WASHINGTON LIMA

Recuperação funcional após aplicação de toxina abobotulínica A no músculo gastrocnêmio contralateral ao reparo do nervo tibial em ratos

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

Orientadora: Dr^a. Alessandra Grassi Salles

SÃO PAULO 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

```
Lima, Washington
Recuperação funcional após aplicação de toxina
abobotulínica A no músculo gastrocnêmio
contralateral ao reparo do nervo tibial em ratos /
Washington Lima. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.
Orientadora: Alessandra Grassi Salles.
Descritores: 1.Toxina botulínica 2.Teste da
marcha 3.Ratos 4.Experimental 5.Neurorrafia
6.Regeneração nervosa 7.Músculo gastrocnêmio
8.Eletromiografia 9.Paralisia facial
USP/FM/DBD-418/19
```

A meus pais, **Lurdes** e **Francisco**, pela dedicação e incentivo constantes, durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Rolf Gemperli, Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, um estímulo decisivo e constante durante todo o percurso dessa jornada.

À Dra. Alessandra Grassi Salles, pelos imprescindíveis ensinamentos profissionais, comprometimento, apoio e dedicação ímpares na orientação deste trabalho, fatores fundamentais na lapidação e publicação deste projeto.

Ao Professor Dr. José Carlos Marques de Faria, cirurgião plástico por quem tenho grande admiração, que contribuiu de forma única para minha formação não apenas mediante seu exemplo e oportunidades, sempre me incentivando a uma busca constante de aperfeiçoamento na especialidade.

À Dra. Dulce Maria Fonseca Soares Martins, não só por seu apoio como também pelos ensinamentos essenciais no campo da cirurgia plástica.

Ao Professor Dr. Júlio Morais Besteiro e à Dra. Adelina Fatima do Nascimento Remigio, por sua disposição em participar da banca de qualificação desta tese e pela significativa contribuição na elaboração final do estudo.

Ao Dr. André Coelho Nepomuceno, tanto pelo incentivo e amizade como por sua ativa contribuição nas diversas etapas deste projeto.

À Dra. Raquel Salomone, pelo auxílio na execução e análise da eletromiografia deste trabalho.

À Dra. Patrícia Krunn, pela grande colaboração na condução inicial do experimento e na troca de informações durante a fase de conclusão do projeto. A Eliane Gazetto, pela ajuda e orientação durante todo o período de pós-graduação.

Ao Sr. Euro Couto, pelo trabalho de análise e orientação estatística.

Ao Dr. Eduardo Fernandes da Costa, pela ajuda na elaboração do projeto inicial e revisão bibliográfica dos trabalhos experimentais com toxina em ratos.

A Olga Cafalcchio, pela revisão de português.

Ao Dr. Danilo Debs, por sua amizade e especial cuidado em relação às ilustrações desta tese.

Ao Dr. Hélio Alves, Dr. Thadeu Rangel e Dr. Fábio Busnardo, pela amizade, ensinamentos, exemplo e suporte, fatores fundamentais no início de minha vida profissional.

A Maria Helena Vargas, pela editoração, formatação e diagramação desta tese.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.*

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas Lista de figuras Lista de gráficos Lista de tabelas Resumo Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	7
 3 MÉTODOS 3.1 Normatizações 3.1.1 Manejo dos animais 3.1.2 Comissão de ética 	9
3.2 Animais	
3.2.1 Caracterização da amostra	11
3.2.2 Ambiente de experimentação	11
3.3 Caracterização dos grupos	12
3.4 Procedimentos	
3.4.1 Preparo, dose e injeção da toxina abobotulinica A	
3.4.2 Procedimento cirurgico	13 19
3.5.1 Massa corporal	10 18
3.5.2 Teste da marcha	10 18
2.5.3 Eletromiografia	20
3.5.4 Peso do músculo gastrocnêmio	
3.5.5 Análise histológica do nervo tibial	
3.5.5.1 Coleta das peças	24
3.5.5.2 Processamento histológico	25
3.5.5.3 Densidade axonal	25
3.5.5.4 Arquitetura geral do nervo	
3.6 Eutanásia	28
3.7 Análise Estatística	29
4 Resultados	
4.1 Massa Corporal	31
4.2 Teste da Marcha	
4.3 Eletromiografia	37
4.3.1 Amplitude	37
4.3.2 Latência	40
4.4 Peso do Músculo Gastrocnêmio	
4.5 Avaliação Histológica do Nervo Tibial	
4.5.1 Densidade axonal	
4.5.2 Avallação histologica qualitativa	48

5	DISCUSSÃO	.51
6	Conclusões	.70
7	Referências	.72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Botox®	-	Toxina onabotulínica A		
С	-	Grupo controle		
CEP	-	Comitê de Ética em Pesquisa		
CEUA	-	Comissões de Ética no Uso de Animais		
COBEA	-	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal		
CONCEA	-	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal		
CP	-	Comprimento da pegada		
CPE	-	Comprimento da pegada experimental		
CPN	-	Comprimento da pegada normal		
DDI	-	Distância entre os dedos intermediários		
DDIE	-	Distância entre os dedos intermediários da pegada experimental		
DDIN	-	Distância entre os dedos intermediários da pegada normal		
Dysport [®]	-	Toxina abobotulínica A		
E	-	Grupo estudo		
FMUSP	-	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo		
IFT	-	Índice de Função do Nervo Tibial		
LIM 04	-	Laboratório de Investigação Médica de Microcirurgia Experimental e Cirurgia Plástica		
LP	-	Largura da pegada		
LPE	-	Largura da pegada experimental		
LPN	-	Largura da pegada normal		
MG	-	Músculo gastrocnêmio		
Ν	-	Grupo neurorrafia		
NC	-	Nervo ciático		
NF	-	Nervo fibular		
NS	-	Nervo sural		
NT	-	Nervo tibial		
PAMC	-	Potencial de ação muscular composto		
S	-	Grupo seccionado		
ТХВ	-	Grupo toxina botulínica		

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Planejamento da incisão	14
Figura 2 -	Exposição do nervo ciático (NC), nervo tibial (NT), nervo sural (NS), nervo fibular (NF) e músculo gastrocnêmio (MG)	14
Figura 3 -	Grupo S: secção do nervo tibial direito	15
Figura 4 -	Grupo TXB: toxina botulínica no músculo gastrocnêmio direito	16
Figura 5 -	Grupo N: secção do nervo tibial direito seguida por neurorrafia término-terminal imediata	16
Figura 6 -	Grupo E: secção do nervo tibial direito, neurorrafia término-terminal imediata e injeção da toxina botulínica no músculo gastrocnêmio esquerdo	17
Figura 7 -	Corredor utilizado para o teste da marcha e as distâncias mensuradas na pegada para o cálculo do Índice de Função Tibial	19
Figura 8 -	Eletrodo de estímulo no nervo ciático e de captação no compartimento do nervo tibial, representado pelo músculo grastrocnêmio	21
Figura 9 -	Pesagem do músculo gastrocnêmio	24
Figura 10 -	Coleta e análise do nervo tibial	27
Figura 11 -	Grupo C: fotomicrografia de segmento do nervo tibial normal, em sua porção média, com doze semanas de pós-operatório	48
Figura 12 -	Grupo S: fotomicrografia de segmento distal a secção do nervo tibial sem neurorrafia, com doze semanas de pós- operatório	49
Figura 13 -	Grupo N: fotomicrografia de segmento do nervo tibial distal a sutura término-terminal, com doze semanas de pós-operatório	49
Figura 14 -	Grupo E: fotomicrografia de segmento do nervo tibial distal a sutura término-terminal, com doze semanas de pós-operatório	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Mediana dos pesos corporais de cada grupo no pré- operatório e na 12ª semana	31
Gráfico 2 -	Mediana dos índices de função tibial (IFT) de cada grupo	33
Gráfico 3 -	Boxplot da amplitude na 12ª semana	39
Gráfico 4 -	Boxplot da latência na 12ª semana	41
Gráfico 5 -	Boxplot do peso do músculo gastrocnêmio direito e esquerdo na 12ª semana	45
Gráfico 6 -	Boxplot da densidade axonal na 12ª semana	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Mediana e intervalo interquartil dos pesos corporais de cada grupo nos diferentes momentos de avaliação	32
Tabela 2 -	Comparação par a par dos pesos corporais entre os grupos no momento pré-operatório	32
Tabela 3 -	Mediana e intervalo interquartil dos índices de função tibial (IFT) de cada grupo nos diferentes momentos de avaliação	34
Tabela 4 -	Comparação par a par entre os momentos de observação para o índice de função tibial (IFT) de cada grupo	35
Tabela 5 -	Comparação par a par entre os grupos para o índice de função tibial (IFT) em cada momento de observação	36
Tabela 6 -	Mediana e intervalo interquartil das amplitudes (mV) de cada grupo na 12ª semana	37
Tabela 7 -	Comparação par a par das amplitudes entre os grupos	38
Tabela 8 -	Mediana e intervalo interquartil das latências (ms) de cada grupo na 12ª semana	40
Tabela 9 -	Comparação par a par das latências entre os grupos	40
Tabela 10 ·	- Mediana e intervalo interquartil dos pesos musculares (g) de cada grupo na 12ª semana	42
Tabela 11 ·	- Comparação par a par dos pesos dos músculos gastrocnêmios entre os grupos	43
Tabela 12 ·	- Mediana e intervalo interquartil dos pesos dos músculos gastrocnêmios que receberam a toxina botulínica, e comparação entre os grupos	43
Tabela 13 ·	- Mediana e intervalo interquartil das densidades axonais (axônios/10.711 μm²) de cada grupo na 12ª semana	46
Tabela 14 ·	- Comparação par a par das densidades axonais entre os grupos	46

RESUMO

Lima W. Recuperação funcional após aplicação de toxina abobotulínica A no músculo gastrocnêmio contralateral ao reparo do nervo tibial em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Existe evidência de que o uso da toxina botulínica no lado não paralisado de pacientes com paralisia facial tem efeitos positivos na recuperação funcional do lado paralisado. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da toxina botulínica no músculo gastrocnêmio contralateral ao lado submetido à lesão e reparo do nervo tibial em ratos. Um total de 50 ratos foi dividido em 5 grupos: C: controle; S: secção do nervo tibial, sem reparo; N, secção do nervo tibial seguida por neurorrafia término-terminal imediata; E: secção do nervo tibial, neurorrafia término-terminal imediata e injeção da toxina botulínica no músculo gastrocnêmio contralateral; TXB: injeção da toxina botulínica no músculo gastrocnêmio, sem cirurgia. Os métodos de avaliação incluíram teste da marcha, eletromiografia, pesagem do músculo gastrocnêmio e análise histológica do nervo. A paralisia no grupo TXB foi transitória, sendo que a função retornou ao normal após 8 semanas. Na 12^a semana, o grupo E mostrou melhores índices de função tibial (p = 0,001) e níveis de amplitude (p = 0,002) que o grupo N, e menor atrofia muscular no lado injetado com a toxina botulínica que o grupo TXB (p = 0,001). Na 12^a semana, o grupo TXB apresentou menores valores de latência que os demais ($p \le 0,002$). A paralisia transitória do músculo gastrocnêmio contralateral pela toxina botulínica melhorou a recuperação funcional em ratos submetidos à lesão e reparo do nervo tibial.

Descritores: Toxina botulínica; Teste da marcha; Ratos; Experimental; Neurorrafia; Regeneração nervosa; Músculo gastrocnêmio; Eletromiografia; Paralisia facial.

ABSTRACT

Lima W. Functional recovery after abobotulinum toxin A injection in the gastrocnemius muscle contralateral to the tibial nerve repair in rats [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

There is evidence that botulinum toxin applied to the healthy side of patients with facial paralysis positively affects functional recovery of the paralyzed side. The purpose of this study was to evaluate the effects of botulinum toxin injection in the gastrocnemius muscle contralateral to the side of tibial nerve lesion and repair in rats. Fifty rats were allocated into five groups: C: control; S: tibial nerve section, no repair; N: tibial nerve section followed by immediate end-to-end neurorrhaphy; E: tibial nerve section, immediate end-to-end neurorrhaphy and botulinum toxin injected into the contralateral gastrocnemius muscle; TXB: no surgery, botulinum toxin injected into the contralateral gastrocnemius muscle. Assessment tools included a walking track, electromyography, gastrocnemius muscle weight measurement, and histological analysis of the nerve. Paralysis in group TXB was transient, with function returning to normal at 8 weeks. At week 12, group E showed higher tibial functional indexes (p = 0.001) and amplitude levels (p = 0.002) than group N, and lower muscle atrophy on the side injected with botulinum toxin than group TXB (p = 0.001). At 12 weeks, group TXB had lower latency levels than the other groups ($p \le 0.002$). Transient paralysis of the contralateral gastrocnemius muscle due to botulinum toxin improved functional recovery in rats that underwent section and repair of the tibial nerve.

Descriptors: Botulinum toxin; Walking track; Rats; Experimental; Nerve repair; Nerve regeneration; Gastrocnemius muscle; Electromyography; Facial paralysis.

1 INTRODUÇÃO

A expressão emocional espontânea, independentemente de palavras, nos conecta uns com os outros. O responsável pela condução dos estímulos até os músculos que dão movimento à face é o nervo facial, o único nervo craniano capaz de provocar na expressão movimentos desencadeados pela emoção (Faria *et al.*, 2010; Alam, 2016).

