André Coelho Nepomuceno

**Estudo experimental de técnicas de dupla
inervação muscular 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

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Marques de Faria

Coorientadora: Profa. Dra. Raquel Salomone

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nepomuceno, André Coelho

Estudo experimental de técnicas de dupla inervação muscular em ratos /
André Coelho Nepomuceno -- São Paulo, 2017.

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

Orientador: José Carlos Marques de Faria.

Coorientadora: Raquel Salomone.

Descritores: 1.Ratos Wistar 2.Nervo tibial 3.Regeneração nervosa
4.Transferência nervosa 5.Neurorrafia término-terminal 6.Neurorrafia término-
lateral 7.Dupla reinervação motora 8.Paralisia facial

USP/FM/DBD-257/17

Dedicatória

Dedico esta tese
aos meus pais
Edir e Maria Cecília,
por seu incentivo e apoio
durante toda minha vida e formação,
sem os quais jamais teria conseguido
avançar na busca pelo conhecimento.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. José Carlos Marques de Faria, meu orientador nesta tese, por transmitir a paixão pelo conhecimento, por me proporcionar oportunidades que contribuíram para minha formação como Cirurgião Plástico e Microcirurgião, pelos ensinamentos profissionais, morais e por sua amizade.

Ao Professor Dr. Rolf Gemperli, Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pela oportunidade concedida para a realização desta tese.

À Dra. Raquel Salomone, minha coorientadora, pela imensa ajuda no desenvolvimento das atividades laboratoriais relacionadas aos estudos eletrofisiológicos por meio da eletromiografia.

À Dra. Alessandra Grassi Salles, pelo seu incansável incentivo ao aprimoramento científico, pelas orientações desde a qualificação para a defesa desta tese, pelas revisões dos meus artigos, pelo exemplo de pesquisadora ética, compromissada e dedicada.

Ao amigo e colega Dr. Marco Longo, pelo apoio, ensinamentos e aprendizado, que foram fundamentais na elaboração e condução desta tese.

À Maria Luiza Balbão Coelho, minha querida tia e experiente professora da língua portuguesa, pela dedicação à revisão minuciosa desta tese.

Aos acadêmicos Eduardo Guandeline e Elisa Politani, da FMUSP, pela contribuição na execução dos experimentos.

Aos funcionários do Laboratório de Investigação Médica em Cirurgia Plástica e Microcirurgia (LIM 4) da FMUSP, Bruno Valério, Edna Maria

Rodrigues dos Santos e Silvana Aparecida Biagione, que muito me ajudaram na execução das fases experimentais do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter subsidiado o aluno de doutorado com bolsa institucional.

Àqueles que, de alguma forma, contribuíram para que este projeto chegasse ao final.

Epígrafe

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo.”

Winston Churchill

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

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

Sumário

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas e quadros

Resumo

Summary

1	Introdução	1
2	Objetivo	5
3	Revisão da Literatura	7
3.1	Nervo Periférico	8
3.1.1	Anatomia do Nervo Periférico	8
3.1.2	Lesões do Nervo Periférico	10
3.1.3	Regeneração do Nervo Periférico	11
3.1.4	Tratamento Cirúrgico do Nervo Periférico	14
3.1.4.1	Neurorrafia Término-Terminal	17
3.1.4.2	Neurorrafia Término-Lateral	18
3.1.4.3	Reinervação Muscular Limitada	19
3.2	Aplicação Clínica da Reinervação Muscular.....	19
3.3	Dupla Reinervação Muscular.....	25
4	Métodos	29
4.1	Normatizações.....	30
4.1.1	Manejo dos Animais.....	30
4.1.2	Comissão de Ética	30
4.2	Animais.....	31
4.2.1	Caracterização da Amostra.....	31
4.2.2	Ambiente da Experimentação	31
4.3	Delineamento Experimental.....	32
4.4	Procedimento Cirúrgico	34

4.5	Manutenção Pós-operatória	37
4.6	Avaliações I (Funcional e Fisiológica).....	37
4.6.1	Massa Corporal.....	37
4.6.2	Avaliação Funcional: Teste da Marcha (<i>Walking Track</i>)	37
4.6.3	Avaliação Fisiológica: Eletromiografia (EMG)	40
4.7	Coleta das Peças.....	44
4.7.1	Processamento Histológico dos Nervos.....	44
4.8	Avaliações II (Anatômica e Histológica).....	45
4.8.1	Avaliação Anatômica: Peso do Músculo Gastrocnêmio	45
4.8.2	Avaliação Histológica Quantitativa	46
4.8.3	Avaliação Histológica Qualitativa	48
4.9	Eutanásia.....	48
4.10	Descarte das Carcaças e Materiais	48
4.11	Análise Estatística	49
4.12	Local do Trabalho	50
5	Resultados	51
5.1	Massa Corporal	52
5.2	Resultados das Avaliações I (Funcional e Fisiológica)	53
5.2.1	Avaliação Funcional: Teste da Marcha (<i>Walking Track</i>)	53
5.2.2	Avaliação Fisiológica: Eletromiografia (EMG)	60
5.3	Resultados das Avaliações II (Anatômica e Histológica).....	64
5.3.1	Avaliação Anatômica: Peso do Músculo Gastrocnêmio	64
5.3.2	Avaliação Histológica Quantitativa	67
5.3.3	Avaliação Histológica Qualitativa	69
6	Discussão.....	71
7	Conclusões	86
8	Referências.....	88
Apêndice		

Listas

ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comissão de Ética e Pesquisa em Animais
CPAES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DDIE	Distância entre os Dedos Intermediários da Pegada Experimental
DDIN	Distância entre os Dedos Intermediários da Pegada Normal
Dr.	Doutor
ed.	Edição
EMG	Eletromiografia
EPE	Extensão da Pegada Experimental
EPN	Extensão da Pegada Normal
et al.	E outros
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
IFT	Índice de Função Tibial
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LPN	Largura da Pegada Experimental
LPN	Largura da Pegada Normal
MG	Músculo Gastrocnêmio
NC	Nervo Ciático
NF	Nervo Fibular
NS	Nervo Sural
NT	Nervo Tibial
p	nível de significância
p.	página
PAMC	Potencial de Ação Muscular Composto
Pós-op	Pós-operatório
Pré-op	Pré-operatório
USB	Universal Serial Bus (entrada de computador)
USP	Universidade de São Paulo

SÍMBOLOS

©	direitos autorais
™	marca comercial
®	marca registrada
Ω	Ohms (medida de impedância)
μm ²	micrômetro quadrado
%	por cento
cm	centímetro
DDR	<i>Double Data Rate</i>
g	grama
GB	Gigabyte
GHz	Gigahertz
HD	Hard Drive
Hz	Hertz
kg	quilograma
kHz	quilohertz
mA	miliampere
mg	miligrama
mm	milímetro
ms	milissegundo
mV	milivolts
°C	grau Celsius
UI	unidade internacional
μm	micrômetro
μV	microvolts

FIGURAS

Figura 1 –	Anatomia do nervo e do neurônio	9
Figura 2 –	Classificação das lesões nervosas.....	10
Figura 3 –	Exemplos de transferências nervosas por meio de neurorrafias término-laterais (I e II) e término-terminais (III e IV).....	16
Figura 4 –	Neurorrafia término-terminal com sutura epineural.....	17
Figura 5 –	Neurorrafia término-lateral com abertura epineural.....	18
Figura 6 –	Transferência nervosa massetérico-facial.....	21
Figura 7 –	Enxerto transfacial de nervo sural.....	22
Figura 8 –	Transferência livre de segmento do músculo grácil	23
Figura 9 –	Retalho livre do músculo grácil reinervado pelo nervo facial contralateral (esquerda), ou pelo nervo massetérico (direita).	24
Figura 10 –	Neurorrafia término-lateral reversa (esquerda), onde o nervo receptor (coto distal) recebe axônios provenientes de duas fontes axonais distintas. Neurorrafia término-lateral convencional (direita), onde o nervo receptor recebe axônios provenientes de um único nervo doador	26
Figura 11 –	Retalho livre do músculo grácil duplamente reinervado: pelo nervo massetérico (neurorrafia término-terminal) e pelo nervo facial contralateral (neurorrafia término-lateral), por meio de enxerto transfacial de nervo sural	27
Figura 12 –	Grupos Experimentais: controle (C); nervo tibial seccionado (S); neurorrafia término-terminal do nervo tibial (TT); neurorrafia primária do nervo tibial associada à transferência fibular-tibial término-lateral (TL); neurorrafia término-terminal convergente dos cotos proximais dos nervos tibial e fibular ao coto distal do nervo tibial (TTC). Nervo Ciático (NC); Nervo Tibial (NT); Nervo Fibular (NF); Músculo Gastrocnêmio (MG)	33

Figura 13 – Rato em decúbito ventral na mesa e planejamento da incisão cutânea na pata traseira direita.....	35
Figura 14 – Exposição do Nervo Ciático (NC), Nervo Fibular (NF), Nervo Tibial (NT), Nervo Sural (NS) e Músculo Gastrocnêmio (MG).....	35
Figura 15 – Microscópio cirúrgico DF Vasconcellos e mesa cirúrgica preparada com instrumentos microcirúrgicos.....	36
Figura 16 – A: pista para marcha dos ratos. B e C: treinamento pré-operatório para o teste da marcha. D e E: rato sendo submetido ao teste da marcha, identificando-se os animais ao acaso para os grupos de pesquisa	38
Figura 17 – Pegada normal da pata traseira direita do rato no pré-operatório. Medidas da extensão, largura e distância entre os dedos intermediários em centímetros	38
Figura 18 – Pista para avaliação da marcha do rato, mostrando as pegadas e detalhes representando as distâncias mensuradas, necessárias na fórmula para cálculo do Índice da Função do Nervo Tibial	39
Figura 19 – A: Eletromiógrafo, computador com <i>Software</i> Neuro-MEP.NET. B: Eletrodos de estímulo, captação e terra.....	41
Figura 20 – A: Modelo de eletrodo utilizado para estimulação elétrica. B: Modelo de eletrodo utilizado para captação elétrica. C: Eletrodo terra	42
Figura 21 – Eletrodo de estímulo no nervo ciático, posicionado 10 mm proximais a sua trifurcação	42
Figura 22 – Eletrodo de captação no músculo gastrocnêmio (compartimento do nervo tibial) posicionado 15 mm distalmente a trifurcação do nervo ciático	43
Figura 23 – Eletrodo de estímulo no nervo ciático e de captação no compartimento do nervo tibial, representado pelo músculo gastrocnêmio.....	43

Figura 24 – Músculo gastrocnêmio do rato sendo pesado.....	45
Figura 25 – Coleta e análise no nervo tibial do rato: (A) Local da coleta de segmento de 3 mm do nervo tibial, 3 mm distais à última neurorrafia. (B) Seleção de corte com menos artefatos. (C) Seleção de 1 campo de leitura, com área fixa de 10.711 μm^2 , por quadrante. (D) Aumento de 400x para contagem axonal em cada um dos quatro campos de leitura	47
Figura 26 – Pegadas da pata traseira direita dos ratos, uma de cada grupo experimental, com 12 semanas de pós-operatório; e uma pegada pré-operatória normal.....	59
Figura 27 – Músculo Gastrocnêmio da pata traseira direita de rato, com 12 semanas de pós-operatório, de cada um dos cinco grupos	66
Figura 28 – Cortes histológicos do nervo tibial distal de cada grupo experimental com 12 semanas de pós-operatório, sob magnificação de 25X, 200X e 400X. Fotomicrografias com coloração Azul de Toluidina. Nos grupos de reinervação simples (TT) e dupla (TL e TTC), é possível visualizar escape axonal na magnificação de 25X e axônios mielinizados em regeneração na magnificação de 200X e 400X.	70
Figura 29 - Dupla reinervação muscular por meio da neurorrafia término-terminal associada com a transferência nervosa término-lateral (A). Dupla reinervação muscular por meio da neurorrafia término-terminal convergente (B).....	74

GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Evolução da massa corporal dos animais dos cinco grupos 53
- Gráfico 2** – Gráfico box plot do Índice de Função Tibial (IFT) dos cinco grupos experimentais nos diferentes momentos de avaliação 57
- Gráfico 3** – Gráfico do Índice de Função Tibial (IFT) dos cinco grupos experimentais nos diferentes momentos de avaliação, onde as medianas dos valores foram representadas por linhas coloridas..... 58
- Gráfico 4** – Amplitude do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio na 12^a semana do período pós-operatório, medida em microvolts (μV) 60
- Gráfico 5** – Latência do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio na 12^a semana do período pós-operatório, medida em milissegundos (ms)..... 62
- Gráfico 6** – Índice de Peso do Músculo Gastrocnêmio dos cinco grupos experimentais 64
- Gráfico 7** – Densidade axonal média do nervo tibial..... 67

TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Massa corporal em gramas dos cinco grupos no pré-operatório e 12 semanas após (média e desvio padrão).....	52
Tabela 2 – Índice de Função Tibial (IFT) dos cinco grupos experimentais nos quatro momentos de observação	54
Tabela 3 – Índice de Função Tibial (IFT): comparação par a par entre os grupos experimentais nos três momentos pós-operatórios de observação.....	55
Tabela 4 – Índice de Função Tibial (IFT): comparação par a par entre os três momentos pós-operatórios de observação de cada grupo de rato	56
Tabela 5 – Amplitude do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio: comparação par a par entre os grupos	61
Tabela 6 – Latência do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio: comparação par a par entre os grupos	63
Tabela 7 – Índice de Peso do Músculo Gastrocnêmio: comparação par a par entre os grupos	65
Tabela 8 – Densidade axonal do nervo tibial: comparação par a par entre os grupos.....	68
Quadro 1 – Caracterização dos grupos experimentais de ratos sacrificados 12 semanas após início dos experimentos, com coleta e análise do nervo tibial	32
Quadro 2 – Fórmula para cálculo do Índice de Função Tibial (IFT)	40

Resumo

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

A contração muscular gerada por impulsos elétricos provenientes de duas fontes nervosas distintas pode ser alternativa no tratamento de lesões do plexo braquial e na paralisia facial. O objetivo desta tese foi avaliar e comparar diferentes técnicas de reinervação dupla com a técnica de reinervação única do músculo gastrocnêmio em ratos. Cinquenta ratos Wistar adultos, após terem seu nervo fibular direito seccionado, foram divididos em cinco grupos com relação ao procedimento realizado no nervo tibial: controle (C); seccionado (S); neurorrafia término-terminal (TT); neurorrafia primária associada à transferência nervosa fibular para tibial de maneira término-lateral (TL); e neurorrafia término-terminal convergente entre os cotos proximais dos nervos tibial e fibular com o coto distal do nervo tibial (TTC). Os resultados foram avaliados 12 semanas após o experimento por meio do teste da marcha, eletromiografia, índice de massa do músculo gastrocnêmio e contagem axonal no coto distal do nervo tibial. Os grupos de reinervação dupla (TL e TTC) revelaram maiores resultados funcionais ($p < 0,05$) em relação ao grupo de reinervação única (TT). O grupo TTC apresentou maior amplitude ($p = 0,006$) e maior latência ($p = 0,041$) do que o grupo TT. Em relação ao índice de massa muscular, não houve diferença entre os grupos de reinervação ($p > 0,705$). A análise histológica revelou maior densidade axonal no grupo TTC em relação ao grupo TT ($p = 0,001$) e ao grupo TL ($p = 0,002$). Ambas técnicas de dupla reinervação revelaram recuperação funcional do músculo gastrocnêmio mais precoce e maior quando comparadas à técnica de reinervação única (TT). Os animais do grupo TTC apresentaram maior número de axônios regenerados no coto distal do nervo tibial do que os do grupo TT e TL.

Descritores: ratos Wistar; nervo tibial; regeneração nervosa; transferência nervosa; neurorrafia término-terminal; neurorrafia término-lateral; dupla reinervação motora; paralisia facial.

Summary

Nepomuceno AC. *Experimental study of double muscle innervation technique in rats* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Muscle contraction generated by electrical impulses simultaneously originating from two different neural sources may be an interesting treatment alternative for facial palsy and brachial plexus injury. The purpose of this thesis was to evaluate and compare distinct double reinnervation techniques with single reinnervation technique of gastrocnemius muscle in rats. Fifty adult Wistar rats underwent transection of their right peroneal nerve and were divided into five groups related to tibial nerve procedure: the control group (C), tibial nerve section group (S), tibial nerve end-to-end neurorrhaphy (EE) group, tibial nerve primary repair associated with end-to-side peroneal-to-tibial nerve transfer (ES) group, and tibial nerve repair by convergent end-to-end neurorrhaphy between the proximal stumps of the tibial and peroneal nerves to the distal stump of the tibial nerve (CEE) group. The outcomes were assessed 12 weeks after the experiment by use of a walking track, electromyography, gastrocnemius muscle mass index, and histomorphometric analysis of the distal tibial nerve. The double reinnervation groups (ES and CEE) showed greater functional recovery ($p < 0.05$) than the single reinnervation group (EE). The CEE group showed greater amplitude ($p = 0.006$) and higher latency ($p = 0.041$) than the EE group. There was no difference in the muscle mass index among the reinnervation groups ($p > 0.705$). Histologic analysis revealed greater axonal density in the CEE group than EE group ($p = 0.001$) and ES group ($p = 0.002$). The double reinnervation techniques showed earlier and greater functional recovery of the gastrocnemius muscle than did the single reinnervation technique. The CEE group showed a higher number of regenerated axons in the distal tibial nerve stump.

Descriptors: Wistar rats; tibial nerve; nerve regeneration; nerve transfer; end-to-end neurorrhaphy; end-to-side neurorrhaphy; double muscle reinnervation; facial paralysis.

1 Introdução

O reparo de nervos periféricos apresenta resultados variáveis e funcionalmente imprevisíveis (Fawcett e Keynes, 1990; Sunderland, 1990), pois a regeneração axonal raramente é completa, levando a sequelas, muitas vezes incapacitantes (Mackinnon *et al.*, 2005). Inúmeros estudos visam a elucidar o processo de reparação e regeneração nervosa, em busca de alternativas que possam melhorar os resultados (Ehrart *et al.*, 1975; Barton *et al.*, 2014). Nesse caminho, tem-se discutido que o aporte axonal extra pode levar benefícios à recuperação funcional do músculo reinervado (Jung *et al.*, 2009).

Em pacientes com paralisia facial de longa duração, os músculos da mímica facial encontram-se irreversivelmente atroficos devido à metaplasia fibroadiposa instalada. Nesses casos, é inútil a tentativa de reinervação da musculatura atrofica local. Cabe às transferências musculares a missão de reanimar a face paralisada (Harii *et al.*, 1976).

A reanimação do terço médio da face significa restaurar os movimentos do sorriso. Alguns grupos de pesquisadores mostraram que o transplante microcirúrgico de segmento do músculo grácil reinervado apenas pelo nervo massetérico pode gerar sorriso voluntário (Faria, 2002; Hontanilla *et al.*, 2013). Porém outros advogam que a melhor maneira de se conseguir sorriso voluntário e espontâneo é pela associação do nervo massetérico ipsilateral com o nervo facial contralateral, por meio de enxerto transfacial de nervo, ou seja, uma mesma unidade motora reinervada por dois nervos diferentes (Biglioli *et al.*, 2012b; Sforza *et al.*, 2015).

A possibilidade de o músculo responder a impulsos elétricos originados de dois eixos nervosos distintos é assunto controverso (Rodriguez *et al.*, 2011; Stipp-Brambilla *et al.*, 2012). Acreditava-se que o músculo intacto,

com suas placas motoras preservadas e respectivos nervos preenchidos por axônios nativos, não fosse capaz de formar novas conexões funcionais com as terminações axonais de outro nervo (Sunderland, 1990). Essa corrente vem sendo questionada, já que, em casos de perda da fonte axonal, o músculo correspondente pode passar a contrair ao receber estímulos provenientes tanto de nervos ortotópicos como heterotópicos concomitantemente, segundo evidências clínicas e experimentais (Brushart, 1990; Hennig e Dietrichs, 1994; Ito e Kudo, 1994; Lutz *et al.*, 2000; Mackinnon *et al.*, 2005).

Fatores como o direcionamento impróprio dos axônios em regeneração, a formação de tecido cicatricial fibroso e a distância entre fonte axonal e o músculo alvo podem interferir na reinervação muscular (Bertelli *et al.*, 2005). Tais dúvidas clínicas abrem espaço para a investigação da maneira mais eficiente de dois nervos reinervarem, concomitantemente, o mesmo músculo (Ladak e Spinner, 2013).

O Laboratório de Investigação Médica de Microcirurgia Experimental (LIM-4) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) vem realizando estudos experimentais, dentro da linha de pesquisa sobre reparo das lesões de nervos periféricos, desde a década de 70 (Ferreira, 1984). Seguiu-se, então, aplicação prática no Hospital das Clínicas (HC) da FMUSP, inicialmente para tratar lesões com falhas nervosas por meio de autoenxertia de nervo (Zumioti *et al.*, 1988). A morbidade na área doadora incentivou pesquisas em busca de alternativas ao tratamento convencional, como o uso de aloenxerto de nervo com e sem imunossupressão (Tuma, 1997), tubo de ácido poliglicólico (Costa *et al.*, 2006), nervo alógeno preservado em

glicerol (Lemos *et al.*, 2008), veias preservadas em glicerol (Cunha, 2013) e conduto de fibrina (Longo *et al.*, 2016).

Desde o início das atividades na área de microcirurgia reconstrutiva, o HC da FMUSP foi palco de trabalhos com foco no tratamento das lesões do nervo facial e, conseqüentemente, da paralisia facial (Faria, 2002).

Considerando o tratamento cirúrgico da paralisia facial de longa duração, que tem por objetivo o restabelecimento do sorriso voluntário e espontâneo, elaborou-se modelo experimental em ratos para avaliar e comparar duas técnicas com potencial de produzir dupla reinervação muscular.

2 Objetivo

O objetivo desta pesquisa é analisar e comparar técnicas de reinervação muscular única e dupla do músculo gastrocnêmio em modelo experimental de ratos.

3 Revisão da Literatura

A revisão da literatura foi dividida em três tópicos:

1. Nervo Periférico
2. Aplicação Clínica da Reinervação Muscular
3. Dupla Reinervação Muscular

3.1 Nervo Periférico

3.1.1 Anatomia do Nervo Periférico

O nervo periférico possui três bainhas conjuntivas desde a porção externa até seu interior: epineuro (tecido conjuntivo denso de colágeno tipo I, fibrócitos e fibroblastos), composto por camada interna e externa com vasos sanguíneos de maior calibre; perineuro (tecido conjuntivo denso de colágeno tipo I e III), o qual envolve os fascículos, que são conjuntos de fibras nervosas; e endoneuro (tecido conjuntivo frouxo de colágeno tipo III). Este último envolve o axônio e células de Schwann, que constituem a fibra nervosa (Normand e Rasband, 2015).

A unidade funcional do nervo é o neurônio, composto pelo corpo celular, dendritos, axônios e terminações nervosas (Figura 1). A função dos neurônios é conduzir impulsos eferentes, do sistema nervoso central para a periferia, e impulsos aferentes, da periferia para o sistema nervoso central, por meio de suas fibras (Machado e Haertel, 2013).

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista). Adaptado de Machado A, 2013.

Figura 1 – Anatomia do nervo e do neurônio

As fibras nervosas são envolvidas por uma cadeia de células de Schwann justapostas. As células de Schwann existem no nervo em duas formas: as formadoras da bainha de mielina e as não formadoras da bainha de mielina. Dependendo da sua presença, as fibras nervosas podem ser classificadas como mielínicas ou amielínicas. Nas fibras mielínicas, um axônio está associado a uma célula de Schwann formadora da bainha de mielina; nas fibras amielínicas, uma célula de Schwann envolve grande número de axônios, sem formar a bainha de mielina (Bercury e Macklin, 2015).

3.1.2 Lesões do Nervo Periférico

Em 1942, foi publicado no Reino Unido artigo científico classificando as lesões nervosas em três tipos, conforme ilustra a figura 2 (Seddon, 1942):

- **Neuropraxia:** quando há apenas bloqueio à passagem de impulsos elétricos, gerando paralisia temporária sem degeneração Walleriana.
- **Axonotmese:** quando há comprometimento parcial dos axônios e da bainha de mielina. A degeneração Walleriana está presente, apesar de o perineuro e epineuro permanecerem íntegros.
- **Neurotmese:** quando há secção completa do nervo.

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista). Adaptado de <http://imueos.blogspot.com.br/2010/11/degeneration-regeneration-of-peripheral.html>

Figura 2 – Classificação das lesões nervosas

Posteriormente, Sunderland (1951) classificou as lesões nervosas em cinco categorias, de acordo com sua gravidade. O primeiro grau corresponde à neuropraxia de Seddon, onde ocorre apenas lesão parcial da bainha de mielina. Sunderland subdividiu a axonotmese de Seddon em três categorias, e considera lesão de segundo grau aquela na qual apenas o axônio é seccionado; lesão de terceiro grau aquela onde ocorre perda da continuidade dos axônios e do endoneuro; e lesão de quarto grau onde ocorre perda da continuidade dos axônios, do endoneuro e do perineuro, restando apenas o epineuro intacto. Finalmente, a lesão de quinto grau de Sunderland é similar à neurotmese de Seddon, onde ocorre a perda da continuidade de todas camadas do nervo (Sunderland, 1951).

3.1.3 Regeneração do Nervo Periférico

Nas lesões nervosas do tipo neuropraxia, ocorre dano apenas na bainha de mielina, o que leva ao bloqueio temporário e reversível da passagem dos impulsos elétricos. Porém, nas lesões nervosas do tipo axonotmese ocorre comprometimento axonal, levando ao processo de degeneração e regeneração das fibras nervosas (Seddon, 1942).

Em 1850, Augustus Waller descreveu eventos que sucedem ao dano nervoso, como a desintegração axonal distal à lesão, e proximal até o primeiro nó de Ranvier, fenômeno que ficou conhecido como degeneração Walleriana. Esse processo é necessário para que haja regeneração nervosa (Koeppen, 2004).

