackinnon SE, Borschel GH. Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. Muscle Nerve. 2009 Jun;39(6):787-99.

Whitlock EL, Kasukurthi R, Yan Y, Tung TH, Hunter DA, Mackinnon SE. Fibrin glue mitigates the learning curve of microneurosurgical repair. Microsurgery. 2010;30(3):218-22.

Warwick L, Willians PL, Dyson M, Bannister LH. Neurologia. In: Gray Anatomia, 37ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995. p. 807-1160.

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.

Anexos

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 034/2011

Bauru, 20 de dezembro de 2011.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Reparação do nervo facial com sutura epineural término-terminal e coaptação com adesivo de fibrina em ratos associado ou não à laserterapia**, de autoria de Daniela Vieira Buchaim, foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão realizada no dia **20 de dezembro de 2011**.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, 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. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo
Docente do Departamento de Ciências Biológicas