A paralisia facial afeta aspectos estéticos, funcionais e psicológicos do indivíduo acometido (Salles *et al.*, 2015). Essa condição, geralmente unilateral, causa assimetria da face com diversos graus de gravidade (Ferreira, 2002). Flacidez, depressão do ângulo da boca, ausência de rugas frontais e lagoftalmia destacam-se entre os principais achados no lado paralisado. No lado não paralisado, as manifestações são decorrentes da fraca oposição dos músculos contralaterais paralisados, provocando desvio do nariz e da boca para o lado não acometido (Salles *et al.*, 2009). Ainda é possível observar o comprometimento de funções naturais como mastigar, engolir e fechar os olhos, o que pode levar a alterações de comportamento e até ser causa de estresse emocional, que reverbera no meio social, piorando a qualidade de vida (Salles e Ferreira, 2012).

A paralisia do nervo facial pode significar a perda da habilidade de transmitir uma ou todas as seis expressões faciais humanas fundamentais: raiva, surpresa, sofrimento, aversão, medo e alegria. O prejuízo na capacidade de ser compreendido, associado ao déficit funcional e estético, impacta negativamente o bem-estar emocional, o comportamento e a satisfação geral com a vida do indivíduo acometido. Obter resultados satisfatórios mediante terapêutica significa oferecer benefícios à qualidade de vida do paciente (Salles, 2006).

Eis o desafio do cirurgião plástico: restaurar a normalidade da face deformada (Ferreira, 2002). Os melhores resultados são tipicamente observados quando a função do nervo facial é restabelecida. As opções de tratamento cirúrgico para reanimação da face incluem enxertos de nervo, transplantes musculares microcirúrgicos, transposição do músculo temporal e substituição do nervo facial pelo nervo massetérico (Ferreira e Marques De Faria, 2002; Faria *et al.*, 2007). Entretanto, mesmo com o uso de modernas técnicas microcirúrgicas, o reparo funcional do nervo facial ou de qualquer outro nervo periférico é frequentemente insuficiente. A recuperação do tônus muscular em repouso, movimentos voluntários e expressão emocional permanecem pobres (Guntinas-Lichius *et al.*, 2006). Portanto, justifica-se a pesquisa continuada para o aprimoramento do tratamento dessa afecção.

Em 1987, Clark usou pela primeira vez a aplicação da toxina botulínica tipo A no músculo contralateral da face para corrigir a assimetria secundária à lesão traumática do ramo frontal do nervo facial durante uma ritidoplastia (Clark e Berris, 1989). A toxina botulínica tipo A bloqueia a liberação da acetilcolina nas terminações nervosas, causando paralisia muscular reversível, aparentemente sem causar dano a longo prazo para o músculo ou nervo e sem apresentar efeitos colaterais sistêmicos (Gracies e Simpson, 2000; Klein, 2004). Recentemente, o uso da toxina botulínica tipo A aliada às cirurgias de reanimação da face vem apresentando resultados muito promissores no tratamento de pacientes com paralisia facial, proporcionando maior equilíbrio entre as hemifaces assimétricas (Salles *et al.*, 2009).

Na Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clinicas da Universidade de São Paulo, o tratamento da paralisia facial é integrado, com o objetivo de atingir todos os aspectos da patologia. São realizadas cirurgias para reanimação facial, reabilitação miofuncional com fonoaudiólogos e aplicação da toxina botulínica no lado não paralisado (Salles et al., 2015). Em estudo com 25 pacientes tratados com toxina onabotulínica A (Botox[®], Allergan Incorporated, Irvine, California, EUA), demonstrou-se que, além de melhorar a qualidade de vida do paciente ao longo do tempo, a aplicação no lado não paralisado de pacientes previamente submetidos a tratamento cirúrgico levou à redução de 48,4 % da assimetria facial após um mês, em conseguência da diminuição do movimento exagerado do lado não paralisado e melhora nos índices de movimento no lado paralisado. Após seis meses, mesmo com o término da ação da toxina e a volta aos índices basais de movimento no lado não paralisado, observou-se redução de 16,8 % na assimetria facial em comparação ao pré-tratamento (Salles et al., 2009). Ao reproduzir esse protocolo em amostra de 55 pacientes tratados com toxina onabotulínica A (Botox[®]) ou toxina abobotulínica A (Dysport[®], Ipsen Limited, Slough, Berkshire, Reino Unido), o gradiente de assimetria diminuiu 38,5 % após o primeiro mês e 9 % após seis meses em relação ao pré-tratamento, reforçando os achados do estudo anterior (do Nascimento Remigio et al., 2015; Remigio, 2015).

Com base nessas séries clínicas, o uso da toxina botulínica no lado saudável favorece de alguma forma a reabilitação no lado paralisado. Obviamente, essa resposta é esperada apenas em pacientes que tenham paralisia facial incompleta, ou seja, aqueles que ainda não tenham sofrido atrofia definitiva dos músculos da mímica, ou que tenham sido submetidos a alguma forma de reanimação facial cirúrgica, como o transplante muscular microcirúrgico inervado. Os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão esclarecidos. O favorecimento da atividade muscular ou da regeneração nervosa no lado paralisado, plasticidade cerebral, ou esses mecanismos combinados, têm sido sugeridos como possíveis causas (Salles *et al.*, 2009; Guntinas-Lichius *et al.*, 2011; Remigio *et al.*, 2015).

No campo experimental, modelos animais são utilizados em estudos de reparo de nervo periférico por apresentarem a anatomia do nervo e a fisiologia da regeneração nervosa semelhantes às dos seres humanos (Mohanty *et al.*, 2019). Isso os torna particularmente importantes na pesquisa translacional, ao ajudar na compreensão dos mecanismos envolvidos em descobertas clínicas (Bolker, 2017; Ursu e Cederna, 2018).

Estudos em ratos evidenciaram que a paralisia muscular contralateral transitória após a aplicação da toxina facilita a regeneração funcional e morfológica após o reparo do nervo facial. Após a lesão aguda do ramo bucal do nervo facial seguida de reanimação por meio da sutura término-terminal do nervo, houve recuperação funcional significativamente maior no grupo de ratos em que se injetou toxina botulínica na musculatura contralateral. O uso da toxina no músculo contralateral aumentou o índice de

reinervação considerada correta (porcentagem de neurônios que inervam o órgão alvo pertencentes ao *pool*, ou seja, o grupo neuronal original) de 27 % para 61 % (Guntinas-Lichius *et al.*, 2011). Porém, os mecanismos responsáveis pela melhora funcional e os da reinervação não estão esclarecidos, o que justifica estudos adicionais que auxiliem na compreensão dessas observações para o desenvolvimento e aprimoramento de novas terapias.

O Laboratório de Investigação Médica de Microcirurgia Experimental e Cirurgia Plástica (LIM 04) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) tem realizado estudos experimentais dentro da linha de pesquisa sobre reparo das lesões de nervos periféricos desde a década de 70 (Ferreira, 1984; Tuma Jr., 1997; Salles Junior, 2012; Cunha, 2013; Longo *et al.*, 2016).

Em um desses trabalhos elaborou-se modelo experimental em ratos com o objetivo de analisar e comparar técnicas de reinervação muscular única e dupla do músculo gastrocnêmio (Nepomuceno, 2017). As avaliações incluíram o teste da marcha para avaliação funcional, eletromiografia intraoperatória para análise da amplitude e latência, pesagem do músculo gastrocnêmio e contagem axonal do nervo tibial (Nepomuceno *et al.*, 2016 e 2019). Esta metodologia serviu como base para o desenvolvimento desta tese, que surgiu frente aos questionamentos sobre os mecanismos envolvidos na melhora da movimentação do lado paralisado após o uso de toxina botulínica no lado são de pacientes com paralisia facial (Salles *et al.*, 2015).

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a recuperação funcional em ratos submetidos à lesão e reparo do nervo tibial após a injeção de 5 U de toxina abobotulínicia tipo A no músculo gastrocnêmio contralateral.

3 MÉTODOS

3.1 Normatizações

3.1.1 Manejo dos animais

Em todas as fases experimentais do trabalho, obedeceu-se aos princípios éticos na experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Seus artigos atendem três princípios básicos: sensibilidade, bom senso e boa ciência (Schnaider e Souza, 2003).

Foram seguidas também as determinações da lei federal nº 11.7946, de 8/10/2008, regulamentada pelo Decreto 6.8997, em 15/7/2009, que estabelece a implantação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA), os procedimentos e as responsabilidades para uso de animais de laboratório.

3.1.2 Comissão de ética

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com animais da FMUSP e obteve a aprovação do CEUA com protocolo de pesquisa de número 013/14.

3.2 Animais

3.2.1 Caracterização da amostra

Foram utilizados 50 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus, Rodentia mammalia*) da linhagem Wistar, isogênicos, com idade entre nove e dez semanas de vida, e peso corporal variando entre 282 e 406 gramas. Os animais foram obtidos no Centro de Bioterismo da FMUSP e mantidos em gaiolas coletivas, cada uma delas abrigando cinco animais.

3.2.2 Ambiente de experimentação

Os animais foram mantidos por um período de 12 semanas no Biotério Setorial do LIM 04 em caixas de polipropileno adequadas para a espécie e de dimensões padronizadas (um animal por caixa), devidamente identificadas e com troca de maravalha a cada 48 horas. Permaneceram em ambiente climatizado aproximadamente a 22° C (±2° C), com temperatura e umidade controladas, e também sob ciclos de iluminação (claro/escuro) regulados a cada 12 horas, recebendo ração específica para a espécie (Nuvilab, Nuvital[®]) e água *ad libitum* durante todo o experimento. O período de adaptação foi de cinco dias.

3.3 Caracterização dos grupos

Os 50 ratos foram separados aleatoriamente em 5 grupos de 10 animais em cada um, conforme mostra o Quadro 1.

Quadro 1 - Caracterização dos grupos experimentais

Grupo	Descrição	Intervenção
С	Controle	Cirurgia controle, sem lesão nervosa
S	Seccionado	Secção do nervo tibial direito
Ν	Neurorrafia	Secção do nervo tibial direito seguida por neurorrafia término-terminal imediata
ТХВ	Toxina botulínica	Toxina botulínica no músculo gastrocnêmio direito
Е	Estudo	Secção do nervo tibial direito, neurorrafia término-terminal imediata, e injeção da toxina botulínica no músculo gastrocnêmio esquerdo

3.4 Procedimentos

3.4.1 Preparo, dose e injeção da toxina abobotulínica A

Um frasco de 500 U da toxina abobotulínica A (Dysport[®], Ipsen Limited, Slough, Berkshire, Reino Unido) foi diluído em 4 mL de soro fisiológico, o que resultou em uma solução de 125 U/mL. Realizaram-se dois pontos de injeção transcutânea de 0,02 mL (um ponto em cada ventre do músculo gastrocnêmio), o que corresponde a 5 U de toxina abobotulínica A por rato, nos grupos TXB e E (média de 15,85 U/kg de peso corporal).

A dose foi padronizada a partir da revisão de estudos prévios que utilizaram a toxina onabotulínica A e abobotulínica A no músculo gastrocnêmio de ratos (Cichon *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2002a; Ma *et al.*,

2004; Rosales *et al.*, 2006; Velders *et al.*, 2008; Legerlotz *et al.*, 2009; Stone *et al.*, 2011b; Han *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2013; Akdeniz *et al.*, 2015).

A relação de conversão da dose de toxina onabotulínica A para toxina abobotulínica A foi de 1:2,5 (Rosales *et al.*, 2006).

3.4.2 Procedimento cirúrgico

Em todos os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico, na dose de 30 mg/kg, com agulha 25 por 5 mm (Damy *et al.*, 2010). Em seguida, foram colocados em decúbito ventral em uma mesa de madeira, com as quatro patas amarradas, e submetidos à tricotomia da pata direita e à antissepsia com solução aquosa de polivinilpirrolidona-iodo a 10 % tópica.

Por meio de uma incisão cutânea longitudinal retilínea de três cm de comprimento na face posterior da coxa direita, com lâmina número 11, desde o trocânter maior até o joelho (Figura 1), realizou-se a dissecção romba entre os músculos glúteo máximo e o bíceps femoral. Por esse acesso, foram expostos os nervos ciático, tibial, fibular, sural e o músculo gastrocnêmio (Figura 2). Esse procedimento foi realizado nos grupos C, S, N e E. Os grupos TXB e E foram submetidos à injeção transcutânea da toxina botulínica, sem visualização direta do músculo gastrocnêmio.



Figura 1 - Planejamento da incisão



Figura 2 - Exposição do nervo ciático (NC), nervo tibial (NT), nervo sural (NS), nervo fibular (NF) e músculo gastrocnêmio (MG)

O grupo C foi submetido ao procedimento cirúrgico para exposição do nervo tibial, mas sem secção (Figura 2).

O grupo S foi submetido à secção do nervo tibial direito no ponto médio entre sua origem, na bifurcação do nervo ciático, e seu destino, no músculo gastrocnêmio. Nesse grupo, o coto proximal do nervo tibial foi invertido e sepultado na musculatura adjacente com intuito de evitar reinervação pelos brotamentos dos axônios desse nervo, e o coto distal foi suturado ao bíceps femoral para facilitar sua posterior identificação e coleta para análise histológica com 12 semanas de pós-operatório (Figura 3).



Figura 3 - Grupo S: secção do nervo tibial direito

O grupo TXB foi submetido ao bloqueio químico por meio de injeção transcutânea de 2,5 U de toxina abobotulínica A em cada ventre do músculo gastrocnêmio direito (5 U por rato) (Figura 4).



Figura 4 - Grupo TXB: toxina botulínica no músculo gastrocnêmio direito

O grupo N foi submetido à secção do nervo tibial direito e ao reparo imediato por meio da neurorrafia término-terminal (Figura 5).



Figura 5 - Grupo N: secção do nervo tibial direito seguida por neurorrafia términoterminal imediata

O grupo E foi submetido à secção do nervo tibial direito, ao reparo imediato por meio de neurorrafia término-terminal e ao bloqueio químico do músculo gastrocnêmio contralateral por meio de injeção transcutânea de 2,5 U de toxina abobotulínica A em cada ventre do músculo gastrocnêmio (5 U por rato) (Figura 6).