A lesão do nervo periférico desencadeia modificações nos corpos celulares, no segmento proximal do nervo, no local da lesão, no segmento

distal e nas terminações da placa neuromuscular, todas com intuito de regenerar axônios lesionados. Essas modificações são possíveis, pois, durante o processo de regeneração neural, o transporte axonal anterógrado e retrógrado é mantido (Hoffman, 2010).

O corpo celular sofre alterações determinantes nas primeiras horas após a lesão neural: cromatólise (ingurgitamento e arredondamento da célula), desintegração do corpúsculo de Nissl e migração do núcleo do centro para a periferia (Beirowski *et al.*, 2005). Observam-se modificações no perfil de transcrição do RNA mensageiro, visando à sobrevivência do neurônio e à regeneração axonal, aumentando a produção de proteínas associadas com o crescimento neuronal como a GAP-43, tubulina, actina e múltiplos neuropeptídeos e citocinas. Em contrapartida, há um decréscimo na síntese das substâncias relacionadas à transmissão sináptica, já que a prioridade está na reparação do citoesqueleto (Fu e Gordon, 1997).

O segmento proximal do nervo sofre degeneração, que pode estender-se por mais de um nó de Ranvier e, dependendo da proximidade da lesão com o corpo celular, poderá ocorrer morte neuronal (Glenn e Talbot, 2013). A extremidade proximal do axônio dilata-se pelo acúmulo de estruturas como retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e microtúbulos, originando, a partir do nó de Ranvier mais proximal ao local da lesão, um grande número de finos prolongamentos denominados neuritos. Os neuritos, também conhecidos como cones de crescimento ou brotamentos axonais, avançam distalmente, explorando o microambiente intersegmentar e direcionam o crescimento axonal (Maggi *et al.*, 2003).

No local da lesão, nas primeiras 24 horas, ocorre reação inflamatória, extravasamento de plasma e migração de macrófagos, que fagocitam

fragmentos das células danificadas, limpando a região (Tanaka e Yoshida, 2014). Novas células de Schwann com características regenerativas proliferam e, juntamente com os macrófagos, aumentam a produção de moléculas que auxiliam no processo de degeneração e regeneração nervosa como as moléculas de adesão celular neural, proteína ácida das fibrilas gliais, fator de crescimento nervoso, fator neurotrófico derivado do cérebro, fator neurotrófico derivado da glia, fator de crescimento fibroblasto básico e neurotrofina 3 (Faroni *et al.*, 2015). A recém-formada matriz composta de fibrina, fibronectina, colágeno, capilares, células endoteliais e células de Schwann, constitui ponte intersegmentar importante para migração celular, formação e crescimento dos novos prolongamentos axonais (de Luca *et al.*, 2014).

No segmento distal, após a degeneração Walleriana ocorrer, as novas células de Schwann alinham-se em colunas chamadas de bandas de Büngner, que funcionam como condutos físicos, com microambiente rico em fatores tróficos favoráveis ao crescimento axonal. Os axônios em regeneração, que falham em adentrar as bandas de Büngner, param de crescer e sofrem remissão (Allodi *et al.*, 2012).

O nervo periférico humano em regeneração cresce por volta de 1 a 4 milímetros por dia (Seddon *et al.*, 1943). Após quatro semanas do início do processo de regeneração nervosa, é possível identificar mielinização axonal, reestruturação fascicular e certo grau de reneurotização. O corte histológico longitudinal do nervo em regeneração revela grande número de células de Schwann, o que justifica a distância internodal curta (Geuna *et al.*, 2009).

A porção pós-sináptica não se altera com a denervação aguda, pois as placas neuromusculares permanecem intactas até um ano após a denervação,

porém os receptores de acetilcolina tornam-se mais sensíveis. Nesse período, a tentativa de reinervação muscular ainda é possível (Sulaiman e Gordon, 2013).

Caso não ocorra regeneração nervosa e reinervação muscular, as fibras musculares atrofiam. O aumento do influxo de cálcio no músculo causa perda das proteínas metabólicas e contráteis, caracterizando a atrofia muscular, que se torna aparente por volta de três semanas após a lesão nervosa. Histologicamente, as fibras musculares atroficas ficam mais ingurgitadas com o núcleo centralizado, conhecidas como células em alvo. A fibra muscular com denervação crônica, período entre 12 e 24 meses, acumula colágeno tipo I, levando à fibrose irreversível e à diminuição da capacidade de recuperação funcional (Wu *et al.*, 2014).

Nas lesões nervosas do tipo neurotmese, ocorre secção completa do nervo, com perda da continuidade de todas suas camadas e desconexão entre os cotos proximal e distal. A regeneração axonal e reinervação muscular só será possível por meio do reparo microcirúrgico adequado do nervo, caso contrário, o músculo sofrerá atrofia (Gordon *et al.*, 1993).

3.1.4 Tratamento Cirúrgico do Nervo Periférico

Avicenna, no século XI, discutiu a possibilidade de reparo do nervo periférico, mas foi William de Saliceto, no século XIII em Bolonha, que realizou a primeira sutura entre os dois cotos de nervo transeccionado (Meals e Nelissen, 1995). Porém, sem o entendimento da anatomia, fisiologia e capacidade de regeneração nervosa, pouco se avançou nesse campo até o século XIX. Por volta de 1820, estudo em animal, envolvendo plexo braquial, demonstrou que,

meses após secção nervosa e sutura imediata com nervo heterotópico, o músculo passou a contrair ao estímulo desse nervo (Meals e Nelissen, 1995). Paget, em 1847, descreveu sucesso clínico no tratamento da transecção do nervo mediano, em paciente de onze anos de idade, por meio da neurorrafia término-terminal direta (Terziz *et al.*, 1997). Em 1903, Sir Charles Ballance relatou caso de paciente com paralisia facial periférica à esquerda, tratado por meio da sutura entre o coto distal do nervo facial seccionado e a lateral do nervo acessório ipsilateral, através de abertura em seu epineuro. Anos após a cirurgia, demonstrou-se melhora na simetria facial quando o paciente realizava força para levantar o ombro esquerdo. Esse foi o primeiro relato da neurorrafia término-lateral (Van de Graaf *et al.*, 2009).

Em 1947, Seddon propôs o enxerto de nervo autógeno para tratamento de lesões com grande perda de tecido nervoso (Seddon, 1947). Outras técnicas foram propostas para abordagem das falhas nervosas, como o enxerto de nervo alógeno associado ao uso de imunossupressores (Tuma, 1997); o tubo de ácido poliglicólico (Costa *et al.*, 2006); nervo alógeno preservado em glicerol (Lemos *et al.*, 2008); veias preservadas em glicerol (Cunha, 2013) e conduto de fibrina (Longo *et al.*, 2016). Contudo o enxerto de nervo autógeno mantém-se opção de primeira escolha no tratamento da falha nervosa (Griffin *et al.*, 2013).

Ainda no início do século XX, foi descrita como neurotização a implantação do coto proximal do nervo diretamente no ventre muscular. Já a sutura entre nervos, ortotópicos ou heterotópicos, ficou estabelecida como transferência nervosa (Meals e Nelissen, 1995), e a neurotização mostrou resultados funcionais inferiores às transferências nervosas (Haninec *et al.*, 2007;

Swanson *et al.*, 2008). Woolsey (1907)* citado por Farber (2013) ilustrou várias técnicas¹ de transferências nervosas de maneira término-terminal e término-lateral, conforme ilustrado na figura 3.

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista). Adaptado de Woolsey G, 1907.*

Figura 3 – Exemplos de transferências nervosas por meio de neurorrafias término-laterais (I e II) e término-terminais (III e IV)

A sutura do nervo periférico com tensão prejudica a microcirculação, gera fibrose, dificultando a regeneração axonal (Zumioti *et al.*, 1988).

*Woolsey G. *The surgery of the nerves*. In: Williams WK, ed. *Surgery: Its Principles and Practice*. Philadelphia, PA: Saunders;1907:686 –758.

A partir da segunda metade do século XX, foram relatados melhores resultados funcionais após tratamento cirúrgico do nervo periférico lesionado (Watchmaker e Mackinnon, 1997), devido à introdução do microscópio na prática cirúrgica (Smith, 1964) e à evolução da técnica microcirúrgica, por meio da união adequada dos cotos nervosos e da sutura sem tensão (Millesi, 1982).

As neurorrafias término-terminal e término-lateral são as técnicas mais utilizadas para unir dois cotos nervosos, e ambas são explicadas a seguir.

3.1.4.1 Neurorrafia Término-Terminal

Quando se dispõe dos cotos proximal e distal do nervo seccionado, o tratamento padrão é a neurorrafia término-terminal (Griffin *et al.*, 2013). A sutura perineural visa à melhor orientação fascicular, mas pode levar ao prejuízo do suprimento vascular e à formação de tecido cicatricial, prejudicando o processo de regeneração. A sutura epineural (Figura 4) é processo relativamente atraumático, exige menor dissecação e tempo de execução, sendo a técnica de escolha para a neurorrafia término-terminal (Bora, 1978; Braun, 1982).

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista). Adaptado de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfVjUAA/atualizacao-traumatologia-doaparelho-locomotor?part=2>

Figura 4 – Neurorrafia término-terminal com sutura epineural.

3.1.4.2 Neurorrafia Término-Lateral

Em algumas situações, o coto proximal do nervo pode não estar presente e, nesses casos, o coto distal do nervo lesionado pode ser coaptado à lateral do nervo doador intacto (Papalia *et al.*, 2007), por meio da neurorrafia término-lateral (Figura 5).

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista). Adaptado de Viterbo F, 2009.

Figura 5 – Neurorrafia término-lateral com abertura epineural

Por muito tempo, essa técnica foi deixada de lado devido à morbidade relacionada à lesão axonal causada no nervo doador, necessária para que haja brotamento axonal (Hayashi *et al.*, 2008; Viterbo *et al.*, 2009). Até que foi resgatada, na década de 90, com a introdução da possibilidade de brotamento axonal através da neurorrafia término-lateral sem abertura do epineuro (Viterbo *et al.*, 1992).

3.1.4.3 Reinervação Muscular Limitada

Apesar de ocorrer regeneração nervosa por ambas as técnicas, a reinervação muscular é melhor por meio da neurografia término-terminal, pois gera maior número de axônios em regeneração, e estes seguem a mesma direção no sentido do músculo alvo, com menor dispersão (Jaeger *et al.*, 2011; Fagotti *et al.*, 2015)

Porém, independentemente da técnica realizada para tratamento cirúrgico do nervo periférico seccionado, os resultados funcionais são limitados pela distância entre o nervo e seu músculo alvo, pela quantidade de axônios que conseguem reinervar as placas neuromusculares e pelo tempo de denervação muscular (Hall, 2001). A denervação crônica leva à atrofia muscular irreversível, cuja perda da função pode ser restaurada somente pela transferência de músculo reinervado (Zuker e Manktelow, 2007).

A associação de nervos distintos e técnicas de neurografias é um dos focos de pesquisas com intuito de alcançar melhor função motora da unidade muscular reinervada (Jones *et al.*, 2016).

3.2 Aplicação Clínica da Reinervação Muscular

Movimentos coordenados, simples, como o de fechar os olhos, ou complexos, que resultam na expressão de raiva ou de felicidade, dependem da integridade funcional do nervo facial. Alterações decorrentes da paralisia desse nervo têm, muitas vezes, repercussões físicas e psicológicas devastadoras para os seus portadores. Há distúrbios da fala, deglutição, mastigação,

oclusão palpebral, rompimento do equilíbrio facial estático e dinâmico. Com o comprometimento da comunicação afetiva, verbal e não verbal, diminui drasticamente a capacidade de relacionamento social. Muitos pacientes, nessas condições, evoluem para depressão e isolamento socioafetivo (Dobel *et al.*, 2013).

A etiologia da paralisia facial é ampla, com mais de 75 causas descritas entre idiopática, congênita, inflamatória, autoimune, neoplásica, traumática e outras, sendo a paralisia facial de Bell a mais prevalente (Valls-Solé, 2013).

As operações em Cirurgia Plástica estão concentradas sobre o segmento extratemporal do nervo facial (Bhama e Hadlock, 2014), em particular sobre a reanimação dinâmica do sorriso.

Nas lesões recentes do nervo facial frente à ausência do coto proximal, é possível utilizarem-se outros nervos cranianos para reanimar os músculos faciais homolaterais ainda viáveis (Biglioli, 2015a).

No início do século XX, foi relatada, pela primeira vez, a coaptação nervosa acessório-facial (Ballance *et al.*, 1903), mas logo essa técnica foi deixada de lado devido à morbidade no nervo acessório e à dificuldade do cérebro em relacionar o movimento do ombro como sendo o novo gatilho para o sorriso voluntário. Na mesma época, houve o primeiro relato da coaptação nervosa hipoglosso-facial (Körte, 1903). Nesse caso, os pacientes têm que se acostumar com o fato de a movimentação da língua ser o gerador do sorriso voluntário, além de haver o risco de ocorrer atrofia da hemilíngua, podendo-se comprometer a deglutição e a fala (Dalla *et al.*, 2014). Spira (1978) foi o primeiro a descrever o uso do nervo massetérico para reanimação facial, que foi popularizado pelo grupo de Toronto para tratamento da paralisia facial congênita, em paciente com síndrome de Moebius, por meio da transferência de segmento do músculo grácil reinervado pelo ramo massetérico do nervo trigêmeo (Zuker e Manktelow, 1989).