Figura 6 - Grupo E: secção do nervo tibial direito, neurorrafia término-terminal imediata e injeção da toxina botulínica no músculo gastrocnêmio esquerdo

As neurorrafias foram realizadas com quatro pontos de nylon 10-0 (Microsuture[®]), com o auxílio de microscópio cirúrgico (DF Vasconcellos[®]).

Após a manipulação do nervo, procedeu-se ao fechamento por planos da musculatura e pele com pontos separados de nylon 4-0 (Ethicon[®]).

A analgesia pós-operatória foi realizada com buprenorfina 0,03 mg/kg, via subcutânea, de 12 em 12 horas, por cinco dias consecutivos (Damy *et al.*, 2010).

3.5 Avaliações

A dose de toxina, a recuperação funcional e a regeneração nervosa foram avaliadas por meio de: teste da marcha, eletromiografia, pesagem muscular e análise histológica do nervo.

3.5.1 Massa corporal

Os ratos foram pesados em balança analítica (Ohaus[®], modelo MB35) no pré-operatório e na 12^ª semana de pós-operatório. O intuito da pesagem foi avaliar as alterações ponderais durante o estudo.

3.5.2 Teste da marcha

Para avaliação funcional, foi utilizado o teste da marcha, também conhecido por "*walking track*", que avalia alterações de marcha em consequência da lesão neural causadora de claudicação na pata operada mediante impressão de pegadas do animal.

Tal método permite o cálculo do Índice de Função do Nervo Tibial (IFT) conforme descrito por De Medinaceli *et al.* (1982), e modificado por Bain *et al.* (1989), tomando-se como base as seguintes variáveis: comprimento da pegada (distância da extremidade do terceiro dedo até o calcâneo), largura da pegada (distância entre o primeiro e quinto dedos) e a distância entre os dedos intermediários (segundo e quarto dedos), todos considerados a partir das patas traseiras do rato. As medidas são inseridas em uma fórmula matemática que faz a comparação entre a pata normal e a pata experimental.

Os animais tiveram as patas traseiras mergulhadas em tinta nanquim preta da marca Trident[®], sendo então colocados para andar em um corredor com medidas padronizadas (8,2 por 42 cm), sobre papel branco, de modo a deixar impressas as pegadas (Figura 7).



Figura 7 - Corredor utilizado para o teste da marcha e as distâncias mensuradas na pegada para o cálculo do Índice de Função Tibial; comprimento da pegada (CP); largura da pegada (LP); e distância entre os dedos intermediários (DDI)

O teste da marcha foi realizado previamente a qualquer procedimento cirúrgico em todos os animais do estudo, para treinamento do rato e cálculo dos valores basais do IFT e posteriormente na 4ª, 8ª e 12ª semana pósoperatória. O grupo TXB foi submetido a uma avaliação adicional na 2ª semana após a aplicação da toxina botulínica. Esses dados foram usados para o cálculo do IFT de cada animal, utilizando-se a fórmula proposta por Bain *et al.* (1989), conforme fórmula a seguir.

$$IFT = -37, 2x \left[\frac{CPE-CPN}{CPN} \right] + 104, 4x \left[\frac{LPE-LPN}{LPN} \right] + 45, 6x \left[\frac{DDIE-DDIN}{DDIN} \right] - 8, 8$$

Onde[.]

IFT = índice de função do nervo tibial CPE = comprimento da pegada experimental CPN = comprimento da pegada normal LPE = largura da pegada experimental LPN = largura da pegada normal DDIE = distância entre os dedos intermediários da pegada experimental DDIN = distância entre os dedos intermediários da pegada normal

Valores obtidos pela fórmula são considerados indicativos da condição funcional do nervo tibial do rato, expressos como porcentagem de perda da função normal, sendo que zero representa a normalidade, -100 a perda total de função, e variações de 0 ± 12 estão nos desvios da normalidade para a fórmula. Valores intermediários a esses indicam déficits parciais de função.

2.5.3 Eletromiografia

O teste eletrofisiológico intraoperatório foi realizado na reexploração cirúrgica dos nervos tibiais operados, na 12^a semana de pós-operatório, imediatamente antes do sacrifício e coleta dos materiais, de acordo com a metodologia descrita por Nepomuceno *et al.* (2016).

Após a anestesia, tosquia, imobilização em decúbito ventral e antissepsia, os animais foram submetidos a uma ampla incisão no membro posterior direito, permitindo acesso ao nervo ciático até sua trifurcação nos ramos sural, fibular e tibial, e a toda a musculatura da região. Com a temperatura ambiente mantida em torno de 25º C, foi provocado um estímulo no nervo ciático e feita a leitura do potencial de ação muscular composto (PAMC) no músculo gastrocnêmio, correspondente ao compartimento do nervo tibial. Os parâmetros do PAMC analisados foram: amplitudes e latências (Figura 8).



Figura 8 - Eletrodo de estímulo no nervo ciático e de captação no compartimento do nervo tibial, representado pelo músculo grastrocnêmio

Para a obtenção do PAMC utilizou-se o eletromiógrafo portátil Neurosoft[®], modelo Neuro-MEP-Micro, conectado a um computador portátil Hewlett-Packard[®], modelo Pavilion dv5, por uma entrada Universal Serial Bus (USB) dispensando o uso de fonte externa de energia. A configuração do eletromiógrafo (filtro passa alta 10 Hz; filtro passa baixo 10k Hz; filtro notch desligado; margem de entrada do sinal de 60 mV; taxa de amostragem de 10 kHz), a visualização e a análise dos PAMCs foram realizadas com o software Neuro-MEP.NET, versão 2.4.23.0. Tanto para estímulo quanto para captação elétrica foram utilizados dois eletrodos de agulhas monopolares subdérmicas, não teflonados, medindo 12 mm de comprimento e 0,35 mm de diâmetro, da marca Spes Medica[®], dispostos em paralelo a uma distância fixa de 5 mm entre si. As pontas dos eletrodos de estímulo foram encurvadas para melhor encaixe no nervo, isoladamente, sem o lesar. Os eletrodos de captação receberam um revestimento isolante em 9 mm de extensão e assim permaneceram, com os 3 mm distais sem revestimento. Como terra (neutro) foi utilizado um eletrodo monopolar da mesma marca e revestido de modo semelhante ao dos eletrodos descritos anteriormente, porém posicionado no ponto médio entre a estimulação e a captação. Caso a impedância ultrapasse 5 Ω , os eletrodos eram recolocados e/ou substituídos.

O estímulo elétrico foi aplicado por meio de um eletrodo igual ao já descrito, porém em formato de gancho posicionado sob o nervo ciático isolado, a 10 mm proximais de sua trifurcação, tendo o anodo (+) posicionado proximalmente e o catodo (-) distalmente em relação a ele. Os estímulos elétricos utilizados foram únicos, sem promediação, com duração de 0,2 ms e intensidade inicial de 0,1 mA, aumentada gradativamente até alcançar a intensidade supramáxima de cada lado do animal.

No compartimento do nervo tibial, representado pelo músculo gastrocnêmio, a captação foi avaliada por meio da parte distal do eletrodo, inserida no ventre do músculo gastrocnêmio, em seu ponto médio entre a porção proximal e seu tendão distal, a uma distância de 15 mm da trifurcação do nervo ciático, no sentido longitudinal, paralelamente as suas
fibras e ipsilateral ao lado estimulado, com o polo captador proximal e o polo referência mais distal em relação ao estimulador. A varredura utilizada foi de 1,0 ms/divisão com uma janela total de 10 ms e ganho de 2,5 mV/divisão.

3.5.4 Peso do músculo gastrocnêmio

Após o sacrifício dos animais na 12^a semana, os músculos gastrocnêmios do lado operado (direito) e não operado (esquerdo) foram dissecados, separados de outros músculos da região e cuidadosamente liberados de suas origens e inserções, de maneira a se obter todo o corpo muscular. Após a coleta do músculo, primeiramente tomou-se o cuidado de enxugá-lo, para remoção de sangue e quaisquer outros fluidos, e em seguida ele foi pesado, sem o tendão, em balança analítica de alta precisão (Ohaus[®], modelo MB35) (Figura 9) (Salles Junior, 2012). Chegou-se à medida das massas musculares do lado operado e o não operado, o que permitiu a comparação entre os grupos em relação ao grau de trofismo muscular (Siemionow *et al.*, 2007). Calculou-se, também, a diferença percentual entre o peso do lado operado e o não operado.



Figura 9 - Pesagem do músculo gastrocnêmio

3.5.5 Análise histológica do nervo tibial

3.5.5.1 Coleta das peças

Após a realização do teste eletrofisiológico, foi coletado para análise histológica um fragmento do nervo tibial de aproximadamente 3 a 5 mm de comprimento. Foi padronizado que o segmento do nervo fosse coletado a 3 mm distal da neurorrafia término-terminal. No grupo C, controle do nervo tibial normal, foi coletado fragmento do nervo tibial no ponto médio entre sua origem, na trifurcação do nervo ciático, e seu destino, no músculo gastrocnêmio. No grupo S, controle do nervo tibial seccionado, foi coletado fragmento do nervo tibial seccionado, foi coletado fragmento do nervo tibial seccionado, foi coletado fragmento do nervo tibial seccionado.

3.5.5.2 Processamento histológico

Os segmentos de nervo tibial coletados foram fixados em solução de glutaraldeído 2 % e em solução de tetróxido de ósmio a 1 %. Após esse processo, as peças foram desidratadas, passando por múltiplos banhos com concentrações crescentes de álcool etílico (70, 80, 90, 95 % e absoluto 1, 2, 3, 4), depois por uma mistura de álcool etílico absoluto e xilol a 50 %. Finalmente, as peças foram diafanizadas com xilol 1, 2, 3 e incluídas em parafina. Após a inclusão, foi realizada a microtomia do material, obtendo-se cortes transversais com espessura de 1 micrômetro (µm), sendo corados pelo método de azul de toluidina 1 %. Foram realizados de oito a 10 cortes de um mesmo segmento de nervo, possibilitando a escolha de quatro cortes cortes histológicos foram montadas com resina plástica e identificadas somente com um número de registro, para que não se soubesse a que grupo o animal pertencia. A numeração real foi revelada apenas para a análise estatística.

3.5.5.3 Densidade axonal

As lâminas foram observadas ao microscópio óptico com aumento de 100 vezes, para escolha de quatro cortes histológicos com menos artefatos, e aumento de 400 vezes para contagem dos axônios.

Dividiram-se os cortes em quatro quadrantes, e selecionou-se aleatoriamente um campo de maior aumento por quadrante, totalizando quatro por corte e 16 por lâmina. As imagens eram então capturadas por uma câmera Dino-Eye AM422X (Dino-Lite[®]) e digitalizadas em microcomputador Pentium IV 3.2 HT, 2 GB DDR, HD 160 GB. Por meio do software Image-Pro Plus, versão 4.5 (Media Cybernetics[®]), foi possível a avaliação da densidade axonal.

Após abrir a imagem a ser analisada, aumentada 25 vezes, foi realizada a medida da área total do nervo, que variou conforme os diferentes grupos. Então, no aumento de 400 vezes foi procedida a medida da área correspondente ao campo de leitura, obtendo-se o valor de 10.711 μ m², que seria constante para todas as imagens. Os axônios mielinizados regenerados eram identificados por um mesmo observador e contados em cada um dos 16 campos selecionados por lâmina. Após essa contagem, calculou-se a densidade axonal, medida em axônios/ μ m², por meio da fórmula: número de axônios/10.711 μ m² (Figura 10) (Nepomuceno, 2017).



Figura 10 - Coleta e análise do nervo tibial. (A) Exposição do nervo tibial; (B) Local de coleta de segmento de 3 mm do nervo tibial a 3 mm distal da neurorrafia; (C) Seleção de cortes com menos artefatos; (D) Seleção de um campo de leitura, com área fixa de 10.711 μ m², por quadrante; (E) Aumento de 400 vezes para contagem axonal em cada um dos quatro campos de leitura

3.5.5.4 Arquitetura geral do nervo

Utilizou-se a coloração de azul de toluidina 1 % com o objetivo de avaliar as seguintes características: o padrão geral de organização do tecido neural dentro dos tubos, reorganização axonal em fascículos, a disposição dos fibroblastos e do tecido conjuntivo epiperineural, a presença de escape de fibras axonais para fora dos limites do epineuro e análise da reação tecidual.

3.6 Eutanásia

Após as avaliações necessárias e coletas das peças anatômicas e histológicas, os animais foram submetidos a eutanásia por meio de injeção de dose letal do anestésico pentobarbital sódico (100 mg/kg) via intraperitoneal (Leary *et al.*, 2013).

As carcaças dos animais foram acondicionadas em apropriados sacos plásticos de cor branca, opacos, identificados e transportados até as câmaras frias. Posteriormente, o descarte foi realizado pela empresa de lixo biológico contratada para esse fim pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Os materiais perfurocortantes foram descartados em recipientes próprios (Descarpak[®]) e posteriormente recolhidos pela empresa contratada.

3.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos por meio do estudo foram expressos por medianas e intervalos interquartis. Foi aplicado o teste de Kruskall-Wallis para verificar possíveis diferenças entre os grupos para as variáveis de interesse, e o teste de Friedman para identificar diferenças entre os momentos de observação de cada grupo. Para as diferenças estatisticamente significantes, foi aplicado o teste de Mann-Whitney para identificar as diferenças entre os grupos e o teste dos postos sinalizados de Wilcoxon para identificar em que momentos de observação ocorriam as diferenças entre eles. Todos os dados foram organizados em planilha eletrônica do Microsoft Excel[®], versão do Office 2010, para a organização dos dados, e o pacote estatístico IBM SPSS[®], versão 22.0, para a obtenção dos resultados. Valores de p < 0.05 indicaram significância estatística.