As principais vantagens dessa técnica são a baixa morbidade na área doadora, que não compromete a mastigação, e a facilidade de adaptação cerebral em associar o movimento da mordida com a indução do sorriso voluntário (Bianchi *et al.*, 2014; Hontanilla *et al.*, 2014). O nervo massetérico é dissecado do seu leito intramuscular e desviado para o coto distal do nervo facial seccionado, ao qual é coaptado por meio da neurorrafia término-terminal (Figura 6).

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista). Adaptado de <http://www.methodistfacialparalysis.com/masseter/>

Figura 6 – Transferência nervosa massetérico-facial

As transferências nervosas citadas podem gerar movimentos voluntários, porém o nervo facial é o único capaz de expressar movimentos desencadeados pela emoção. Nem o sorriso, nem a risada seriam espontâneos sem o nervo facial (Dobel *et al.*, 2013). Dessa forma, quando o coto proximal do nervo facial seccionado está indisponível, podem ser utilizados ramos do nervo facial contralateral, da hemiface não paralisada, para garantir estímulos aos movimentos emotivos involuntários (Scaramella, 1996). Estes estímulos são

transferidos para o lado paralisado da face por meio de enxertos transfaciais de nervo sural (Scaramella, 1971; Smith, 1971), conforme ilustra a figura 7.

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista). Adaptado de Smith JW, 1971.

Figura 7 – Enxerto transfacial de nervo sural

O teste da percussão de Tinel (Lifchez *et al.*, 2010) é usado para acompanhar topograficamente o crescimento axonal no enxerto transfacial de nervo. O principal inconveniente dessa técnica é que o estímulo entregue aos músculos da mímica facial contralaterais é pequeno. A funcionalidade do enxerto transfacial de nervo é melhorada se a anastomose distal for realizada em segundo tempo operatório, pois, se o procedimento fosse realizado em apenas um tempo cirúrgico, os axônios em regeneração teriam que transpassar duas linhas de sutura e, no momento em que atingissem a sutura distal, provavelmente, haveria barreira de cicatriz fibrótica, diminuindo o número de axônios que alcançariam o órgão alvo. Mesmo assim, a reinervação, frequentemente, é inadequada (Placheta *et al.*, 2015).

Na paralisia facial de longa duração, denervação por mais de dois anos, os músculos da mímica encontram-se com atrofia irreversível e com fibrose, inviabilizando sua reanimação. Portanto a solução mais racional é a substituição da unidade motora por meio da transferência muscular com inervação distinta (Biglioli, 2015b).

Com o advento da microcirurgia na década de 70, surgiu o primeiro relato de transplante neuromuscular livre em cães (Tamai *et al.*, 1970). Poucos anos depois, foi introduzido o transplante microcirúrgico do músculo grácil no tratamento da paralisia facial (Harii *et al.*, 1976). O nervo motor do músculo grácil demonstrou ser curto para alcançar ramos do nervo facial contralateral e, por isso, Harii, em 1979, propôs a realização de procedimento em dois estágios. No primeiro, era realizado enxerto transfacial de nervo e, no segundo, em média nove a 12 meses mais tarde, a transferência livre de segmento do músculo grácil (Harii, 1979; Manktelow e Zuker, 1984), ilustrado na figura 8.

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista). Adaptado de <http://www.facialparalysiscenter.com/conditions/gracilis-muscle-cfng/>

Figura 8 – Transferência livre de segmento do músculo grácil

A transferência de retalho livre do músculo grácil tem sido considerada método de escolha para reanimação facial na paralisia de longa duração (Faria, 2002; Hontanilla *et al.*, 2013; Biglioli, 2015a). Seja ele reinervado pelo nervo facial contralateral à hemiface paralisada, por meio de enxerto transfacial de nervo, seja pelo nervo massetérico homolateral dela (Figura 9).

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista). Adaptado de <http://www.stlouischildrens.org/our-services/facial-nerve-institute/reconstruction>

Figura 9 – Retalho livre do músculo grácil reinervado pelo nervo facial contralateral (esquerda), ou pelo nervo massetérico (direita).

O aporte axonal é fator determinante na reinervação muscular. Neste quesito, o nervo massetérico leva vantagem sobre o facial contralateral, por ser potente fonte doadora de axônios motores, favorecendo adequada excursão muscular, traduzida por sorriso voluntário (Bianchi *et al.*, 2014). Porém o nervo facial é o único capaz de conferir espontaneidade ao sorriso (Faria *et al.*, 2007). A hipótese de que a combinação de ambas técnicas pode proporcionar sorriso voluntário e também espontâneo vem sendo estudada (Terzis *et al.*, 2009b; Biglioli *et al.*, 2012b).

3.3 Dupla Reinervação Muscular

Em 1988, Terzis foi a pioneira a relatar a associação de estímulos quantitativos e qualitativos para tratamento da paralisia facial, por meio da técnica *babysitter* (Terzis, 1990). Nesse procedimento, 30% das fibras do nervo hipoglosso foram conectadas ao tronco do nervo facial lesionado para manter o trofismo muscular, enquanto os axônios em regeneração do nervo facial contralateral cresciam pelos enxertos transfaciais. Quando os axônios chegaram à extremidade distal, os enxertos foram conectados aos ramos distais do nervo facial do lado paralisado.

Nesse contexto, a ideia da dupla reinervação muscular ganhou importância pela possibilidade da associação de duas fontes distintas, doadoras de axônios motores, por meio da neurotização término-lateral reversa (Isaacs *et al.*, 2005). Nessa técnica, a transferência nervosa envolve a completa transecção do nervo motor doador, promovendo máximo potencial de regeneração, pois todos axônios motores seccionados estarão disponíveis no coto proximal para regeneração quando coaptados à lateral do nervo receptor, por meio de janela epineural (Isaacs *et al.*, 2008). Enquanto que, na neurorrafia término-lateral convencional, o coto distal do nervo seccionado é transferido para a lateral do nervo doador intacto (Dellon *et al.*, 2010). Neste caso, para que ocorra brotamento de axônios motores pela lateral do nervo doador, é necessário que haja axotomia parcial (Hayashi *et al.*, 2008). As diferenças entre as neurorrafias término-laterais estão ilustradas na figura 10.

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista). Adaptado de Isaacs JE, 2008.

Figura 10 – Neurografia término-lateral reversa (esquerda), onde o nervo receptor (coto distal) recebe axônios provenientes de duas fontes axonais distintas. Neurografia término-lateral convencional (direita), onde o nervo receptor recebe axônios provenientes de um único nervo doador

A dupla reinervação muscular pela neurografia término-lateral reversa já foi descrita como sinalização neural aumentada (Yamamoto *et al.*, 2007), e também como transferência nervosa sobrecarregada (Farber *et al.*, 2013). Nesta tese, esse conceito foi expresso simplesmente pela nomenclatura neurografia término-lateral.

O sucesso da dupla reinervação depende da existência da prévia degeneração walleriana e denervação muscular, uma vez que o nervo receptor íntegro pode inibir o brotamento axonal da segunda fonte nervosa (Isaacs *et al.*, 2005; Furukawa *et al.*, 2008).

Em 2010, relatou-se tratamento de paralisia facial recente pela técnica de dupla reinervação, usando enxerto transfacial de nervo sural com dissecação intraneural em forma de “Y”. Um coto foi coaptado ao ramo do nervo facial contralateral, e o outro coto, submetido à neurografia término-lateral ao nervo hipoglosso ipsilateral. Por fim, a outra extremidade do nervo sural foi coaptada ao nervo facial seccionado, por meio de neurografia término-terminal.

Nove meses após a cirurgia, observou-se simetria facial quase completa e movimentos coordenados dos músculos da mímica, sem evidência de atrofia da língua (Tomita *et al.*, 2010).

Em 2012, foi relatado tratamento de quatro pacientes portadores de paralisia facial unilateral completa de longa duração, por meio da transferência do músculo grácil duplamente reinervado: pelo nervo massetérico homolateral e pelo nervo facial contralateral, através de enxerto transfacial de nervo sural (Biglioli *et al.*, 2012b). No mesmo tempo operatório, foi realizada neurorrafia término-terminal entre o nervo massetérico e o nervo obturador, associada à neurorrafia término-lateral entre o coto distal do enxerto transfacial, proveniente do nervo facial contralateral, e a lateral do nervo obturador distalmente à primeira sutura (Figura 11).

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista). Adaptado de Biglioli F, 2012b.

Figura 11 – Retalho livre do músculo grácil duplamente reinervado: pelo nervo massetérico (neurorrafia término-terminal) e pelo nervo facial contralateral (neurorrafia término-lateral), por meio de enxerto transfacial de nervo sural

Nesse relato, foi observado, no período pós-operatório, o retorno do sorriso voluntário com 3,8 meses, e do sorriso espontâneo com 7,2 meses. Esse achado deve-se ao fato de o influxo axonal proveniente do nervo massetérico ser mais intenso e com percurso menor até o músculo alvo (Bianchi *et al.*, 2014). Ao passo que os axônios em regeneração, provenientes do nervo facial contralateral, têm que percorrer longo trajeto pelo enxerto transfacial do nervo sural até chegarem ao coto distal, quando ainda têm que transpor barreira cicatricial da sutura término-lateral para adentrarem no nervo obturador e, finalmente, alcançarem o músculo grácil (Biglioli *et al.*, 2012a).

A linha de sutura, em qualquer neurografia, oferece certo desafio aos axônios em regeneração. Quando duas neurografias são associadas, a resistência à passagem dos axônios é ainda maior, pois aqueles que venceram a primeira linha de sutura ainda terão de enfrentar a barreira fibrótica da segunda neurografia (Zumioti *et al.*, 1988).

Sabe-se que a neurografia oblíqua aumenta o brotamento axonal, por aumentar a superfície da área coaptada (Yan *et al.*, 2002), assim como o número reduzido de pontos na neurografia leva à menor formação de fibrose, permitindo maior passagem dos axônios em regeneração (Martins *et al.*, 2011). Portanto a associação desses conceitos nas técnicas de neurografias pode favorecer o processo da dupla reinervação muscular.

4 Métodos

4.1 Normatizações

Estudo experimental, longitudinal, prospectivo, aleatório, controlado e não cego.

4.1.1 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 contemplam os três princípios básicos de sensibilidade, bom senso e boa ciência (Schnaider e Souza, 2003).

Foram seguidas também as determinações da lei federal nº 11.794, de 8/10/2008, regulamentada pelo Decreto 6.899, em 15/7/2009, a qual 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.

4.1.2 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 157/13.

4.2 Animais

4.2.1 Caracterização da Amostra

Amostra composta por 50 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), isogênicos, da linhagem Wistar, com idade entre nove e dez semanas de vida, peso corporal variando entre 300 e 350 gramas. Todos os animais experimentais foram obtidos do Centro de Bioterismo da FMUSP e mantidos em gaiolas apropriadas e aprovadas para estudo, coletivas com cinco animais em cada.

4.2.2 Ambiente da Experimentação

Todos os animais foram mantidos pelo período experimental de 12 semanas antes da eutanásia, quando foram realizadas as avaliações finais.

Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Microcirurgia Experimental e Cirurgia Plástica (LIM 04) em caixas de polipropileno adequadas para a espécie, de dimensões padronizadas (um animal por caixa), devidamente identificadas e com troca de maravalha a cada 48 horas. Foi mantido ambiente específico climatizado com aproximadamente 22°C (± 2 °C) de temperatura e umidade controladas. 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.

4.3 Delineamento Experimental

Os animais, após terem o nervo fibular direito seccionado, foram separados aleatoriamente em cinco grupos com 10 ratos por grupo, conforme procedimento no nervo tibial direito (Quadro 1): controle (C); nervo tibial seccionado (S); nervo tibial seccionado seguido de neurorrafia primária término-terminal (TT); neurorrafia primária associada à transferência nervosa fibular para tibial de maneira término-lateral (TL) com janela epineural; e neurorrafia término-terminal convergente entre os cotos proximais dos nervos tibial e fibular com o coto distal do nervo tibial (TTC).

Quadro 1 – Caracterização dos grupos experimentais de ratos sacrificados 12 semanas após início dos experimentos, com coleta e análise do nervo tibial

Grupo	Nervo Fibular	Nervo Tibial	Neurorrafia
Controle (C)	Seccionado	Íntegro	Nenhuma
Seccionado (S)	Seccionado	Seccionado	Nenhuma
Término-Terminal (TT)	Seccionado	Seccionado	Primária do nervo tibial
Término-Lateral (TL)	Seccionado	Seccionado	Primária do nervo tibial + Término-Lateral fibular-tibial
Término-Terminal Convergente (TTC)	Seccionado	Seccionado	Convergente dos nervos tibial e fibular no coto distal do nervo tibial

O nervo sural, que é sensitivo, foi omitido nas figuras para melhor compreensão, representando-se o nervo ciático e apenas seus ramos motores: tibial e fibular. Entretanto todos ratos tiveram seu nervo sural preservado na prática (Figura 12).