RESULTADOS

Houve óbito de apenas um rato durante o estudo, no grupo E, na quarta semana de pós-operatório, sem repercussão na análise estatística. O restante dos animais se manteve saudável, e foi possível realizar todas as aferições que o estudo se propôs a fazer.

4.1 Massa Corporal

As medianas dos pesos dos animais nos momentos do pré-operatório e na 12ª semana do pós-operatório são apresentadas no Gráfico 1.





Na Tabela 1 são apresentadas as medianas e os intervalos interquartis dos pesos corporais dos cincos grupos no início e fim do estudo. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com o intuito de verificar diferenças entre os grupos em cada momento.

	Pré-operatório		12ª semana	
Grupos	Mediana	Intervalo interquartil	Mediana	Intervalo interquartil
С	346	(316 - 367)	513	(483 - 560)
S	368	(330,5 - 381)	527	(505 - 530)
Ν	350	(340,5 - 364,5)	507	(498 - 559,5)
ТХВ	318	(316,5 - 319,75)	512	(505 - 530,5)
E	318	(307 - 318,75)	545	(528 - 556)
p		0,007		0,550

Tabela 1 - Mediana e intervalo interquartil dos pesos corporais de cadagrupo nos diferentes momentos de avaliação

Em vermelho, valores significantes

Como houve diferença significante no pré-operatório, foi aplicado o teste de Mann-Whitney para identificar quais grupos apresentavam diferenças entre si, quando comparados par a par, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação par a par dos pesos corporais entre os grupos no momento pré-operatório

Par de grupos	p	
C x TXB	0,173	
CxS	0,289	
C x N	0,472	
CxE	0,045	
TXB x S	0,057	
TXB x N	0,008	
TXB x E	0,464	
S x N	0,545	
SxE	0,017	
N×E	0,001	

Em vermelho, valores significantes

O peso do grupo E foi semelhante ao do grupo TXB e diferente em relação aos pesos dos demais grupos. O grupo TXB foi menor que o grupo N e semelhante aos demais grupos no pré-operatório.

Não se observou diferença significante na comparação entre os grupos em relação ao peso dos animais na 12^ª semana do pós-operatório.

4.2 Teste da Marcha

O índice de função do nervo tibial foi medido em todos os animais, no pré-operatório e na 4^a, 8^a e 12^a semana após os procedimentos. Além desses momentos de observação, o grupo TXB foi submetido a uma avaliação adicional 2 semanas após a aplicação da toxina botulínica.

O Gráfico 2 ilustra os resultados das medianas do índice de função tibial obtidos em cada grupo, nos diferentes momentos de avaliação.



Gráfico 2 - Mediana dos índices de função tibial (IFT) de cada grupo

Na Tabela 3 são apresentadas as medianas e os intervalos interquartis dos IFTs de cada grupo nos diferentes momentos de avaliação, expressos como porcentagem de perda da função normal. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com o intuito de verificar diferenças entre os grupos em cada momento de observação, e o teste de Friedman para verificar as diferenças apresentadas por cada grupo nesses momentos.

Tabela 3 - Mediana e intervalo interquartil dos índices de função tibial(IFT) de cada grupo nos diferentes momentos de avaliação

	D <i>i i i i i</i>	43	03	403	
Grupos	Pre-operatorio	4° semana	8° semana	12° semana	*a
	Mediana (IQ)	Mediana (IQ)	Mediana (IQ)	Mediana (IQ)	1 -
С	- 6,90 (11,29)	- 7,74 (4,42)	- 8,28 (2,89)	- 4,55 (8,14)	0,521
S	- 4,54 (6,29)	- 57,02 (24,75)	- 65,68 (13,82)	- 68,47 (17,66)	0,001
Ν	- 12,84 (13,09)	- 38,75 (17,64)	- 42,59 (13,09)	- 41,67 (27,44)	< 0,001
TXB ^a	- 13,97 (18,07)	- 51,30 (14,40)	- 9,62 (22,90)	- 11,64 (21,45)	< 0,001
Е	- 12,06 (10,20)	- 14,08 (36,70)	- 13,22 (23,71)	- 5,37 (20,97)	0,339
p	0,064	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

IQ = intervalo interquartil

p: comparação entre os grupos em cada momento de observação

*p**: comparação entre os momentos de observação para cada grupo ^a Medição adicional do IFT na 2^a semana desse grupo: - 75,72 (14,49)

Em vermelho, valores significantes

Três grupos apresentaram diferença significante na comparação entre os momentos de observação. Nestes grupos, foi aplicado o teste dos postos sinalizados de Wilcoxon para identificar em que momentos de observação se deu a diferenciação entre um e outro, quando comparados par a par, conforme mostra a Tabela 4.

Par da Variávaia		Grupos	
	S	TXB	Ν
IFT 2ª semana x IFT Pré-operatório	-	0,005	-
IFT 4ª semana x IFT Pré-operatório	0,008	0,005	0,005
IFT 8ª semana x IFT Pré-operatório	0,005	0,646	0,005
IFT 12ª semana x IFT Pré-operatório	0,005	0,575	0,005
IFT 4ª semana x IFT 2ª semana	-	0,005	-
IFT 8ª semana x IFT 2ª semana	-	0,005	-
IFT 12ª semana x IFT 2ª semana	-	0,005	-
IFT 8ª semana x IFT 4ª semana	0,110	0,005	0,093
IFT 12ª semana x IFT 4ª semana	0,086	0,005	0,333
IFT 12ª semana x IFT 8ª semana	0,799	0,646	0,139

Tabela 4 - Comparação par a par entre os momentos de observação para o índice de função tibial (IFT) de cada grupo

Em vermelho, valores significantes

No grupo C, o IFT não apresentou diferença entre os momentos ao longo das 12 semanas.

O grupo S apresentou redução significativa do IFT na 4^a, 8^a e 12^a semanas em relação ao pré-operatório, e não houve diferença na comparação desses momentos entre si.

No grupo N, houve redução significativa na 4ª, 8ª, e 12ª semana em relação ao pré-operatório, e não houve diferença na comparação desses momentos entre si.

No grupo TXB, houve redução significativa do IFT na 2ª semana após a injeção da toxina. Na 4ª semana, observou-se aumento significante em relação à 2ª semana. Após 8 semanas, o IFT apresentou valor semelhante ao encontrado antes da aplicação da toxina e ao observado na 12ª semana.

O grupo E não mostrou diferença entre os momentos de observação.

No pré-operatório, não houve diferença entre os grupos em relação ao IFT. Os demais momentos de observação apresentaram diferença significante na comparação entre os grupos. Assim, foi aplicado o teste de Mann-Whitney para identificar que grupos apresentaram diferença entre si em cada momento de avaliação, guando comparados par a par, conforme a Tabela 5.

Dor do Crupos		Variável	
Par de Grupos	4ª semana	8ª semana	12 ^ª semana
C x TXB	< 0,001	0,545	0,226
CxS	< 0,001	< 0,001	< 0,001
C x N	< 0,001	< 0,001	< 0,001
CxE	0,364	0,450	0,880
TXB x S	0,821	< 0,001	< 0,001
TXB x N	0,082	0,001	0,005
TXB x E	0,005	0,762	0,151
SxN	0,131	0,003	0,001
SxE	0,005	< 0,001	< 0,001
NxE	0,019	< 0,001	0,001

Tabela 5 - Comparação par a par entre os grupos para o índice de função tibial (IFT) em cada momento de observação

Em vermelho, valores significantes

Nos grupos S e N, observou-se redução significativa em todos os momentos de avaliação quando comparados ao grupo C. O grupo N e S foram semelhantes na 4^a semana. Porém, o grupo N apresentou IFT maior que o grupo S na 8^a e 12^a semanas.

Na 4^a semana, o grupo TXB apresentou valores significativamente menores em relação ao grupo C, mostrando-se semelhante aos grupos S e N. A partir da 8^a semana, o grupo TXB apresentou valores semelhantes aos do grupo C, e significativamente maiores que os dos grupos S e N.

O grupo E mostrou-se semelhante ao grupo C em todos os momentos de avaliação, apresentando valores significativamente maiores quando comparados aos dos grupos S e N após 4, 8 e 12 semanas.

4.3 Eletromiografia

4.3.1 Amplitude

Na Tabela 6 são apresentadas as medianas e os intervalos interquartis das amplitudes dos cinco grupos. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para fazer a comparação entre os grupos.

•				
Cruno	1	12 ^ª semana		
Grupo	Mediana	Intervalo interquartil	ρ	
С	12,40	(8,16 - 15,07)		
S	0,07	(0,03 - 0,08)		
Ν	7,18	(5,26 - 8,10)	< 0,001	
ТХВ	9,86	(7,30 - 13,25)		
E	12,50	(10,45 - 17,92)		

Tabela 6 - Mediana e intervalo interquartil das amplitudes (mV) de cada grupo na 12ª semana

Em vermelho, valores significantes

Por ter-se encontrado diferença significante, foi aplicado o teste de Mann-Whitney para identificar quais grupos apresentaram diferenças entre si, quando comparados par a par, conforme a Tabela 7.

Par de grupos	p
C x TXB	0,571
CxS	< 0,001
C x N	0,060
CxE	0,427
TXB x S	< 0,001
TXB x N	0,130
TXB x E	0,096
S x N	< 0,001
SxE	< 0,001
NxE	0,002

 Tabela 7 - Comparação par a par das amplitudes entre os grupos

Em vermelho, valores significantes

Os grupos TXB, N e E, mostraram-se semelhantes ao grupo C. A amplitude no grupo S foi significativamente menor que nos outros grupos. Os níveis de amplitude no grupo E foram significativamente maiores que os do grupo N.

O Gráfico 3 ilustra a análise estatística dos resultados da amplitude dos grupos.



Gráfico 3 - Boxplot da amplitude na 12ª semana

† Significativamente menor que nos outros grupos †† Significativamente maior que no grupo N

4.3.2 Latência

Na Tabela 8 são apresentadas as medianas e os intervalos interquartis das latências dos cinco grupos. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com o intuito de verificar diferenças entre os grupos.

Crupo	1		
Grupo	Mediana	Intervalo interquartil	ρ
С	1,48	(1,25 – 1,81)	
S	7,80	(7,78 – 7,91)	
Ν	1,48	(1,38 – 1,75)	< 0,001
ТХВ	1,11	(1,05 – 1,18)	
E	1,48	(1,44 – 1,55)	

Tabela 8 - Mediana e intervalo interquartil das latências (ms) de cadagrupo na 12ª semana

Em vermelho, valores significantes

Como se encontrou diferença significante, foi aplicado o teste de Mann-Whitney para identificar quais grupos apresentaram diferenças entre si, quando comparados par a par, conforme a Tabela 9.

Par de grupos	р
C x TXB	0,002
CxS	0,007
C x N	0,460
CxE	0,940
TXB x S	0,002
TXB x N	0,001
TXB x E	< 0,001
S x N	0,005
SxE	0,004
NxE	0,704

Tabela 9 - Comparação par a par das latências entre os grupos

Em vermelho, valores significantes

Não houve diferença entre C, N e E. Os resultados do grupo S foram significativamente maiores que os dos grupos restantes. Os níveis de latência foram significativamente menores no grupo TXB do que nos outros grupos.

O Gráfico 4 ilustra a análise estatística dos resultados da latência dos grupos.



Gráfico 4 - Boxplot da latência na 12ª semana

† Significativamente menor que nos outros grupos

†† Significativamente maior que nos outros grupos

4.4 Peso do Músculo Gastrocnêmio

Na Tabela 10 são apresentadas as medianas e os intervalos interquartis dos pesos dos músculos gastrocnêmios direito e esquerdo dos cinco grupos. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com o intuito de verificar diferenças entre os grupos.

Crunaa		Direito		Esquerdo
Grupos	Mediana	Intervalo interquartil	Mediana	Intervalo interquartil
С	3,14	(2,90 - 3,28)	3,04	(2,85 - 3,21)
S	0,49	(0,46 - 0,52)	3,05	(2,98 - 3,12)
Ν	2,18 ^b	(2,01 - 2,31)	3,01	(2,75 - 3,23)
ТХВ	1,89ª	(1,67 - 1,95)	2,97	(2,84 - 3,07)
E	2,38 ^b	(2,07 - 2,57)	2,68ª	(2,44 - 2,71)
p		< 0,001		< 0,001

Tabela 10 - Mediana e intervalo interquartil dos pesos musculares (g)de cada grupo na 12ª semana

Em vermelho, valores significantes

a Pata que recebeu a toxina botulínica

b Pata submetida à neurorrafia

Como foi encontrada diferença significante, foi aplicado o teste de Mann-Whitney para identificar quais grupos apresentavam diferenças entre si, quando comparados par a par, conforme a Tabela 11. Realizou-se, também, uma comparação adicional entre os grupos TXB e E, em relação ao peso do músculo gastrocnêmio que recebeu a toxina botulínica (Tabela 12).

Tabela 11 - Comparação par a par dos pesos dos músculos gastrocnêmios entre os grupos

Par de grupes	F)
Par de grupos	Direito	Esquerdo
C x TXB	< 0,001	0,821
CxS	< 0,001	0,970
C x N	< 0,001	0,880
CxE	< 0,001	0,006
TXB x S	< 0,001	0,449
TXB x N	0,023	0,940
TXB x E	0,041	0,002
SxN	< 0,001	0,544
SxE	< 0,001	0,001
NxE	0,596	0,019

Em vermelho, valores significantes

Tabela 12 - Mediana e intervalo interquartil dos pesos dos músculos
gastrocnêmios que receberam a toxina botulínica, e
comparação entre os grupos

Pata esquerda do grupo E	Pata direita do grupo TXB	E x TXB (p)
2,68 (2,44 - 2,71)	1,89 (1,67 - 1,95)	0,001

Em vermelho, valor significante

O peso do músculo gastrocnêmio foi menor em todas as patas experimentais, ou seja, pata direita nos grupos S, N, E e TXB, e pata esquerda do grupo E, quando comparadas com o grupo C. O grupo S apresentou peso do músculo gastrocnêmio direito menor que todos os outros grupos.

No grupo N, o peso do músculo gastrocnêmio direito foi maior que nos grupos S e TXB, e semelhante ao grupo E.

O peso do músculo gastrocnêmio direito no grupo TXB foi maior que no grupo S e menor em relação aos demais grupos.

No grupo E, o peso do músculo gastrocnêmio direito foi semelhante ao grupo N, e maior que do que nos grupos S e TXB.

A diferença entre o peso do músculo gastrocnêmio esquerdo e direito foi de 3 % no grupo C, 84 % no grupo S, 28 % no grupo N, 11 % no grupo E, e 37 % no grupo TXB.

O peso do músculo gastrocnêmio na pata submetida à neurorrafia foi semelhante nos grupos N e E.

O peso do músculo gastrocnêmio na pata injetada com toxina botulínica foi maior no grupo E do que no grupo TXB. Essa diferença foi de 30 %.

O Gráfico 5 ilustra a análise estatística dos resultados do peso do músculo gastrocnêmio.

Gráfico 5 - Boxplot do peso do músculo gastrocnêmio direito e esquerdo na 12ª semana



^a Lesão e reparo do nervo tibial

^b Injeção de toxina botulínica
 † Significativamente menor que o grupo C

†† Diferença significante

4.5 Avaliação Histológica do Nervo Tibial

4.5.1 Densidade axonal

A densidade de axônios no nervo tibial foi verificada nos diferentes grupos, exceto no grupo TXB, após eutanásia dos ratos.

A Tabela 13 representa as medianas e intervalos interquartis das densidades axonais. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com o intuito de verificar diferenças entre os grupos.

Tabela 13 - Mediana e intervalo interquartil das densidades axonais (axônios/10.711 μm²) de cada grupo na 12^a semana

Grupos	Mediana	Intervalo interquartil	р
С	123,25	(116,44 - 126,87)	< 0.001
S	3,97	(1,96 - 15,55)	
Ν	138,45	(127,68 - 152,53)	< 0,001
Е	153,4	(148,97 - 157,82)	

Em vermelho, valores significantes

Como foi encontrada diferença significante, aplicou-se o teste de Mann-Whitney para identificar que grupos se diferenciaram entre si, quando comparados par a par, conforme a Tabela 14.

Tabela 14 - Comparação par a par das densidades axonais entre os grupos

Par de grupos	р
C x S	< 0,001
C x N	0,013
СхЕ	< 0,001
N x E	0,095
S x N	< 0,001
S x E	< 0,001

Em vermelho, valores significantes

A comparação da densidade axonal entre os grupos N e E não mostrou diferença, e os valores em ambos os grupos foram significativamente maiores do que nos grupos C e S. O grupo S foi o menor entre todos os outros grupos.

O Gráfico 6 ilustra a análise estatística dos resultados da densidade axonal.



Gráfico 6 - Boxplot da densidade axonal na 12ª semana

† Significativamente maior que no grupo C

++ Significativamente menor que nos outros grupos

4.5.2 Avaliação histológica qualitativa

O grupo S apresentou formação de tecido conjuntivo exuberante. O diâmetro e a distribuição dos axônios no estroma foram mais homogêneos no grupo C do que nos grupos N e E, que apresentaram escape de fibras nervosas e grande quantidade de axônios remielinizados e distribuição relativamente homogênea (Figuras 11, 12, 13 e 14).



Figura 11 - Grupo C: fotomicrografia de segmento do nervo tibial normal, em sua porção média, com doze semanas de pós-operatório. Coloração Azul de Toluidina. A) Aumento de 25 vezes. Nervo contendo um único fascículo delimitado por epineuro e perineuro, contendo grande quantidade de axônios mielinizados em seu interior. B) Aumento de 200 vezes. Detalhe do nervo com epineuro e perineuro íntegros, e grande quantidade de axônios mielinizados com diâmetros similares e distribuição homogênea. C) Aumento de 400 vezes



Figura 12 - Grupo S: fotomicrografia de segmento distal a secção do nervo tibial sem neurorrafia, com doze semanas de pós-operatório. Coloração Azul de Toluidina. A) Aumento de 25 vezes. Nervo com estrutura distorcida, contendo um único fascículo delimitado por epineuro e perineuro, e contendo grande quantidade de tecido conectivo em seu interior. B) Aumento de 200 vezes. Detalhe do interior do nervo contendo grande quantidade de tecido conectivo e pouco estroma neural. C) Aumento de 400 vezes



Figura 13 - Grupo N: fotomicrografia de segmento do nervo tibial distal a sutura término-terminal, com doze semanas de pós-operatório. Coloração Azul de Toluidina. A) Aumento de 25 vezes. Nervo monofasciculado delimitado por epineuro e perineuro. Nota-se perineuro espessado, pouco escape axonal, e axônios remielinizados no interior do nervo. B) Aumento de 200 vezes. Detalhe mostrando o escape axonal no perineuro, pouca reação tecidual, e axônios remielinizados no interior do nervo. C) Aumento de 400 vezes. Detalhe do interior do nervo mostrando grande quantidade de axônios remielinizados com diâmetros diferentes e distribuição relativamente homogênea



Figura 14 - Grupo E: fotomicrografia de segmento do nervo tibial distal a sutura término-terminal, com doze semanas de pós-operatório. Coloração Azul de Toluidina. A) Aumento de 25 vezes. Nervo trifasciculado delimitado por epineuro e perineuro. Nota-se perineuro espessado, pouco escape axonal, e axônios remielinizados no interior do nervo. B) Aumento de 200 vezes. Detalhe mostrando o escape axonal no perineuro, pouca reação tecidual, e axônios remielinizados no interior do nervo. C) Aumento de 400 vezes. Detalhe do interior do nervo mostrando grande quantidade de axônios remielinizados com diâmetros diferentes e distribuição relativamente homogênea

5 DISCUSSÃO

Os resultados clínicos observados com a utilização da toxina botulínica tipo A sugeriram desde seu início a possibilidade da aplicação de seu uso para reduzir a assimetria entre as hemifaces de pacientes com paralisia facial. A toxina botulínica é um tratamento farmacológico local para a hiperatividade muscular que corrige desequilíbrios entre músculos agonistas hipoativos e antagonistas relativamente hiperativos. Dessa forma, a injeção de toxina botulínica A no lado não paralisado pode melhorar temporariamente a simetria facial e, consequentemente, a qualidade de vida (Salles, 2006). Estudos clínicos mostraram que a melhora na simetria se deve não apenas à redução temporária do movimento muscular pela ação da toxina no lado não paralisado mas também à melhora funcional persistente, mesmo após o término da ação da droga, do lado paralisado (Salles *et al.*, 2009; Monini *et al.*, 2011; Azuma *et al.*, 2012; Salles e Ferreira, 2012; Choi *et al.*, 2015; Cooper *et al.*, 2017).

Foi com base nesse cenário clínico que o presente estudo foi desenhado. Propôs-se estudar os efeitos da toxina abobotulínica tipo A injetada em ratos no músculo gastrocnêmio do lado sem lesão nervosa (não paralisado) na regeneração nervosa e recuperação funcional do lado submetido à lesão e reparo do nervo tibial (lado paralisado).

Em centros de pesquisa sobre nervo periférico, é comum o uso de ratos como modelo experimental devido a sua estrutura anatômica favorável, reduzido tamanho, baixo custo, facilidade de obtenção, manipulação e manutenção (Toia *et al.*, 2015; Gordon e Borschel, 2017). Nos experimentos com modelos animais, cuja variabilidade é muito pequena, a amostra de aproximadamente oito animais por grupo geralmente apresenta significância estatística e atende os ideais da bioética (Puopolo, 2004). Estudos com ratos da linhagem Wistar, separados em grupos com oito a dez animais cada, mostraram resultados com distribuição simétrica, próximos à média e com pouca variação do desvio-padrão, comprovando significância estatística (Scheibe, 2008). Assim, neste estudo, foram utilizados 50 ratos, distribuídos por randomização em cinco grupos com 10 animais cada (Nepomuceno, 2017).

No delineamento do experimento, o grupo em estudo (grupo E), caracterizado pela secção e reparo do nervo tibial associado à injeção da toxina abobotulínica A no músculo gastrocnêmio contralateral, foi comparado a 4 grupos de controle. No primeiro grupo de controle, não foi realizada secção do nervo (grupo C). No segundo grupo de controle, realizou-se apenas a secção do nervo tíbial, sem reparo (grupo S). O grupo de controle da neurorrafia (grupo N) foi submetido à secção e reparo do nervo tibial. O grupo de controle da toxina botulínica (grupo TXB) foi criado para avaliar a efetividade da dose de toxina abobotulínica A utilizada, e nele não foi realizada a secção do nervo. Assim, todas as possíveis variáveis de cada procedimento puderam ser comparadas entre si e isoladamente.

A secção do nervo tibial em ratos é modelo comumente empregado e bem validado para indução de atrofia muscular esquelética e avaliação funcional. Os músculos gastrocnêmio e sóleo, ambos denervados nesse modelo, podem ser usados para análise histológica e morfométrica. Em oposição ao modelo de transecção do nervo ciático, a transecção do nervo tibial induz a menor morbidade do animal, o que o torna mais atrativo. A transecção do nervo ciático denerva todos os músculos da perna e do pé, enquanto a transecção do nervo tibial mantém os ramos fibular e sural do ciático intactos (De Medinaceli *et al.*, 1982; Bain *et al.*, 1989; Hare *et al.*, 1993; Batt e Bain, 2013).

Embora diversos modelos de paralisia facial em ratos já tenham sido documentados na literatura (Semba e Egger, 1986; Guntinas-Lichius *et al.*, 2000), a limitada expressão dos músculos faciais desses animais contrasta com as complexas respostas emocionais da face humana, o que os distância do modelo ideal. Isso torna difícil o estabelecimento de escalas visuais de recuperação de mobilidade. Nos ratos, as escalas se baseiam no movimento das vibrissas, fechamento ocular e reflexo de piscamento (Borin *et al.*, 2006). Além disso, existem diferenças estruturais importantes entre o nervo facial de ratos e o de seres humanos. Nos ratos, o tronco principal do nervo é monofascicular, e o padrão de inervação é mais difuso, a partir de seus ramos, do que em seres humanos. A divisão do nervo em fascículos pelo perineuro só ocorre após o início das ramificações macroscópicas. Nos seres humanos, o nervo facial extratemporal é dividido em fascículos pelo perineuro. Portanto, os estudos sobre regeneração do nervo facial de ratos podem não simular adequadamente a condição clínica humana (Mattox e Felix, 1987).

Encontrou-se na literatura apenas um estudo experimental que relatou melhora da regeneração nervosa do ramo bucal do nervo facial seccionado e da recuperação funcional após a aplicação da toxina abobotulínica A na hemiface contralateral, sem lesão, de ratos (Guntinas-Lichius *et al.*, 2011). Não há referências ao uso da toxina abobotulínica A no músculo gastrocnêmio contralateral ao lado submetido à lesão e reparo do nervo tibial em ratos como no presente trabalho.

Adicionalmente, o nervo ciático do rato já foi utilizado com sucesso como modelo experimental para estudo de lesão do nervo facial (Hadlock *et al.*, 2005). Taxas de recuperação semelhantes foram observadas no nervo ciático e facial do rato após lesão por esmagamento (taxa de recuperação do nervo ciático: 2,26 mm/dia; taxa de recuperação do nervo facial 1,5-2,4 mm/dia) (Wachter *et al.*, 2002).

Para a avaliação funcional, por meio do teste da marcha, as características das pegadas podem ser confiavelmente medidas para se determinar a disfunção neuromuscular, visto que elas refletem a função dos grupos musculares. Este teste tem sido utilizado para descrever o déficit funcional da pata traseira do rato em estudos experimentais desde a década de 1980. Mediante a análise de regressão, é possível inferir a função do nervo ciático e de seus ramos separadamente. A função do músculo gastrocnêmio, por exemplo, pode ser representada pelo IFT, que foi escolhido para o presente estudo (Bain *et al.*, 1989; Batt e Bain, 2013).

O grupo C, sem lesão do nervo tibial, não mostrou diferença no IFT ao longo das 12 semanas. Aparentemente, a cirurgia para exposição do nervo não teve influência na marcha deste grupo nos momentos observados. Os grupos S (secção do nervo tibial, sem reparo) e N (secção e reparo do nervo tibial) apresentaram redução do IFT ao longo do experimento, sem recuperação completa. Coerentemente, os valores no grupo N foram maiores do que no grupo S, o que indica efeito positivo, ainda que parcial, do reparo do nervo tibial sobre a função da marcha. O reparo primário por meio de neurorrafia término-terminal é o tratamento de escolha para secção do nervo periférico (Fagotti De Almeida *et al.*, 2015).

O grupo TXB, submetido a aplicação de 5 U de toxina abobotulínica A na pata direita com o objetivo de verificar a efetividade da dose utilizada, mostrou redução significativa do IFT na 2ª semana após a aplicação da toxina quando comparado aos valores basais, o que corresponde à paralisia muscular provocada pela droga. Na 4ª semana, o IFT aumentou significativamente quando comparado ao da 2ª semana, porém ainda foi similar ao observado nos grupos com lesão nervosa, S e N, o que demonstra a eficiência da dose utilizada na paralisia do músculo gastrocnêmio. Na 8ª e 12ª semana, o IFT atingiu valores semelhantes aos observados previamente à aplicação da toxina e aos dos grupos C e E, o que indica recuperação completa da função nesses momentos de avaliação. Pode-se ressaltar que 5 U de toxina abobotulínica A correspondem aproximadamente a 2 U de toxina onabotulínica A, posto que a equivalência 1:2,5 é a que tem sido mais aceita na literatura recente (Rosales *et al.*, 2006).