FONTE: Fotos do próprio autor. Ilustrações de Hudson Calasans (Desenhista).

Figura 12 – Grupos Experimentais: controle (C); nervo tibial seccionado (S); neurorrafia término-terminal do nervo tibial (TT); neurorrafia primária do nervo tibial associada à transferência fibular-tibial término-lateral (TL); neurorrafia término-terminal convergente dos cotos proximais dos nervos tibial e fibular ao coto distal do nervo tibial (TTC). Nervo Ciático (NC); Nervo Tibial (NT); Nervo Fibular (NF); Músculo Gastrocnêmio (MG)

Nos grupos C e TT, o coto proximal do nervo fibular foi invertido 180 graus e sepultado na musculatura adjacente com intuito de evitar reinervação pelos brotamentos de axônios desse nervo. No grupo S, tanto o coto proximal como o distal dos nervos tibial e fibular foram invertidos 180 graus e sepultados na musculatura adjacente pelo mesmo motivo citado anteriormente e para facilitar a posterior identificação e coleta para análise histológica, com 12 semanas de pós-operatório.

4.4 Procedimento Cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos, avaliações e coletas de peças foram realizados, exclusivamente, pelo pesquisador, reduzindo-se, assim, a ocorrência de interferências técnicas e de outras variáveis.

Em todos os procedimentos cirúrgicos, os animais foram pesados e anestesiados, utilizando-se Pentobarbital Sódico, na dose de 30 mg/kg via intraperitoneal (Damy *et al.*, 2010) com agulha 25 por 5 mm. Logo depois de anestesiados, foram posicionados 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 Polivinil Pirrolidona a 10% tópica.

A dissecação romba entre os músculos glúteo máximo e o bíceps femoral foi realizada por meio de incisão cutânea longitudinal retilínea de três cm de comprimento na face posterior da coxa direita (Figura 13), com lâmina número 11, indo desde o trocânter maior até o joelho. Por esse acesso, foram expostos os nervos ciático, tibial, fibular, sural e o músculo gastrocnêmio (Figura 14).

FONTE: Fotos do próprio autor. Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista).

Figura 13 – Rato em decúbito ventral na mesa e planejamento da incisão cutânea na pata traseira direita

FONTE: Foto do próprio autor. Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista).

Figura 14 – Exposição do Nervo Ciático (NC), Nervo Fibular (NF), Nervo Tibial (NT), Nervo Sural (NS) e Músculo Gastrocnêmio (MG)

As neurorrafias foram realizadas com quatro pontos de Nylon 10.0 (Microsuture® Indústria Ltda., Brasil), com auxílio de microscópio cirúrgico DF Vasconcellos (OPMi6 Surgical Microscope, Zeiss, Germany) sob aumento de 10X (Figura 15).

FONTE: Foto do próprio autor. Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista).

Figura 15 – Microscópio cirúrgico DF Vasconcellos e mesa cirúrgica preparada com instrumentos microcirúrgicos

Após a manipulação do nervo, foi realizado o fechamento por planos da musculatura e pele com pontos separados de fio monofilamentar de nylon 4.0 (Ethicon®), com agulha três oitavos cortante de 13 mm.

4.5 Manutenção Pós-operatória

Após os procedimentos experimentais, os animais foram mantidos no Biotério Setorial do LIM 04, em gaiolas individuais, nas condições anteriormente especificadas.

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

4.6 Avaliações I (Funcional e Fisiológica)

4.6.1 Massa Corporal

Os ratos foram pesados em balança analítica (Ohaus MB 35 Mettler®), no pré-operatório e com 12 semanas de pós-operatório.

4.6.2 Avaliação Funcional: Teste da Marcha (*Walking Track*)

A avaliação do grau de recuperação funcional, associado à regeneração do nervo tibial, foi realizada aplicando-se o teste da marcha, também conhecido por *Walking Track*. Ele mede as alterações da marcha, em consequência da lesão neural causadora de claudicação na pata operada, através da impressão de pegadas do animal deixadas na plataforma de avaliação.

Os animais tiveram as patas traseiras mergulhadas em tinta nanquim preta da marca Trident[®], sendo então colocados para andarem em corredor com medidas padronizadas (8,2 por 42,0 cm), sobre papel branco, de modo a deixarem suas pegadas impressas (Figura 16 e Figura 17).

FONTE: Fotos do próprio autor.

Figura 16 – A: pista para marcha dos ratos. B e C: treinamento pré-operatório para o teste da marcha. D e E: rato sendo submetido ao teste da marcha, identificando-se os animais ao acaso para os grupos de pesquisa

FONTE: Fotos do próprio autor.

Figura 17 – Pegada normal da pata traseira direita do rato no pré-operatório. Medidas da extensão, largura e distância entre os dedos intermediários em centímetros

O teste da marcha foi realizado em todos os animais do estudo, antes mesmo de qualquer procedimento cirúrgico, como forma de treinamento e cálculo dos valores basais do Índice de Função do Nervo Tibial. Posteriormente, na 4^a, 8^a e 12^a semana do período pós-operatório.

O Índice de Função do Nervo Tibial (de Medinaceli *et al.*, 1982; Bain *et al.*, 1989), utiliza como base as seguintes variáveis: extensão da pegada (distância da extremidade do 3º dedo até o calcâneo), largura da pegada (distância entre o 1º e 5º dedos) e a distância entre os dedos intermediários (2º e 4º dedos). Todos considerados a partir da pata traseira do rato (Figura 18 e Quadro 2).

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista). Adaptado de Bain JR, 1989.

Figura 18 – Pista para avaliação da marcha do rato, mostrando as pegadas e detalhes representando as distâncias mensuradas, necessárias na fórmula para cálculo do Índice da Função do Nervo Tibial

Quadro 2 – Fórmula para cálculo do Índice de Função Tibial (IFT)

$$\text{IFT} = -37.2 \times [(EPE-EPN)/(EPN)] + 104.4 \times [(LPE - LPN)/LPN] + 45.6 \times [(DDIE - DDIN)/DDIN] - 8.8$$

Onde:

EPE = extensão da pegada experimental;

EPN = extensão 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;

IFT = próximo a zero ± 12 = função motora normal do nervo tibial;

IFT = próximo a - 100 ± 12 = completa disfunção.

As aferições foram realizadas, sempre, por um mesmo examinador que desconhecia o grupo ao qual o animal avaliado pertencia.

4.6.3 Avaliação Fisiológica: Eletromiografia (EMG)

O teste eletrofisiológico intraoperatório foi realizado na reexploração cirúrgica dos nervos tibiais operados, na 12^a semana do período pós-operatório, imediatamente antes do sacrifício e coleta dos materiais.

A incisão foi feita na mesma cicatriz da primeira cirurgia no membro posterior direito, permitindo acesso ao nervo ciático até sua trifurcação nos ramos sural, fibular, tibial, e a toda musculatura da região, após anestesia, tosquia, imobilização em decúbito ventral e antissepsia dos animais. Foi provocado estímulo no nervo ciático e leitura do Potencial de Ação Muscular Composto (PAMC) no músculo gastrocnêmio (MG), correspondente ao compartimento do nervo tibial, num ambiente mantido em torno de 25 °C. Os parâmetros do PAMC analisados foram: amplitude e latência.

O PAMC foi obtido com a utilização do eletromiógrafo portátil Neurosoft[®], modelo Neuro-MEP-Micro[®], conectado a um computador portátil Hewlett-Packard[®], modelo Pavilion dv5[®], por entrada USB, dispensando o uso de fonte externa de energia. A configuração do eletromiógrafo foi a seguinte: filtro passa alta 10 Hz; filtro passa baixo 10 KHz; filtro *notch* desligado; margem de entrada do sinal de 60 mV; e taxa de amostragem de 10 KHz. A análise do potenciais de ação muscular composto foi realizada por meio do *software* Neuro-MEP.NET, versão 2.4.23.0 (Figura 19).

FONTE: Fotos do próprio autor.

Figura 19 – A: Eletromiógrafo, computador com *Software* Neuro-MEP.NET. B: Eletrodos de estímulo, captação e terra

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 (Spes Medica[®]), dispostos em paralelo a uma distância fixa de 5 mm entre si. As pontas dos eletrodos de estímulo foram encurvadas para melhor encaixar no nervo, isoladamente, sem lesar o mesmo (Figura 20 A). Os eletrodos de captação receberam um revestimento isolante em 9 mm de extensão, permanecendo, assim, os 3 mm

distais sem revestimento (Figura 20 B). Como terra (neutro), foi utilizado um eletrodo monopolar da mesma marca e revestido semelhantemente aos eletrodos descritos anteriormente (Figura 20 C), porém posicionado no ponto médio entre a estimulação e a captação. Caso a impedância ultrapassasse 5 Ω , os eletrodos eram recolocados ou substituídos.

FONTE: Fotos do próprio autor.

Figura 20 – A: Modelo de eletrodo utilizado para estimulação elétrica. B: Modelo de eletrodo utilizado para captação elétrica. C: Eletrodo terra

O estímulo elétrico foi aplicado através de eletrodo igual ao descrito anteriormente, porém em formato de gancho posicionado sob o nervo ciático isolado, 10 mm proximais a sua trifurcação (Figura 21). Os estímulos elétricos utilizados foram únicos, sem promediação, com duração de 0,2 ms e intensidade inicial de 0,1 mA, sendo esta aumentada gradativamente até alcançar a intensidade supramáxima (Nepomuceno *et al.*, 2016).

FONTE: Fotos do próprio autor. Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista).

Figura 21 – Eletrodo de estímulo no nervo ciático, posicionado 10 mm proximais a sua trifurcação

No compartimento do nervo tibial, representado pelo músculo gastrocnêmio, a captação foi avaliada por meio de eletrodo inserido no ventre do músculo gastrocnêmio, no seu ponto médio, entre a porção proximal e seu tendão distal, a uma distância de 15 mm da trifurcação do nervo ciático (Figura 22). A varredura utilizada foi de 1,0 ms por divisão com uma janela total de 10 ms e ganho de 2,5 mV por divisão (Nepomuceno *et al.*, 2016).

FONTE: Fotos do próprio autor. Ilustração do Hudson Calasans (Desenhista).

Figura 22 – Eletrodo de captação no músculo gastrocnêmio (compartimento do nervo tibial) posicionado 15 mm distalmente a trifurcação do nervo ciático

Os eletrodos posicionados juntos para o exame de eletromiografia (EMG) intraoperatória estão representados na figura 23.

FONTE: Foto do próprio autor. Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista).

Figura 23 – Eletrodo de estímulo no nervo ciático e de captação no compartimento do nervo tibial, representado pelo músculo gastrocnêmio

4.7 Coleta das Peças

Fragmento do nervo tibial de aproximadamente 3 a 5 milímetros de comprimento foi coletado para análise histológica, após a realização do teste eletrofisiológico. O segmento do nervo foi coletado 3 milímetros distais à última neurorrafia, fosse ela término-terminal ou término-lateral nos grupos TT, TL e TTC. Já no grupo C, 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, foi coletado fragmento do nervo tibial distal ao local da neurotmeze cirúrgica prévia.

4.7.1 Processamento Histológico dos Nervos

Os segmentos dos nervos tibiais coletados foram fixados em solução de glutaraldeído a 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, em 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. Em seguida, as lâminas, contendo os 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.

4.8 Avaliações II (Anatômica e Histológica)

4.8.1 Avaliação Anatômica: Peso do Músculo Gastrocnêmio

Após o sacrifício dos animais na 12ª semana do período pós-operatório, os seus 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 o corpo muscular inteiramente, excluindo-se o tendão do calcâneo e o músculo sóleo. Após a coleta do músculo, primeiramente, tomou-se o cuidado de enxugá-lo, para remoção de sangue e de quaisquer outros fluidos. Só então, ele foi pesado em balança analítica de alta precisão (Ohaus 35 Mettler®). Chegou-se à medida das massas musculares do lado operado e não operado (Salles *et al.*, 2013). O cálculo do índice de peso foi possível dividindo-se o peso do lado operado pelo lado não operado, permitindo, dessa forma, comparação entre os grupos em relação ao grau de trofismo muscular (Figura 24).

FONTE: Fotos do próprio autor. Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista).

Figura 24 – Músculo gastrocnêmio do rato sendo pesado

4.8.2 Avaliação Histológica Quantitativa

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 um campo de maior aumento por quadrante, totalizando quatro por corte e 16 por lâmina. As imagens eram então capturadas por câmera DinoEye AM422X (DinoLite[®]) e digitalizadas em microcomputador Pentium IV 3.2 GHz, 2 GB de memória DDR e disco rígido com memória de 160 GB. Por meio do *software* Image-Pro-Plus, versão 4.5 (Media Cybernetics[®]), foi possível a avaliação da densidade axonal.

No aumento de 400 vezes, foi realizada a medida da área correspondente ao campo de leitura, obtendo-se o valor de $10.711 \mu\text{m}^2$, que foi constante para todas as imagens. Os axônios mielinizados regenerados foram 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 por μm^2 , por meio da fórmula: número de axônios por $10.711 \mu\text{m}^2$ (Figura 25).