Na 12^a semana, o grupo E, que foi submetido à injeção da toxina no músculo gastrocnêmio contralateral ao lado da neurorrafia, mostrou níveis de IFT significativamente maiores que o grupo N, submetido apenas à

neurorrafia. Além disso, o IFT do grupo E foi semelhante ao dos grupos C e TXB nesse período. Portanto, ao considerar que a dose de toxina abobotulínica A utilizada no estudo foi efetiva, pode-se afirmar que a paralisia transitória do músculo gastrocnêmio teve impacto positivo na recuperação funcional do lado submetido à neurorrafia. Esses resultados estão de acordo com estudos experimentais (Guntinas-Lichius *et al.*, 2011) e clínicos (Salles *et al.*, 2009; Do Nascimento Remigio *et al.*, 2015) prévios.

Na 4^a semana, o grupo E não mostrou redução do IFT como seria esperado após lesão e reparo do nervo tibial nesse ponto de observação. Entretanto, ambas as patas traseiras estavam afetadas neste momento: um lado pelo efeito da toxina botulínica e o outro lado pela lesão nervosa. Como a fórmula utilizada para calcular a perda de função compara o lado normal com o lado experimental, a presença de déficit de função bilateral justifica os resultados obtidos no teste da marcha neste grupo na 4^a semana (De Medinaceli *et al.*, 1982; Bain *et al.*, 1989).

Em todos os grupos, o platô de recuperação funcional foi alcançado na 8ª semana no teste da marcha. Esta observação está de acordo com relatos prévios (Hare *et al.*, 1992; Brenner *et al.*, 2008). Na 12ª semana, entretanto, ainda foram encontradas diferenças na amplitude, latência e peso muscular, o que justifica as avaliações a longo prazo.

Estudo recente mostrou maior regeneração nervosa e melhor recuperação motora e sensorial induzida pela aplicação da toxina botulínica diretamente no nervo logo após a lesão. Este efeito foi atribuído a possível ação da toxina em outras moléculas além da acetilcolina (Cobianchi *et al.*,

2017). No presente estudo, não incluímos um grupo no qual a toxina botulínica seria aplicada no mesmo lado da neurorrafia. Estudos prévios demonstraram que a denervação das vibrissas de ratos, pela secção do nervo infraorbital ou pela aplicação da toxina botulínica, ambas realizadas ipsilateral ao lado da neurorrafia do nervo facial, determinou resultados funcionais inferiores quando comparada com a denervação das vibrissas realizada contralateral ao lado da neurorrafia do facial (Angelov *et al.*, 1999; Guntinas-Lichius *et al.*, 2011). Por outro lado, o índice de reinervação no grupo com aplicação da toxina ipsilateral ao reparo do nervo foi maior que no grupo onde foi realizada apenas a neurorrafia (Guntinas-Lichius *et al.*, 2011).

Em outro estudo, investigou-se o efeito do pré-condicionamento com toxina botulínica sobre a regeneração nervosa. A toxina foi aplicada no músculo tríceps sural de ratos uma semana antes da lesão provocada no nervo tibial ipsilateral e se observou aumento da reinervação axonal motora (Franz *et al.*, 2018). Os autores atribuíram a melhora ao efeito estimulatório sobre o brotamento axonal induzido pela denervação química prévia e ressaltaram a possível aplicação em situações clínicas específicas como cirurgias de transferência nervosa. Há evidências de que a maior parte da toxina permanece na área injetada com mínima dispersão local e à distância (Tang-Liu *et al.*, 2003; Brodsky *et al.*, 2012; Ramirez-Castaneda *et al.*, 2013), portanto, é pouco provável que, no presente trabalho, a toxina injetada no músculo gastrocnêmio tenha exercido efeito direto na neurorrafia contralateral por propagação como nos estudos supracitados e seja a responsável pela melhora funcional observada no grupo E.
Os testes eletrofisiológicos fornecem medidas quantitativas da atividade nervosa e são frequentemente empregados para avaliação da regeneração nervosa por meio da amplitude e latência do potencial de ação muscular composto (PAMC) (Wood *et al.*, 2011). A amplitude é uma estimativa crua do número de fibras musculares que são ativadas pela estimulação nervosa e, subsequentemente, o número de fibras nervosas excitáveis à estimulação nervosa quando a transmissão neuromuscular é normal (Oh, 2002). O grupo S apresentou os menores valores de amplitude, consequência da denervação do músculo gastrocnêmio. Os grupos TXB e E foram semelhantes ao grupo de controle sem lesão nervosa (grupo C), e os níveis de amplitude no grupo E foram significativamente maiores que os do grupo N.

Ao considerar que a amplitude reflete o número de axônios funcionais regenerados que reinervam o músculo e proporciona medidas quantitativas da recuperação geral da função (Wood *et al.*, 2011), os resultados acima corroboram aqueles encontrados no teste da marcha, onde os grupos TXB e E apresentaram índices de função normal ao fim do estudo, e o grupo E foi significativamente maior que o grupo N.

O outro componente do PAMC, a latência, é a medida combinada do tempo de condução do impulso nervoso do ponto de estimulação para o axônio terminal, transmissão neuromuscular e despolarização das fibras musculares (Oh, 2002). O grupo S apresentou os maiores valores de latência, como era previsto, e os grupos C, N e E foram semelhantes.

Fato interessante, após 12 semanas, os níveis de latência foram menores no grupo TXB do que nos demais, o que contraria a lógica da ação

da toxina botulínica. A toxina botulínica inibe a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular e, consequentemente, provoca prolongamento da latência (De Paiva *et al.*, 1999). Em estudo prévio, houve prolongamento na latência e redução da amplitude no 3º mês após a aplicação de uma dose três vezes maior que a utilizada neste trabalho, também no músculo gastrocnêmio de ratos, e retorno aos níveis basais apenas 6 meses após a aplicação da toxina (Ma *et al.*, 2004).

Em outro estudo semelhante, ocorreu prolongamento da latência e normalização após 12 semanas, independentemente da dose utilizada (Stone *et al.*, 2011a). Porém, neste mesmo estudo, o grupo submetido a aplicação de 3 U/kg de toxina onabotulínica A mostrou resultados de latência menores quando comparado com a pata contralateral sem toxina, mas isso foi considerado pelos autores algo dentro da faixa normal.

Sabe-se que há efeito dose-resposta nos testes eletrofisiológicos e de avaliação motora (Cichon *et al.*, 1995; Torii *et al.*, 2010; Franz *et al.*, 2018), e seriam necessários outros estudos para comparação de diferentes doses. Além disso, no presente trabalho foram realizadas medidas apenas até o 3° mês após a injeção da toxina, e a pata contralateral não foi avaliada para melhor comparação.

Adicionalmente, é valido lembrar que as pesquisas sobre os efeitos da toxina botulínica ainda são recentes, e as consequências do seu uso ainda não foram completamente elucidadas. A paralisia muscular induzida pela ação da toxina é acompanhada por adaptações plásticas centrais e periféricas. Dentre os efeitos estão o remodelamento da junção neuromuscular, a formação de novas conexões nervosas com as fibras musculares por brotamento axonal, excitabilidade aumentada dos neurônios motores, e alterações na transmissão sináptica (De Paiva *et al.*, 1999; Rosales *et al.*, 2006; Rogozhin *et al.*, 2008; Pingel *et al.*, 2017).

Um viés do trabalho - e possível explicação para os menores valores de latência - foi o fato de o grupo TXB ter sido o único a não sofrer intervenção cirúrgica para exposição do nervo tibial. Até mesmo o grupo de controle sem lesão (grupo C) foi exposto ao dano indireto à superfície do nervo através da dissecção do leito muscular adjacente. Assim, o grupo TXB estaria menos sujeito às consequências relacionadas à fibrose e alterações cicatriciais, o que, segundo alguns autores, pode interferir no resultado dos testes eletrofisiológicos. Entretanto, são necessárias futuras investigações (Lemke *et al.*, 2017).

O peso do músculo gastrocnêmio é usado para estimar o grau de recuperação da massa muscular, ou trofismo muscular, após a atrofia causada pela denervação transitória (Wood *et al.*, 2011). No grupo TXB, apesar da recuperação funcional, houve redução de 37 % no peso do músculo injetado pela toxina em comparação com o lado normal na 12^a semana. Assim, pode-se inferir que a dose de 5 U de toxina abobotulinica A utilizada no musculo gastrocnêmio dos animais foi efetiva para atingir a paralisia transitória e a atrofia muscular prolongada no grupo TXB.

O peso do músculo gastrocnêmio na pata submetida à neurorrafia foi semelhante nos grupos N e E. Portanto, os maiores índices funcionais observados no grupo E não poderiam ser explicados pelo grau de atrofia muscular. Isso também foi observado no grupo TXB, no qual ocorreu recuperação funcional completa apesar da presença de atrofia muscular. Essa ausência de relação foi mostrada em outro estudo, no qual o déficit de função foi atribuído aos erros de direcionamento dos axônios regenerados e não à magnitude da atrofia muscular (Kobayashi *et al.*, 1997).

O peso do músculo gastrocnêmio na pata injetada com toxina botulínica foi 30 % maior no grupo E do que no grupo TXB. Esse achado sugere que a lesão nervosa contralateral protegeu o músculo contra a atrofia induzida pela toxina botulínica.

A contagem axonal é o parâmetro mais usado para avaliar o sucesso regenerativo (Wood *et al.*, 2011). A análise histológica do nervo tibial foi realizada após 12 semanas, momento em que a contagem axonal atinge seu nível máximo (Mackinnon *et al.*, 1991; Fox *et al.*, 2012). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos N e E em relação à densidade axonal, com ambos os grupos apresentando valores significativamente maiores que os encontrados no grupo C e S, que apresentou, coerentemente, os menores valores. Portanto, não houve relação entre o grau de recuperação funcional e o número de axônios no coto distal do nervo tibial.

Como se demonstrou em outros estudos, a densidade axonal apenas ilustra o vigor da regeneração através do sítio de reparo, e os erros de direcionamento axonal seriam a causa de déficit na recuperação funcional (Kobayashi *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 2006; De Ruiter *et al.*, 2008). No reparo de nervos mistos que inervam diferentes órgãos-alvo (pele e músculo), o mal direcionamento pode, por exemplo, levar axônios motores a inervar a pele e axônios sensoriais a inervar o músculo. No reparo de nervos motores que inervam diferentes músculos, o mal direcionamento pode resultar em reinervação de um músculo com função antagônica (De Ruiter *et al.*, 2014).

O nervo tibial é um nervo periférico misto, motor e sensorial, localizado na pata posterior dos roedores, sendo também um dos três ramos terminais do ciático. A transecção do nervo tibial denerva os músculos gastrocnêmio, sóleo, plantar, e três pequenos músculos flexores profundos do pé, incluindo o tibial posterior, flexor longo dos dedos e flexor longo do hálux (Batt e Bain, 2013). Supõe-se, portanto, que os maiores índices funcionais encontrados no grupo E, quando comparado ao grupo N, se devem à maior precisão das novas conexões axonais com o músculo gastrocnêmio, o que resultou em maior número de axônios motores funcionais que efetivamente alcançaram o órgão alvo e, possivelmente, menos erros de direcionamento. Esse dado também é corroborado pelos níveis de amplitude no grupo E, que foram significativamente maiores do que no grupo N (Wood *et al.*, 2011).

Para melhor análise da suposição acima, estudos deveriam incluir em sua metodologia a avaliação da placa motora por microscopia eletrônica e contagem axonal mediante técnicas de marcação retrógada. É com ela que se determina a proporção de axônios que reinervam o órgão-alvo pertencentes ao grupo original de axônios, ou seja, o número de axônios que formaram conexões corretas, sem erros de direcionamento. No experimento realizado por Guntinas-Lichius *et al.* (2011), por exemplo, o reparo unilateral

do nervo facial, combinado com paralisia transitória da hemiface contralateral com toxina botulínica tipo A, resultou em aumento significativo do grau de reinervação correta quando comparado com a neurorrafia apenas (61 % *versus* 27 %). Naquele estudo, foram selecionados ratos com o ramo bucal do nervo facial formado exclusivamente por neurônios provenientes do subnúcleo facial lateral. Por meio de mapeamento axonal retrógrado, observou-se que o índice de reinervação correta, ou seja, composta apenas por neurônios motores provenientes do subnúcleo facial lateral, foi de 61 % no grupo submetido à neurorrafia e aplicação da toxina. O restante pertencia a outros subnúcleos do nervo facial distinto do lateral, resultado do mal direcionamento.

Uma explicação plausível para os achados do presente estudo é que tanto a lesão do nervo tibial como a injeção da toxina abobotulínica tipo A podem ter induzido alterações na atividade cortical mediante o bloqueio da condução nervosa periférica, o que resultou em reorganização dos sistemas nervoso central e periférico em busca do maior equilíbrio funcional entre o lado lesionado e o normal. Esse fenômeno tem sido chamado de neuroplasticidade – a habilidade do sistema nervoso de alterar sua estrutura e função (Toldi *et al.*, 1999; Farkas *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002b; Peeva *et al.*, 2006; Siddall, 2013).