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista), baseada em fotos do próprio autor.

Figura 25 – Coleta e análise no nervo tibial do rato: (A) Local da coleta de segmento de 3 mm do nervo tibial, 3 mm distais à última neurorrafia. (B) Seleção de corte com menos artefatos. (C) Seleção de 1 campo de leitura, com área fixa de $10.711 \mu\text{m}^2$, por quadrante. (D) Aumento de 400x para contagem axonal em cada um dos quatro campos de leitura

4.8.3 Avaliação Histológica Qualitativa

Utilizou-se a coloração de Azul de Toluidina 1% com objetivo de serem avaliadas também as características da arquitetura geral do nervo, como: o padrão geral de organização do tecido neural dentro dos tubos, reorganização axonal em fascículos, a disposição dos fibroblastos e do tecido conjuntivo epi-perineurais, a presença de escape de fibras axonais para fora dos limites do epineuro e análise da reação tecidual.

4.9 Eutanásia

Após as avaliações necessárias e coletas das peças anatômicas e histológicas, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de injeção de dose letal do anestésico Pentobarbital Sódico (100 mg/kg), via intraperitoneal (Damy *et al.*, 2010).

4.10 Descarte das Carcaças e Materiais

As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos apropriados, de cor branca opaca e identificados para o transporte até as câmaras frias. Posteriormente, o descarte foi realizado pela empresa contratada de lixo biológico existente no Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Os materiais perfuro-cortantes foram descartados em recipientes próprios (Descarpak) e, posteriormente, recolhidos pela empresa contratada.

4.11 Análise Estatística

Como a hipótese da normalidade foi descartada, foram adotados testes não paramétricos para análise estatística (Rosner, 2006). Inicialmente, todas as variáveis foram submetidas à análise descritiva. Para as variáveis quantitativas, a análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos e do cálculo de médias, desvios padrões, medianas e quartis.

Para a comparação entre os cinco grupos, no mesmo momento, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, pois a suposição de normalidade dos dados foi rejeitada. Quando foi necessária a comparação de dois grupos, par a par, foi então realizada a aplicação do teste de Mann-Whitney, ajustado pela correção de Bonferroni.

Para a comparação dos grupos nos diferentes momentos de avaliação, foi aplicado o teste de Friedman e, quando necessária a comparação par a par, aplicou-se, em seguida, o teste dos postos sinalizados de Wilcoxon, ajustado pela correção de Bonferroni.

O nível de significância adotado para os testes foi de 5% (0,05) para aplicação dos testes e análises estatísticas. Tal nível foi ajustado quando a correção de Bonferroni foi utilizada.

Todos os dados foram organizados em planilha eletrônica do Microsoft Excel do MS-Office 2010 e analisados com o programa estatístico IBM SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) em sua versão 22.0, para a obtenção dos resultados.

4.12 Local do Trabalho

A fase experimental do trabalho (cirurgias, testes da marcha e eletrofisiológicos, sacrifício dos animais, coleta das peças para histologia e pesagem dos músculos) foi realizada no LIM 4 do HC da FMUSP, pertencente à Disciplina de Cirurgia Plástica, do Departamento de Cirurgia.

O processamento histológico das peças foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica, e a leitura das lâminas para avaliação da regeneração nervosa, foi realizada no Laboratório de Patologia Experimental.

5 Resultados

De um total de 50 ratos, houve óbito de apenas um rato no grupo controle durante o experimento, na 8ª semana do período pós-operatório, sem causa definida da morte. O restante dos animais manteve-se com aparência e comportamento saudáveis.

5.1 Massa Corporal

A massa corporal dos animais foi semelhante no pré-operatório ($p=0,229$) e no pós-operatório de 12 semanas ($p=0,331$) entre os grupos (Tabela 1). O ganho de peso foi semelhante nos cinco grupos estudados (Gráfico 1).

Tabela 1 – Massa corporal em gramas dos cinco grupos no pré-operatório e 12 semanas após (média e desvio padrão)

Grupos	Pré-operatório	12 semanas
C	352,10 $\pm$ 31,28	507,20 $\pm$ 40,67
S	355,80 $\pm$ 19,52	495,60 $\pm$ 52,15
TT	355,70 $\pm$ 7,63	518,40 $\pm$ 51,64
TL	341,20 $\pm$ 25,41	535,80 $\pm$ 62,80
TTC	341,20 $\pm$ 12,01	534,00 $\pm$ 37,19
Valor de p	0,229	0,331

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

Gráfico 1 – Evolução da massa corporal dos animais dos cinco grupos

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

5.2 Resultados das Avaliações I (Funcional e Fisiológica)

5.2.1 Avaliação Funcional: Teste da Marcha (*Walking Track*)

A função do nervo tibial foi semelhante entre os grupos no pré-operatório, mas revelou diferença estatística significativa tanto entre os grupos para cada momento observado, como entre os momentos observados dentro de cada grupo (Tabela 2).

Tabela 2 – Índice de Função Tibial (IFT) dos cinco grupos experimentais nos quatro momentos de observação

	C	S	TT	TL	TTC	Valor de p
Pré-op	0,5 ±6,34	-10,77 ±5,04	-11,47 ±7,28	-1,68 ±11,99	-7,69 ±14,05	0,006
4ª semana pós-op	-57,94 ±7,83	-98,91 ±5,63	-98,77 ±8,39	-80,87 ±10,56	-78,57 ±20,46	< 0,001
8ª semana pós-op	-62,95 ±9,97	-99,92 ±5,99	-86,86 ±4,73	-38,43 ±28,04	-33,14 ±41,04	< 0,001
12ª semana pós-op	-70,82 ±12,56	-100,17 ±5,26	-80,26 ±17,20	-33,77 ±24,13	-42,15 ±31,14	< 0,001
Valor de p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

O grupo controle (C) apresentou função tibial significativamente maior que a do grupo com nervo tibial seccionado (S) em todos momentos pós-operatórios.

O grupo de reinervação única (TT) apresentou queda do IFT na 4ª semana no nível do grupo S, mas recuperou na 12ª semana, chegando à semelhança com o grupo controle.

O grupo de dupla reinervação TL, em relação ao grupo controle, apresentou IFT menor na 4ª semana, semelhante na 8ª e maior na 12ª semana de pós-operatório.

O grupo de dupla reinervação TTC, em relação ao grupo controle, apresentou tendência de IFT menor na 4ª semana, semelhante na 8ª e tendência de IFT maior na 12ª semana de pós-operatório.

Ambos grupos de dupla reinervação (TL e TTC) apresentaram função tibial maior em relação ao grupo de reinervação única (TT) nos três momentos de observação pós-operatórios, mas semelhantes entre si (Tabela 3).

Tabela 3 – Índice de Função Tibial (IFT): comparação par a par entre os grupos experimentais nos três momentos pós-operatórios de observação

	IFT 4 sem	IFT 8 sem	IFT 12 sem
C x S	< 0,001	< 0,001	< 0,001
C x TT	< 0,001	< 0,001	0,060
C x TL	0,001	0,072	0,001
C x TTC	0,034	0,288	0,034
S x TT	0,762	< 0,001	0,001
S x TL	0,001	< 0,001	< 0,001
S x TTC	0,003	< 0,001	< 0,001
TT x TL	0,002	< 0,001	0,001
TT x TTC	0,005	0,002	0,003
TL x TTC	0,650	0,762	0,364

Diferenças significativas representadas por Alfa de Bonferroni $\leq 0,005116$

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

Em todos os grupos, o IFT foi significativamente menor na 4ª semana, comparando-se com o período pré-operatório, indicando a queda na função da pata traseira direita dos ratos após a cirurgia.

Os grupos C e S apresentaram IFT significativamente menor nas semanas 4, 8 e 12 do período pós-operatório, comparando-se ao pré-operatório, mas semelhantes entre os momentos de observação pós-operatórios.

No grupo de reinervação única (TT), a função tibial caiu na 4ª semana do período pós-operatório, mas houve recuperação significativa na 8ª semana, mantendo-se semelhante na 12ª semana do pós-operatório. Porém ainda significativamente menor do que no período pré-operatório.

Já nos grupos de dupla reinervação (TL e TTC), houve queda da função tibial na 4ª semana pós-operatória, mas seguida de aumento significativo do IFT na 8ª semana, mantendo-se semelhante na 12ª semana do período pós-operatório. Nesses momentos de avaliações, os valores de IFT dos grupos de dupla reinervação revelaram semelhança em relação ao período pré-operatório (Tabela 4).

Tabela 4 – Índice de Função Tibial (IFT): comparação par a par entre os três momentos pós-operatórios de observação de cada grupo de rato

	C	S	TT	TL	TTC
IFT 4 sem - IFT Pré op	0,008	0,005	0,005	0,005	0,005
IFT 8 sem - IFT Pré op	0,008	0,005	0,005	0,013	0,203
IFT 12 sem - IFT Pré op	0,008	0,005	0,005	0,013	0,017
IFT 8 sem – IFT 4 sem	0,173	0,878	0,005	0,005	0,005
IFT 12 sem - IFT 4 sem	0,011	0,878	0,005	0,005	0,005
IFT 12 sem - IFT 8 sem	0,051	0,919	0,285	0,386	0,333

Diferenças significativas representadas por Alfa de Bonferroni $\leq 0,008512$

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

Os Gráficos 2 e 3 ilustram as análises estatísticas dos resultados do índice de função do nervo tibial dos cinco grupos experimentais, nos quatro momentos observados.

Gráfico 2 – Gráfico box plot do Índice de Função Tibial (IFT) dos cinco grupos experimentais nos diferentes momentos de avaliação

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

Gráfico 3 – Gráfico do Índice de Função Tibial (IFT) dos cinco grupos experimentais nos diferentes momentos de avaliação, onde as medianas dos valores foram representadas por linhas coloridas

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

A Figura 26 mostra as pegadas das patas traseiras direitas dos ratos dos cinco grupos do estudo com 12 semanas de pós-operatório e uma pegada pré-operatória normal.

FONTE: Fotos do próprio autor.

Figura 26 – Pegadas da pata traseira direita dos ratos, uma de cada grupo experimental, com 12 semanas de pós-operatório; e uma pegada pré-operatória normal

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

5.2.2 Avaliação Fisiológica: Eletromiografia (EMG)

No gráfico 4, são apresentadas as médias e desvios-padrões dos valores das amplitudes dos potenciais de ação muscular compostos encontrados nas eletromiografias dos músculos gastrocnêmios dos cinco grupos experimentais. As amplitudes estão expressas em microvolts (μV).

Gráfico 4 – Amplitude do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio na 12^a semana do período pós-operatório, medida em microvolts (μV)

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

Como foram encontradas diferenças entre as amplitudes, os grupos foram comparados par a par. O grupo S apresentou amplitude significativamente menor do que a dos demais grupos. O grupo TTC apresentou valores de amplitude com tendência a serem superiores aos do grupo TT (Tabela 5).

Tabela 5 – Amplitude do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio: comparação par a par entre os grupos

Par de Grupos	Alfa de Bonferroni
C x S	< 0,001
C x TT	0,050
C x TL	0,683
C x TTC	0,270
S x TT	< 0,001
S x TL	< 0,001
S x TTC	< 0,001
TT x TL	0,059
TT x TTC	0,006
TL x TTC	0,151

Diferenças significativas representadas por Alfa de Bonferroni $\leq 0,005116$

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

No gráfico 5, são apresentadas as médias e desvios-padrões dos valores das latências dos potenciais de ação muscular compostos encontrados nas eletromiografias dos músculos gastrocnêmios dos cinco grupos experimentais. As latências estão expressas em milissegundos (ms).

Gráfico 5 – Latência do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio na 12^a semana do período pós-operatório, medida em milissegundos (ms)

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

Como foram encontradas diferenças entre as latências, os grupos foram comparados par a par. O grupo S apresentou latência com tendência a ser maior que a dos demais grupos. O grupo TTC apresentou latência com tendência a ser maior que a do grupo TT (Tabela 6).

Tabela 6 – Latência do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio: comparação par a par entre os grupos

Par de Grupos	Alfa de Bonferroni
C x S	0,009
C x TT	0,774
C x TL	0,288
C x TTC	0,086
S x TT	0,010
S x TL	0,012
S x TTC	0,015
TT x TL	0,130
TT x TTC	0,041
TL x TTC	0,449

Diferenças significativas representadas por Alfa de Bonferroni $\leq 0,005116$

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

5.3 Resultados das Avaliações II (Anatômica e Histológica)

5.3.1 Avaliação Anatômica: Peso do Músculo Gastrocnêmio

O gráfico 6 representa o índice de peso do músculo gastrocnêmio dos cinco grupos experimentais, expresso em porcentagem.

Gráfico 6 – Índice de Peso do Músculo Gastrocnêmio dos cinco grupos experimentais

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

Como foram encontradas diferenças entre os índices, os grupos foram comparados par a par. O grupo C apresentou maior índice de peso do músculo gastrocnêmio, enquanto o grupo S revelou o menor índice. Não houve diferença entre os grupos de reinervação única e dupla com relação ao peso do músculo gastrocnêmio (Tabela 7).

Tabela 7 – Índice de Peso do Músculo Gastrocnêmio: comparação par a par entre os grupos

Par de Grupos	Alfa de Bonferroni
C x S	< 0,001
C x TT	< 0,001
C x TL	< 0001
C x TTC	< 0,001
S x TT	< 0,001
S x TL	< 0,001
S x TTC	< 0,001
TT x TL	> 0,999
TT x TTC	0,940
TL x TTC	0,705

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

A Figura 27 ilustra o músculo gastrocnêmio dissecado da pata operada dos cinco grupos deste estudo.

FONTE: Fotos do próprio autor.

Figura 27 – Músculo Gastrocnêmio da pata traseira direita de rato, com 12 semanas de pós-operatório, de cada um dos cinco grupos

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

5.3.2 Avaliação Histológica Quantitativa

O gráfico 7 representa a densidade axonal no nervo tibial distal às neurorrafias dos cinco grupos experimentais, expressa pelo número de axônios por 10.711 micrômetros quadrados (μm^2).

Gráfico 7 – Densidade axonal média do nervo tibial

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

Como foram encontradas diferenças nas densidades axonais, os grupos foram comparados par a par. O grupo TTC revelou densidade axonal média estatisticamente maior do que a dos grupos TT e TL (Tabela 8).

Tabela 8 – Densidade axonal do nervo tibial: comparação par a par entre os grupos

Par de Grupos	Alfa de Bonferroni
C x S	< 0,001
C x TT	0,006
C x TL	0,006
C x TTC	0,037
S x TT	< 0,001
S x TL	< 0,001
S x TTC	< 0,001
TT x TL	0,241
TT x TTC	0,001
TL x TTC	0,002

Diferenças significativas representadas por Alfa de Bonferroni $\leq 0,005116$

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

5.3.3 Avaliação Histológica Qualitativa

A arquitetura geral do nervo tibial foi avaliada através de análise histológica qualitativa. Observou-se que os segmentos do nervo tibial dos ratos dos grupos C, TT, TL e TTC eram mais regulares no seu contorno externo do que no grupo S.

Nos grupos C, S e TT, os nervos eram monofasciculados. Nos grupos TL e TTC, a grande maioria dos nervos era monofasciculada, sendo alguns bifasciculados. A formação de tecido conjuntivo mostrou-se mais exuberante nos animais do grupo S. A distribuição de axônios remielinizados no estroma do nervo deu-se de forma mais homogênea no grupo TT. O escape de fibras nervosas foi mais intenso nos grupos TT e TTC.

Na observação microscópica das lâminas do nervo tibial, o grupo C apresentou fascículo único e delimitado por epineuro e perineuro, grande quantidade de axônios mielinizados, com diâmetros similares e distribuídos de forma homogênea.

O grupo S revelou nervo com estrutura distorcida e atrófica, com grande quantidade de tecido conectivo em seu interior, e sem sinais evidentes de regeneração axonal.

O grupo TT revelou epineuro espessado, com reação tecidual a sua volta e pouco escape axonal. Internamente, o nervo apresentou grande quantidade de axônios remielinizados, com diâmetros razoavelmente regulares e distribuídos de forma homogênea.

O grupo TL revelou reação tecidual epineural e escape axonal moderado.

No grupo TTC, o nervo tibial apresentava-se delimitado por epineuro e perineuro com intensa reação tecidual a sua volta e exuberante escape de fibras regeneradas para fora dos limites do epineuro.

Internamente, tanto no grupo TL como no TTC, o nervo tibial apresentou grande quantidade de axônios remielinizados, com diâmetros diferentes e distribuídos de forma heterogênea (Figura 28).

FONTE: Fotos do próprio autor.

Figura 28 – Cortes histológicos do nervo tibial distal de cada grupo experimental com 12 semanas de pós-operatório, sob magnificação de 25X, 200X e 400X. Fotomicrografias com coloração Azul de Toluidina. Nos grupos de reinervação simples (TT) e dupla (TL e TTC), é possível visualizar escape axonal na magnificação de 25X e axônios mielinizados em regeneração na magnificação de 200X e 400X.

Onde:

C: Controle;

S: Nervo Tibial Seccionado;

TT: Neurorrafia Término-Terminal;

TL: Neurorrafia Primária associada à Término-Lateral;

TTC: Neurorrafia Término-Terminal Convergente.

6 Discussão

Estudos sobre reparo do nervo periférico são particularmente relevantes devido à elevada incidência de lesões nervosas por vários motivos, sendo trauma e cirurgia oncológica os mais prevalentes (Houdek e Shin, 2015). Entretanto, apesar da conhecida capacidade de regeneração do sistema nervoso periférico, o resultado clínico após a lesão e reparo nervoso é, geralmente, insatisfatório, e a recuperação funcional é quase sempre incompleta (Gordon, 2016).

A recuperação motora limitada se deve, em parte, à dispersão axonal (de Ruitter *et al.*, 2008) e ao reduzido número de fibras nervosas que atingem, com sucesso, suas respectivas placas neuromusculares (Carlson, 2014). Como o músculo denervado é capaz de recuperar sua função por meio de estímulo oriundo tanto do nervo ortotópico como do nervo heterotópico (Snyder-Warwick *et al.*, 2015), a associação de nervos distintos vem sendo pesquisada com intuito de aumentar a recuperação funcional.

Estudos experimentais em ratos demonstraram que a reinervação muscular por duas fontes diferentes pode aumentar o aporte de axônios para o músculo alvo (Fujiwara *et al.*, 2007; Furukawa *et al.*, 2008). Clinicamente, esse mesmo conceito já foi aplicado no tratamento de lesões do plexo braquial (Ladak e Spinner; 2013), e da face paralisada (Biglioli *et al.*, 2012b).

O presente estudo foi desenhado com base no cenário da paralisia facial de longa duração, no qual a reanimação do sorriso paralisado pode ser alcançada por meio da reconstrução em dois tempos (Biglioli *et al.*, 2012b). No primeiro, realiza-se enxerto transfacial de nervo sural com neurorrafia término-terminal em ramo do nervo facial do lado não paralisado para o lado paralisado (O'Brien *et al.*, 1980; Vedung *et al.*, 1984). No segundo tempo,

realiza-se transferência livre de segmento do músculo grácil (Harii *et al.*, 1979), recém denervado, com duas fontes distintas de axônios motores disponíveis: o nervo massetérico ipsilateral, visando ao sorriso voluntário; e o nervo facial contralateral, o único capaz de gerar sorriso espontâneo.

Embora o conceito da sinalização neural aumentada encontre aplicação na prática clínica, ainda não há consenso sobre qual a melhor técnica capaz de produzir dupla reinervação de músculos denervados (Biglioli *et al.*, 2012b; Sforza *et al.*, 2015).

Este estudo propôs avaliar duas técnicas de reinervação do músculo gastrocnêmio de ratos a partir de duas fontes nervosas distintas. A primeira técnica consistiu em combinar a neurografia primária término-terminal do nervo tibial com a neurografia término-lateral fibular-tibial distal à neurografia primária. Na segunda técnica, a qual convencionamos chamar de neurografia término-terminal convergente, os cotos proximais dos dois nervos, tibial e fibular, foram alinhados e suturados ao coto distal do nervo tibial (Figura 29).

FONTE: Ilustração de Hudson Calasans (Desenhista), baseada em fotos do próprio autor.

Figura 29 - Dupla reinervação muscular por meio da neurorrafia término-terminal associada com a transferência nervosa término-lateral (A). Dupla reinervação muscular por meio da neurorrafia término-terminal convergente (B).

Em centros de pesquisa sobre nervo periférico, é comum o uso de ratos como modelo experimental devido a vantagens como sua estrutura anatômica favorável, reduzido tamanho, baixo custo, facilidade de obtenção, manipulação e manutenção, o que facilita estudos de longa duração (Toia *et al.*, 2015; Gordon e Borschel, 2017).

O modelo experimental pré-clínico mais usado nesse contexto é representado pela lesão do nervo ciático em ratos (Geuna, 2015), devido à facilidade de avaliação histológica, eletromiográfica, muscular e funcional pelo *walking track* (Bain *et al.*, 1989; Wood *et al.*, 2011), apesar de que o nervo tibial e o nervo fibular, por serem nervos predominantemente motores e innervarem grupos musculares distintos, têm sido utilizados em estudos experimentais sobre transferência nervosa (Kemp *et al.*, 2010) e dupla inervação muscular (Stipp-Brambilla *et al.*, 2012).

O uso de modelos animais é inevitável para o teste pré-clínico final de novas estratégias para melhorar o reparo e regeneração do nervo periférico (Geuna *et al.*, 2016). Porém, em estudo biomédico, é necessário limitar, sempre que possível, o número de animais, respeitando os princípios da substituição, redução e refinamento (Tannenbaum e Bennett, 2015).

Nos experimentos com modelos animais, cuja variabilidade é muito pequena, geralmente, amostra de aproximadamente oito animais por grupo costuma apresentar significância estatística e atender aos ideais da bioética (Puopolo, 2004). Estudos experimentais prévios com ratos da linhagem Wistar, separados em grupos de oito a dez animais por grupo, mostraram resultados com distribuição simétrica, próximos à média e com pouca variação do desvio-padrão, comprovando significância estatística (Scheibe, 2008).

Portanto, neste estudo, foram utilizados 50 ratos, divididos em cinco grupos, contendo 10 animais cada. Realizou-se sorteio para determinar a qual grupo o animal pertenceria, evitando-se, assim, a tendenciosidade (Berkuo *et al.*, 1981).

Neste estudo experimental, todos os ratos foram submetidos à transecção de seus nervos fibulares, que se tornaram fonte extra de axônios motores nos grupos de dupla reinervação. O grupo controle (grupo C) e o grupo controle do nervo tibial seccionado (grupo S) foram criados para melhor avaliação dos resultados. Havia três grupos experimentais: um representando a reinervação única (grupo TT), e dois representando a reinervação dupla com diferentes técnicas (grupos TL e TTC).

O reparo primário por meio de neurografia término-terminal é o tratamento padrão ouro para secção do nervo periférico (Haninec *et al.*, 2007; Fagotti *et al.*, 2015) e foi representado pelo grupo TT neste estudo. A transferência nervosa por meio da neurografia término-lateral reversa, que foi ilustrada aqui pelo grupo TL, pode adicionar axônios ao nervo em regeneração, porém o direcionamento impróprio dos axônios em regeneração pode limitar a reinervação muscular (Fujiwara *et al.*, 2007; Isaacs *et al.*, 2008). Com intuito de aproveitar a vantagem do aporte axonal extra, proveniente da associação entre duas fontes nervosas distintas, e reduzir a má orientação das fibras, foi proposta a neurografia término-terminal convergente (grupo TTC).

Outros autores descreveram diferentes técnicas para reparo do nervo periférico no início do século XX (Naff e Ecklund; 2001), mas a proposta nesta tese parece ser a primeira a descrever a associação de dois cotos proximais de nervos motores combinados de maneira convergente ao mesmo coto distal em local de coaptação único.

A ideia desta nova técnica é que a neurografia término-terminal convergente pode orientar o crescimento das fibras nervosas em regeneração para o interior dos túbulos endoneurais de maneira mais adequada do que a

transferência nervosa término-lateral, propiciando aumento da recuperação da função motora.

O embasamento da técnica aqui apresentada veio do conceito de que quanto maior o número de fibras nervosas em regeneração que entram nos túbulos endoneurais, em direção ao músculo alvo, maior será a possibilidade de sucesso na conexão com as placas neuromusculares (Yu *et al.*, 2015). Sendo assim, a orientação inicial correta dos axônios em crescimento é importante para a recuperação da função muscular.

A avaliação funcional, neste experimento, foi realizada por meio da análise da marcha. Este teste tem sido utilizado para descrever *déficit* funcional da pata traseira do rato em estudos experimentais desde a década de 80 (de Medinaceli *et al.*, 1982). Através da 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 índice de função do nervo tibial (Bain *et al.*, 1989).

Neste estudo, como o nervo fibular foi seccionado em todos os ratos, os animais do grupo controle obviamente, apresentaram pegadas diferentes daquelas dos ratos sem lesão nervosa alguma. Entretanto os grupos de dupla reinervação muscular mostraram resultados funcionais superiores até mesmo aos do próprio grupo controle. Isso aconteceu, provavelmente, porque alguns axônios em regeneração voltaram a reinervar, não apenas o músculo gastrocnêmio, mas também os músculos do compartimento fibular. Essa interferência na dinâmica da marcha do rato, devido à dispersão e ao mau direcionamento axonal, já foi demonstrada em estudo experimental sobre regeneração do nervo periférico (Sabatier *et al.*, 2011).

No teste da marcha, observou-se que houve recuperação mais rápida e vigorosa do índice de função tibial em ambos os grupos de dupla reinervação quando comparados ao grupo de reinervação muscular por um único nervo. Em estudo experimental semelhante, Farber e colaboradores atribuíram ao aporte extra de axônios e aos fatores neurotróficos a melhor recuperação muscular após a coaptação nervosa témino-lateral (Farber *et al.*, 2013).