A aptidão do cérebro para reorganização é extraordinária, segundo Siddall *et al.* (2013). Após lesões nervosas periféricas em ratos, a atividade neuronal no córtex correspondente diminui acentuadamente. A área cortical original do nervo lesionado parece ser parcialmente tomada por outros nervos. Quando um nervo periférico é lesionado, outro nervo adjacente com função similar é hiperativado. Sob essa condição, a expansão cortical intrahemisférica é o componente mais importante da plasticidade cortical. Quando todos os nervos responsáveis por uma função são lesionados, os mesmos nervos no lado contralateral do corpo são hiperativados durante uma tarefa, o que se traduz em expansão cortical inter-hemisférica na neuroplasticidade (Li *et al.*, 2013).

Após transecção do nervo mediano, as áreas correspondentes do córtex somatossensorial se tornam inativas. Rapidamente, áreas corticais adjacentes se expandem para a região antes correspondente ao nervo mediano. Essas alterações provavelmente têm origem na ativação de conexões sinápticas anteriormente inibidas. Embora as técnicas de microcirurgia para reparo de nervo periférico já tenham atingido um ótimo nível de refinamento, axônios regenerados com erros de orientação ainda são um problema. Portanto, áreas da mão, em grande medida, não serão reinervadas pelos seus axônios originais. O resultado são alterações significativas no território cortical no qual o nervo mediano é normalmente representado. A representação da mão, anteriormente bem organizada, assume um padrão tipo mosaico, e o nervo mediano não recaptura todo o seu território original. Esse conhecimento tem origem no estudo de primatas, embora achados análogos tenham sido encontrados em humanos mediante o uso de ressonância magnética funcional (Lundborg e Rosén, 2007).

Em estudo sobre lesão de plexo braquial, a raiz de C7 contralateral foi transferida para o nervo mediano a fim de restaurar a função de flexão da

pata dianteira de ratos. Os resultados mostraram que a representação da área cortical da pata lesionada foi encontrada no córtex motor ipsilateral cinco meses após a transferência nervosa, o que provou que ambos os lados, o esquerdo lesionado e o direito saudável, eram controlados simultaneamente pelo córtex motor esquerdo. Após sete meses, a área de representação da pata dianteira lesionada coexistiu em ambos os córtex motores, em áreas previamente inativas do córtex direito e em algumas áreas de representação da pata saudável no córtex esquerdo. A conclusão da reorganização cortical ocorreu após dez meses da cirurgia, na qual a representação da pata lesionada foi encontrada somente em áreas previamente inativas do córtex motor contralateral. Segundo os autores, para melhorar os resultados funcionais dos reparos de nervos periféricos, os esforços para tratamento devem levar em consideração a reorganização do córtex cerebral (Jiang *et al.*, 2010).

Dentro das estratégias de intervenção na reorganização cortical, vêm sendo desenvolvidos protocolos destinados a manter a representação cortical original do órgão que sofreu lesão de nervo periférico e foi submetido a reparo. Lundborg e Rosén (2007) propuseram princípios para manter o mapa cortical da mão por meio da capacidade cerebral de interação tátil-visual e áudio-tátil e denervação sensorial seletiva, tal como anestesia cutânea do antebraço da mão lesionada com o objetivo de melhorar a recuperação funcional.

Esses achados experimentais podem justificar a melhora funcional observada em pacientes tratados com toxina botulínica mesmo em casos de

paralisia facial de longa duração, ou seja, muitos anos após a lesão original (Salles *et al.*, 2009; Do Nascimento Remigio *et al.*, 2015).

Clinicamente, não há técnica que assegure recuperação funcional completa após reparo de lesão nervosa periférica. Mesmo que o reparo seja conduzido com cuidado e adequada habilidade cirúrgica, o resultado parece depender de fatores ligados ao sistema nervoso central, o que inclui a reorganização cortical. Para melhorar os resultados funcionais, técnicas de reeducação como terapia de restrição e indução do movimento, voltadas para a manipulação da plasticidade do sistema nervoso central, já têm sido usadas com sucesso. Há estudos que vêm mostrando de forma consistente a expansão da representação cortical da extremidade afetada no córtex motor ipsilesional após terapia de restrição e indução do movimento (Li et al., 2013). O uso forçado do lado lesionado intensifica a neurogênese e melhora a recuperação funcional (Maier et al., 2008; Qu et al., 2015). Essa técnica de reabilitação envolve treinamento do lado afetado e restrição do lado contralateral, o que resulta em melhora da performance motora, que persiste mesmo após a retirada da restrição (Taub et al., 2002). Tal afirmação ajuda a explicar a melhora funcional persistente do lado paralisado observada mesmo após o término da ação da toxina botulínica, tanto neste trabalho como em anteriores. No presente estudo, o bloqueio da condução nervosa, pela lesão nervosa ou pela toxina, pode ter atuado como uma forma de terapia de restrição e indução do movimento que desencadeou respostas centrais adaptativas críticas para uma interação mais coordenada entre o sistema nervoso central e o periférico,

consequentemente afetando de maneira positiva o lado contralateral como tentativa de compensar o déficit funcional.

Os efeitos da neuroplasticidade também têm sido estudados em seres humanos. Há considerável evidência de que a representação cortical das regiões do corpo é continuamente modulada em resposta à atividade, comportamento e aquisição de habilidades (Chen *et al.*, 2002b). Crianças habituadas a intensa prática musical desenvolvem áreas do principal trato inter-hemisférico, o corpo caloso, maiores que as não praticantes, por exemplo. O corpo caloso tem particular importância para os músicos, que acionam simultaneamente partes de ambos os hemisférios cerebrais para tocar um instrumento (Schlaug *et al.*, 2009; Habibi *et al.*, 2017). Embora o efeito do treinamento musical nas representações corticais possa ser maior se iniciado na infância, o cérebro adulto também é passível de alterações (Trainor *et al.*, 2003), o que demonstra o amplo potencial da neuroplasticidade.

A reorganização dos sistemas sensorial e motor após lesão nervosa periférica ocorre em múltiplos níveis do sistema nervoso central, incluindo medula espinhal, tronco cerebral, tálamo e córtex (Chen *et al.*, 2002b). Pouco se sabe, entretanto, como essas alterações plásticas centrais se traduzem em alterações no sistema nervoso periférico e quais seriam benéficas ou prejudiciais (Navarro *et al.*, 2007). Pessoas com deficiência na visão adaptam o córtex visual para discriminação sensorial auditiva ou tátil, por exemplo (Burton, 2003). Por outro lado, alterações neuroplásticas podem ser direcionadas para áreas nas quais elas se tornam desadaptativas ou

disfuncionais, como no desenvolvimento de distonia focal da mão em músicos com prática intensa (Pantev *et al.*, 2001). Estudos sugerem que futuras pesquisas sejam direcionadas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que não apenas aprimorem a regeneração nervosa, mas que sejam capazes de modular a reorganização do sistema nervoso central, amplificando as respostas adaptativas positivas e reduzindo as consequências indesejáveis (Navarro *et al.*, 2007).

No presente estudo, a injeção de 5 U de toxina abobotulínica A no músculo gastrocnêmio provocou paralisia transitória com recuperação da função avaliada pelo teste da marcha após 8 semanas no grupo TXB, e diminuiu significativamente os valores de latência após 12 semanas nesse grupo, demonstrando a eficiência da dose utilizada no modelo apresentado. No grupo Estudo, a paralisia transitória do músculo gastrocnêmio contralateral favoreceu a recuperação funcional do lado submetido à neurorrafia. Além disso, esse grupo apresentou menor atrofia muscular no lado injetado com a toxina botulínica que o grupo que recebeu apenas a toxina, sem a cirurgia.

Os resultados apresentados podem ter relevância no tratamento de pacientes com paralisia facial, uma vez que eles reforçam as observações de estudos clínicos prévios, mas sobretudo chamam a atenção para os potenciais benefícios da neuroplasticidade e como o progresso neurocientífico pode orientar o desenvolvimento de medidas terapêuticas indicadas para lesões nervosas.

CONCLUSÕES

O grupo de ratos que recebeu a aplicação de 5 U de toxina abobotulínica tipo A no músculo gastrocnêmio contralateral ao lado da neurorrafia (grupo E) apresentou índice de função tibial e amplitude significativamente maiores quando comparado ao grupo de ratos submetido apenas à neurorrafia (grupo N) na 12^a semana de observação, e semelhantes ao grupo de controle sem lesão (grupo C).

7 REFERÊNCIAS

Akdeniz ZD, Bayramiçli M, Ateş F, Özkan N, Yucesoy CA, Ercan F. The role of botulinum toxin type a-induced motor endplates after peripheral nerve repair. *Muscle Nerve*. 2015;52(3):412-8.

Alan DS. Facial Paralysis: state of the art. Facial Plast Surg Clin North Am. 2016;24(1):ix.

Angelov DN, Skouras E, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Popratiloff A, Walther M, Klein J, Stennert E, Neiss WF. Contralateral trigeminal nerve lesion reduces polyneuronal muscle innervation after facial nerve repair in rats. *Eur J Neurosci*. 1999;11(4):1369-78.

Azuma T, Nakamura K, Takahashi M, Ohyama S, Toda N, Iwasaki H, Kalubi B, Takeda N. Mirror biofeedback rehabilitation after administration of singledose botulinum toxin for treatment of facial synkinesis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;146(1):40-5.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989;83(1):129-38.

Batt JA, Bain JR. Tibial nerve transection - a standardized model for denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J Vis Exp*. 2013;(81):e50657.

Bolker JA. Animal Models in Translational Research: Rosetta Stone or Stumbling Block? *Bioessays*. 2017 Dec;39(12).

Borin A, Toledo RN, Faria SD, Testa JR, Cruz OL. Behavioral and histologic experimental model of facial nerve regeneration in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006;72(6):775-84.

Brenner MJ, Moradzadeh A, Myckatyn TM, Tung TH, Mendez AB, Hunter DA, Mackinnon SE. Role of timing in assessment of nerve regeneration. *Microsurgery*. 2008;28(4):265-72.

Brodsky MA, Swope DM, Grimes D. Diffusion of botulinum toxins. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2012;2. pii: tre-02-85-417-1.

Burton H. Visual cortex activity in early and late blind people. *J Neurosci*. 2003;23(10):4005-11.

Chen CM, Stott NS, Smith HK. Effects of botulinum toxin A injection and exercise on the growth of juvenile rat gastrocnemius muscle. J *Appl Physiol* (1985). 2002a;93(4):1437-47.

Chen R, Cohen LG, Hallett M. Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience*. 2002b;111(4):761-73.

Choi KH, Rho SH, Lee JM, Jeon JH, Park SY, Kim J. Botulinum toxin injection of both sides of the face to treat post-paralytic facial synkinesis. J *Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013;66(8):1058-63.

Cichon JV Jr, McCaffrey TV, Litchy WJ, Knops JL. The effect of botulinum toxin type A injection on compound muscle action potential in an in vivo rat model. *Laryngoscope*. 1995;105(2):144-8.

Clark RP, Berris CE. Botulinum toxin: a treatment for facial asymmetry caused by facial nerve paralysis. *Plast Reconstr Surg*. 1989;84(2):353-5.

Cobianchi S, Jaramillo J, Luvisetto S, Pavone F, Navarro X. Botulinum neurotoxin A promotes functional recovery after peripheral nerve injury by increasing regeneration of myelinated fibers. *Neuroscience*. 2017;359:82-91.

Cooper L, Lui M, Nduka C. Botulinum toxin treatment for facial palsy: A systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2017;70(6):833-41.

Cunha ADS. Reconstrução de defeito de nervo fibular em ratos com veia glicerolada: análise histológica e funcional [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2013. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFP. Aspectos fundamentais da experimentação animal-aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras*. 2010; 56(1):103-11.

de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982;77(3):634-43.

de Paiva A, Meunier FA, Molgó J, Aoki KR, Dolly JO. Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(6):3200-5.

de Ruiter GC, Spinner RJ, Verhaagen J, Malessy MJ. Misdirection and guidance of regenerating axons after experimental nerve injury and repair. *J Neurosurg*. 2014;120(2):493-501.

de Ruiter GC, Malessy MJ, Alaid AO, Spinner RJ, Engelstad JK, Sorenson EJ, Kaufman KR, Dyck PJ, Windebank AJ. Misdirection of regenerating motor axons after nerve injury and repair in the rat sciatic nerve model. *Exp Neurol.* 2008;211(2):339-50.

do Nascimento Remigio AF, Salles AG, de Faria JC, Ferreira MC. Comparison of the efficacy of onabotulinumtoxinA and abobotulinumtoxinA at the 1: 3 conversion ratio for the treatment of asymmetry after long-term facial paralysis. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(1):239-49. Fagotti de Almeida CE, Farina Junior JA, Colli BO. Morphometric and Functional Analysis of Axonal Regeneration after End-to-end and End-to-side Neurorrhaphy in Rats. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2015;3(3):e326.

Faria JC, Scopel GP, Busnardo FF, Ferreira MC. Nerve sources for facial reanimation with muscle transplant in patients with unilateral facial palsy: clinical analysis of 3 techniques. *Ann Plast Surg*. 2007;59(1):87-91.

Faria JC, Scopel GP, Ferreira MC. Facial reanimation with masseteric nerve: babysitter or permanent procedure? Preliminary results. *Ann Plast Surg*. 2010;64(1):31-4.

Farkas T, Perge J, Kis Z, Wolff JR, Toldi J. Facial nerve injury-induced disinhibition in the primary motor cortices of both hemispheres. *Eur J Neurosci*. 2000;12(6):2190-4.

Ferreira MC. Aesthetic considerations in facial reanimation. *Clin Plast Surg*. 2002;29(4):523-32.

Ferreira MC, Marques de Faria JC. Result of microvascular gracilis transplantation for facial paralysis-personal series. *Clin Plast Surg.* 2002;29(4):515-22, vi.

Ferreira MC. Cross-facial nerve grafting. *Clin Plast Surg.* 1984;11(1):211-4.

Fox IK, Brenner MJ, Johnson PJ, Hunter DA, Mackinnon SE. Axonal regeneration and motor neuron survival after microsurgical nerve reconstruction. *Microsurgery*. 2012;32(7):552-62.

Franz CK, Puritz A, Jordan LA, Chow J, Ortega JA, Kiskinis E, Heckman CJ. Botulinum Toxin Conditioning Enhances Motor Axon Regeneration in Mouse and Human Preclinical Models. *Neurorehabil Neural Repair*. 2018;32(8):735-745.

Gordon T, Borschel GH. The use of the rat as a model for studying peripheral nerve regeneration and sprouting after complete and partial nerve injuries. *Exp Neurol.* 2017;287(Pt 3):331-47.

Gracies J-M, Simpson DM. Botulinum toxin therapy. *Neurologist*. 2000;6(2):98-115.

Guntinas-Lichius O, Glowka TR, Angelov DN, Irintchev A, Neiss WF. Improved functional recovery after facial nerve reconstruction by temporary denervation of the contralateral mimic musculature with botulinum toxin in rats. *Neurorehabil Neural Repair*. 2011;25(1):15-23.

Guntinas-Lichius O, Effenberger K, Angelov DN, Klein J, Streppel M, Stennert E, Neiss WF. Delayed rat facial nerve repair leads to accelerated and enhanced muscle reinnervation with reduced collateral axonal sprouting during a definite denervation period using a cross-anastomosis paradigm. *Exp Neurol.* 2000;162(1):98-111.

Guntinas-Lichius O, Streppel M, Stennert E. Postoperative functional evaluation of different reanimation techniques for facial nerve repair. *Am J Surg*. 2006;191(1):61-7.

Habibi A, Damasio A, Ilari B, Veiga R, Joshi AA, Leahy RM3, Haldar JP, Varadarajan D, Bhushan C, Damasio H. Childhood Music Training Induces Change in Micro and Macroscopic Brain Structure: Results from a Longitudinal Study. *Cereb Cortex*. 2018;28(12):4336-4347..https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126181

Hadlock TA, Heaton J, Cheney M, Mackinnon SE. Functional recovery after facial and sciatic nerve crush injury in the rat. *Arch Facial Plast Surg*. 2005;7(1):17-20.

Han N, Kim HD, Eom MJ, You JM, Han J, Kim HK, Kang MS. Proteomic changes in rat gastrocnemius muscle after botulinum toxin a injection. *Ann Rehabil Med.* 2013;37(2):157-66.

Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Midha R, Szalai JP, Hunter DA. Walking track analysis: utilization of individual footprint parameters. *Ann Plast Surg.* 1993;30(2):147-53.

Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, Hunter DA. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg.* 1992;89(2):251-8. Jiang S, Li ZY, Hua XY, Xu WD, Xu JG, Gu YD. Reorganization in motor cortex after brachial plexus avulsion injury and repair with the contralateral C7 root transfer in rats. *Microsurgery*. 2010;30(4):314-20.

Kim J. Contralateral botulinum toxin injection to improve facial asymmetry after acute facial paralysis. *Otol Neurotol.* 2013;34(2):319-24.

Klein AW. Contraindications and complications with the use of botulinum toxin. *Clin Dermatol.* 2004;22(1):66-75.

Kobayashi J, Mackinnon SE, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, Hunter DA, Kuzon WM Jr. The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. *Muscle Nerve*. 1997;20(7):858-66.

Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, Greenacre C, Gwaltney-Brant S, McCrackin MA, Meyer R, Miller D, Shearer J, Yanong R, Golab GC, Patterson-Kane E; Panel's Working Groups. *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition*. Schaumburg: American Veterinary medical Association, 2013.

Legerlotz K, Matthews KG, McMahon CD, Smith HK. Botulinum toxininduced paralysis leads to slower myosin heavy chain isoform composition and reduced titin content in juvenile rat gastrocnemius muscle. *Muscle Nerve*. 2009;39(4):472-9. Lemke A, Penzenstadler C, Ferguson J, Lidinsky D, Hopf R, Bradl M, Redl H, Wolbank S, Hausner T. A novel experimental rat model of peripheral nerve scarring that reliably mimics post-surgical complications and recurring adhesions. *Dis Model Mech*. 2017;10(8):1015-25.

Li R, Hettinger PC, Machol JA, Liu X, Stephenson JB, Pawela CP, Yan JG, Matloub HS, Hyde JS. Cortical plasticity induced by different degrees of peripheral nerve injuries: a rat functional magnetic resonance imaging study under 9.4 Tesla. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2013;8(1):4.

Longo MV, Marques de Faria JC, Isaac C, Nepomuceno AC, Teixeira NH, Gemperli R. Comparisons of the results of peripheral nerve defect repair with fibrin conduit and autologous nerve graft: An experimental study in rats. *Microsurgery*. 2016;36(1):59-65.

Lundborg G, Rosén B. Hand function after nerve repair. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007;189(2):207-17.

Ma J, Elsaidi GA, Smith TL, Walker FO, Tan KH, Martin E, Koman LA, Smith BP. Time course of recovery of juvenile skeletal muscle after botulinum toxin A injection: an animal model study. *Am J Phys Med Rehabil.* 2004;83(10):774-80.

Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP. Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve*. 1991;14(11):1116-22.

Maier IC, Baumann K, Thallmair M, Weinmann O, Scholl J, Schwab ME. Constraint-induced movement therapy in the adult rat after unilateral corticospinal tract injury. *J Neurosci.* 2008;28(38):9386-403.

Martins RS, Siqueira MG, da Silva CF, Plese JP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006;64(3B):750-6.

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

Mohanty CB, Bhat DI, Devi BI. Use of animal models in peripheral nerve surgery and research. *Neurol India.* 2019;67(Supplement):S100-5.

Monini S, De Carlo A, Biagini M, Buffoni A, Volpini L, Lazzarino AI, Barbara M. Combined protocol for treatment of secondary effects from facial nerve palsy. *Acta Otolaryngol*. 2011;131(8):882-6.

Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol.* 2007;82(4):163-201.

Nepomuceno AC, Politani EL, Silva EG, Salomone R, Longo MV, Salles AG, Faria JC, Gemperli R. Tibial and fibular nerves evaluation using intraoperative electromyography in rats. *Acta Cir Bras*. 2016;31(8):542-8. Nepomuceno AC, de Faria JC, Politani EL, Silva EG, Salomone R, Longo MV, Lima W, Salles AG, Gemperli R. Convergent end-to-end neurorrhaphy: An alternative technique for dual innervation of the gastrocnemius muscle in rats. *Microsurgery*. 2019;39(6):535-42.

Nepomuceno AC. *Estudo experimental de técnicas de dupla inervação muscular em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2017.

Oh SJ. *Clinical electromyography: nerve conduction studies*. 3rd ed. Philadelphia: LWW, 2002.

Pantev C, Engelien A, Candia V, Elbert T. Representational cortex in musicians. Plastic alterations in response to musical practice. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;930:300-14.

Peeva GP, Angelova SK, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Irintchev A, Schütz U, Popratiloff A, Savaskan NE, Bräuer AU, Alvanou A, Nitsch R, Angelov DN. Improved outcome of facial nerve repair in rats is associated with enhanced regenerative response of motoneurons and augmented neocortical plasticity. *Eur J Neurosci*. 2006;24(8):2152-62.

Pingel J, Hultborn H, Näslund-Koch L, Jensen DB, Wienecke J, Nielsen JB. Muscle disuse caused by botulinum toxin injection leads to increased central gain of the stretch reflex in the rat. J Neurophysiol. 2017;118(4):1962-9. Puopolo M. Biostatistical approaches to reducing the number of animals used in biomedical research. *Ann Ist Super Sanita*. 2004;40(2):157-63.

Qu HL, Zhao M, Zhao SS, Xiao T, Song CG, Cao YP, Jolkkonen J, Zhao CS. Forced limb-use enhanced neurogenesis and behavioral recovery after stroke in the aged rats. *Neuroscience*. 2015;286:316-24.

Ramirez-Castaneda J, Jankovic J, Comella C, Dashtipour K, Fernandez HH, Mari Z. Diffusion, spread, and migration of botulinum toxin. *Mov Disord*. 2013;28(13):1775-83.

Remigio AFDN. Comparação da eficácia entre a toxina onabotulínica A com a abobotulínica A, na equivalência de 1:3, para o tratamento da assimetria na paralisia facial de longa duração [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2015.

Rogozhin AA, Pang KK, Bukharaeva E, Young C, Slater CR. Recovery of mouse neuromuscular junctions from single and repeated injections of botulinum neurotoxin A. *J Physiol*. 2008;586(13):3163-82.

Rosales RL, Bigalke H, Dressler D. Pharmacology of botulinum toxin: differences between type A preparations. *Eur J Neurol.* 2006;13 Suppl 1:2-10.

Salles Júnior GS. *Estudo da regeneração nervosa em modelo experimental de ratos diabéticos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2012.

Salles AG, da Costa EF, Ferreira MC, Remigio AF, Moraes LB, Gemperli R. Epidemiologic Overview of Synkinesis in 353 Patients with Longstanding Facial Paralysis under Treatment with Botulinum Toxin for 11 Years. *Plast Reconstr Surg.* 2015;136(6):1289-98

Salles AG. Discussion: quantitative measurement of evolution of postparetic ocular synkinesis treated with botulinum toxin type A. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(5):1265-7.

Salles AG. Avaliação do efeito da toxina botulínica no lado são em pacientes com paralisia facial de longa duração [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.

Salles AG, Ferreora MC. Botulinum toxin in the treatment of the synkinesis associated with facial paralysis – Preliminary report. *Plas Reconstr Surg*. 2012;130(5S-1):49-50.

Salles AG, Toledo PN, Ferreira MC. Botulinum toxin injection in longstanding facial paralysis patients: improvement of facial symmetry observed up to 6 months. *Aesthetic Plast Surg.* 2009;33(4):582-90. Scheibe PO. Number of samples - Hypothesis testing. *Nucl Med Biol*. 2008;35(1):3-9.

Schlaug G, Forgeard M, Zhu L, Norton A, Norton A, Winner E. Traininginduced neuroplasticity in young children. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1169:205-8.

Schnaider TB, Souza CD. Aspectos éticos da experimentação animal.*Rev Bras Anestesiol*. 2003; 53(2):278-85.

Semba K, Egger MD. The facial "motor" nerve of the rat: control of vibrissal movement and examination of motor and sensory components. *J Comp Neurol*. 1986;247(2):144-58.

Siddall PJ. Neuroplasticity and pain: what does it all mean? *Med J Aust*. 2013;198(4):177-8.

Siemionow M, Sari A, Demir Y. Effect of early nerve release on the progression of neuropathy in diabetic rats. *Ann Plast Surg*. 2007;59(1):102-8.

Stone AV, Ma J, Callahan MF, Smith BP, Garrett JP, Smith TL, Koman LA. Dose- and volume dependent-response to intramuscular injection of botulinum neurotoxin-A optimizes muscle force decrement in mice. *J Orthop Res.* 2011a;29(11):1764-70.

Stone HF, Zhu Z, Thach TQ, Ruegg CL. Characterization of diffusion and duration of action of a new botulinum toxin type A formulation. *Toxicon*. 2011b;58(2):159-67.

Tang-Liu DD, Aoki KR, Dolly JO, de Paiva A, Houchen TL, Chasseaud LF, Webber C. Intramuscular injection of 125I-botulinum neurotoxin-complex versus 125I-botulinum-free neurotoxin: time course of tissue distribution. *Toxicon*. 2003;42(5):461-9.

Taub E, Uswatte G, Elbert T. New treatments in neurorehabilitation founded on basic research. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(3):228-36.

Toia F, Giesen T, Giovanoli P, Calcagni M. A systematic review of animal models for experimental neuroma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015;68(10):1447-63.

Toldi J, Farkas T, Perge J, Wolff JR. Facial nerve injury produces a latent somatosensory input through recruitment of the motor cortex in the rat. *Neuroreport*. 1999;10(10):2143-7.

Torii Y, Goto Y, Takahashi M, Ishida S, Harakawa T, Sakamoto T, Kaji R, Kozaki S, Ginnaga A. Quantitative determination of biological activity of botulinum toxins utilizing compound muscle action potentials (CMAP), and comparison of neuromuscular transmission blockage and muscle flaccidity among toxins. *Toxicon*. 2010;55(2-3):407-14.

Trainor LJ, Shahin A, Roberts LE. Effects of musical training on the auditory cortex in children. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;999:506-13.

Tsai SW, Chen HL, Chang YC, Chen CM. Molecular mechanisms of treadmill therapy on neuromuscular atrophy induced via botulinum toxin A. *Neural Plast*. 2013;2013:593271.

Tuma Jr. P. *Estudo comparativo da regeneração após aloenxertos de nervo, com e sem imunossupressão. Estudo experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1997.

Ursu D, Cederna PS. Discussion: contralateral botulinum toxin improved functional recovery after tibial nerve repair in rats. *Plast Reconstr Surg*. 2018;142(6):1520-2.

Velders M, Legerlotz K, Falconer SJ, Stott NS, McMahon CD, Smith HK. Effect of botulinum toxin A-induced paralysis and exercise training on mechanosensing and signalling gene expression in juvenile rat gastrocnemius muscle. *Exp Physiol*. 2008;93(12):1273-83.

Wachter BG, Leonetti JP, Lee JM, Wurster RD, Young MR. Silver nitrate injury in the rat sciatic nerve: a model of facial nerve injury. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;127(1):48-54.

Wood MD, Kemp SW, Weber C, Borschel GH, Gordon T. Outcome measures of peripheral nerve regeneration. *Ann Anat.* 2011;193(4):321-33.