A associação de nervos com funções antagônicas poderia comprometer o funcionamento muscular, num momento inicial (Rodriguez *et al.*, 2011). Porém, com o passar do tempo, a adaptação cortical e plasticidade cerebral superam essa barreira (Socolovsky *et al.*, 2017), melhorando a recuperação funcional do músculo alvo reinervado por fontes nervosas distintas.

O número de axônios em regeneração, que fazem conexão com as placas neuromusculares, é fator determinante para a reinervação muscular (Jung *et al.*, 2009). Por isso, estimar a densidade axonal do coto distal do nervo, após técnica de reparo cirúrgico, é fundamental.

O momento ideal para realizar biópsia nervosa é crítico na avaliação de estudos sobre regeneração nervosa. Segundo Mackinnon (1991), ao final de 12 semanas, o nervo periférico em regeneração já reinervou sua respectiva unidade motora, os brotamentos axonais que não fizeram conexão muscular já foram eliminados, e a contagem axonal atinge seu máximo (Mackinnon *et al.*, 1991). Com base nisso, o presente estudo teve duração de 12 semanas.

Os brotos neurais que conseguem reinervar o órgão alvo e, consequentemente, voltam a conduzir impulsos nervosos vão recebendo camadas de mielina depositadas pelas células de Schwann e, gradativamente, vão aumentando e restaurando o diâmetro das fibras (Lundborg, 1987). Porém

ocorre grande variação na espessura das bainhas de mielinas dos axônios em regeneração, portanto a estimativa do diâmetro das fibras pode levar a erros na interpretação dos resultados (Geuna *et al.*, 2004).

A escolha de campo aleatório para contagem axonal é método mais efetivo e facilmente reproduzível (Canan *et al.*, 2008). Existem outros métodos de análise com auxílio de programa de computador, como a contagem axonal semiautomatizada, mas tais métodos podem gerar erros, como a interpretação de fibras próximas como apenas uma única fibra (Hunter *et al.*, 2007).

A marcação retrógrada é cara e trabalhosa, já que são necessários anticorpos marcadores específicos. Além disso, a análise pode gerar falsos positivos pelas equívocas cotagens de vasos sanguíneos corados pelos marcadores, ou de partículas do próprio corante (Prodanov e Feirabend, 2008).

Portanto, neste estudo, optou-se pela contagem axonal manual por campo aleatório, sem realizar avaliação da espessura da bainha de mielina ou marcação retrógrada.

A densidade axonal do nervo tibial nos animais do grupo da neurografia término-terminal convergente, deste estudo, foi cerca de 40% maior que aquela observada nos animais submetidos à dupla reinervação por meio da neurografia primária associada à neurografia término-lateral. Supõe-se que a coaptação alinhada dos cotos nervosos proximais com o coto nervoso distal na direção do músculo alvo foi capaz de reduzir o crescimento retrógrado de fibras.

Em estudos experimentais prévios, já foi demonstrado que axônios em regeneração crescem preferencialmente no sentido dos túbulos endoneurais do coto distal do nervo (Mackinnon *et al.*, 1986) e sofrem atração

sinérgica se orientados no sentido do músculo alvo distal (Tos *et al.*, 2000). Porém Eren e colaboradores mostraram que até mesmo as fibras nervosas que seguem na superfície do epineuro podem, também, produzir reinervação funcional (Eren *et al.*, 2005).

A análise histológica deste estudo foi considerada a partir das fibras internas ao epineuro, onde observou-se grande quantidade de axônios remielinizados com diâmetros diferentes e distribuídos de forma heterogênea. Embora o escape de axônios em regeneração, por fora dos túbulos endoneurais, tenha sido observado em ambos os grupos de dupla reinervação, ele foi mais acentuado no grupo da neurografia convergente.

Também já foi demonstrado, que na neurografia término-lateral, após os axônios adentrarem a lateral do nervo receptor, eles seguem tanto no sentido anterógrado, como no retrógrado (Isaacs *et al.*, 2008). Esse congestionamento de fibras nervosas foi a causa provável da redução da quantidade total de axônios que seguiram no sentido do músculo alvo no grupo TL.

Com relação à avaliação eletrofisiológica, a amplitude representa o número de fibras musculares que respondem ao estímulo elétrico, e a latência é o tempo decorrido entre a aplicação do estímulo nervoso e o início da resposta do potencial de ação muscular composto, medindo, principalmente, a condução dos axônios mielinizados, que são fibras de condução rápida (Robinson, Snyder-Mackler, 2001).

O grupo S apresentou latência maior que os demais grupos, como já era esperado, uma vez que nesse grupo houve denervação dos músculos inervados pelo nervo tibial sem recuperação, o que foi traduzido pela ausência de resposta frente ao estímulo. A latência do grupo TTC revelou tendência de

ser maior do que a do grupo TT, talvez pelo fato de haver maior número de axônios em regeneração com bainhas de mielina ainda não completamente amadurecidas, devido ao maior escape axonal presente no grupo de dupla reinervação.

Segundo Robinson, a determinação da amplitude é fundamental para a quantificação do número de fibras musculares efetivamente reinervadas (Robinson, 2015). Neste trabalho, a eletromiografia revelou maior amplitude no grupo da dupla reinervação pela neurografia convergente do que no grupo da reinervação única, possivelmente pela regeneração do maior número de axônios mielinizados no grupo TTC e, conseqüentemente, reinervação de maior número de fibras musculares.

O peso do músculo gastrocnêmio (MG) 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). Nos trabalhos experimentais mais recentes, é utilizado o índice de peso do MG, que é a relação entre o peso do lado operado e do lado não operado (Wu *et al.*, 2014), pois, dessa maneira, exclui-se viés de possíveis diferenças entre as massas corporais dos ratos.

O grupo controle apresentou índice de peso do MG significativamente maior do que o dos demais grupos, já que nele o nervo tibial preenchido com seus axônios nativos e junções neuromusculares mantiveram-se íntegros do início ao final do experimento. Por outro lado, o índice de peso muscular do grupo com nervo tibial seccionado foi estatisticamente menor que o dos grupos restantes, pois esse grupo sofreu denervação crônica que culminou com atrofia do músculo gastrocnêmio do lado operado.

O índice de peso do MG foi semelhante entre os grupos de reinervação dupla (TL e TTC) e o grupo de reinervação única (TT). Esse achado pode ser explicado pela *bottle-neck theory*, na qual axônios em regeneração, na razão de 20% do número original de fibras, são capazes de reinervar até cinco vezes mais fibras musculares (Urso-Baiarada *et al.*, 2007). Esta capacidade de compensação da unidade motora justifica os resultados semelhantes na avaliação do trofismo muscular, independentemente da técnica utilizada para reinervação.

Assim como Isaacs, nós não identificamos a origem exata dos axônios que obtiveram sucesso na reinervação motora (Isaacs *et al.*, 2008). Entretanto Faber e colaboradores determinaram a fonte dessas fibras nervosas usando ratos transgênicos da linhagem Sprague-Dawley que expressavam proteína fluorescente verde (Thy-1) em seu tecido neural, e rastrearam essas fibras por meio de marcação retrógrada. Os autores comprovaram que os axônios, tanto do nervo tibial como do fibular, reinervaram o mesmo músculo alvo após a associação da neurorrafia término-terminal com a neurorrafia término-lateral, no modelo de dupla reinervação chamado de *supercharge nerve transfer* (Faber *et al.*, 2013).

O ambiente ideal para que ocorra a dupla reinervação muscular requer fontes doadoras de axônios motores agonistas em regeneração, coto distal do nervo lesionado que tenha passado por degeneração Walleriana e músculo alvo que tenha sofrido episódio de denervação recente (Wu *et al.*, 2014).

O nervo intacto, com seus axônios nativos e junção neuromuscular íntegra, não se beneficia do aporte extra de axônios, pois o ambiente é impróprio para o crescimento de novos axônios em regeneração, como no caso

da neurorrafia término-lateral sem janela epineural em nervo receptor sem lesão (Stipp-Brambilla *et al.*, 2012).

As duas técnicas estudadas nesta tese foram capazes de produzir dupla reinervação muscular, havendo franca superioridade dos resultados histológicos da neurorrafia convergente. Na prática clínica, no entanto, não é incomum discrepância significativa dos cotos nervosos, fato que dificultaria ou até mesmo impossibilitaria a execução técnica adequada da neurorrafia convergente. A coaptação imprópria dos cotos nervosos propicia a dispersão e o mau direcionamento dos axônios em regeneração e compromete a reinervação muscular (de Ruiter *et al.*, 2014).

A utilização do conduto sintético de fibrina (Kalbermatten *et al.*, 2009; Longo *et al.*, 2016), na forma de funil, pode constituir-se numa alternativa nos casos onde o calibre somado dos dois cotos nervosos proximais excede demasiadamente o calibre do coto nervoso distal. Pesquisas adicionais sobre o assunto são necessárias.

A paralisia facial é tema frequente em estudos de regeneração nervosa (Faria *et al.*, 2007), principalmente, porque o fator número de fibras nervosas, associado ao fator qualidade das fibras nervosas que retornam adequadamente às placas motoras, influencia diretamente no prognóstico dinâmico da deformidade facial (Faria *et al.*, 2010).

O tratamento da paralisia facial de longa duração representa um desafio para o cirurgião reconstrutivo. O transplante microvascular de retalho do músculo grácil reinervado por enxerto transfacial do nervo facial contralateral oferece movimentos espontâneos à face (Ferreira e Faria, 2002). A reinervação do retalho do músculo grácil por meio da coaptação do nervo

massetérico ao nervo obturador revelou resultados uniformes e previsíveis, gerando sorriso voluntário (Faria *et al.*, 2007). Essa técnica mostrou-se eficaz tanto para reinervação da nova unidade motora transplantada, nos casos de paralisia facial de longa duração, como para reinervação dos músculos da mímica facial paralisados há menos de 18 meses, seja ela de caráter temporário, seja ela permanente (Faria *et al.*, 2010). Ainda assim, a obtenção concomitante de sorriso voluntário e espontâneo continua alvo de pesquisa.

No tratamento da paralisia facial, o maior aporte axonal, proveniente de fontes nervosas distintas, já se mostrou benéfico tanto na reinervação dos músculos da mímica facial com paralisia recente (Terzis, 1990), como na reinervação de nova unidade muscular por meio do conceito *babysitter* (Terzis *et al.*, 2009a).

Em 2012, foram relatados quatro casos de paralisia facial de longa duração tratados através da transferência de retalho do músculo grácil duplamente reinervado. O nervo obturador foi coaptado ao nervo massetérico por neurorrafia término-terminal, seguido por neurorrafia término-lateral do enxerto transfacial do nervo facial contralateral ao nervo obturador distal à neurorrafia término-terminal. Foi possível observar boa contração do retalho muscular tanto frente a estímulos voluntários como a espontâneos com 3,8 e 7,2 meses, respectivamente (Biglioli *et al.*, 2012b).

Em 2014, foram relatados nove casos de paralisia facial de longa duração tratados através da transferência de retalho do músculo grácil duplamente reinervado em dois tempos. No primeiro momento, foi realizado o enxerto transfacial do nervo facial contralateral e, no segundo momento, procedeu-se com o transplante de retalho do músculo grácil reinervado tanto pelo

nervo facial contralateral como pelo nervo massetérico ipsilateral. Os resultados mostraram que todos pacientes recuperaram sorriso voluntário e espontâneo com recrutamento de 70% da unidade motora (Cardenas-Mejia *et al.*, 2015).

O nervo facial é o único capaz de garantir movimentos espontâneos à face, e contém cerca de 6.200 axônios (Kondo *et al.*, 2012), dos quais aproximadamente 1.600 alcançam o coto distal do enxerto transfacial de nervo. O nervo massetérico, potente fonte doadora de axônios motores, contém por volta de 5.200 axônios (Snyder-Warwick *et al.*, 2015). A maneira ideal de se combinarem essas duas fontes nervosas, levando à reinervação muscular precoce e mais efetiva, ainda não foi determinada em estudos clínicos nem experimentais (Furukawa *et al.*, 2008; Biglioli *et al.*, 2012b; Mutsumi *et al.*, 2015).

A análise dos resultados deste estudo experimental sugere a superioridade da dupla reinervação muscular por meio da neurorrafia convergente quando comparada àquela produzida pela neurorrafia término-lateral.

7 Conclusões

Neste estudo experimental, ocorreu reinervação do músculo gastrocnêmio tanto no grupo de reinervação única (TT), como nos dois grupos de reinervação dupla (TL e TTC).

Ambos os grupos de dupla reinervação (TL e TTC) levaram à recuperação funcional do músculo gastrocnêmio de maneira mais precoce e efetiva, quando comparados com o grupo da reinervação única (TT).

A amplitude do potencial de ação muscular composto do grupo da neurorrafia término-terminal convergente foi maior do que a do grupo da neurorrafia término-terminal, mostrando que maior número de fibras musculares respondeu ao estímulo elétrico naquele grupo.

O grupo da neurorrafia término-terminal convergente apresentou densidade axonal estatisticamente maior do que a apresentada pelos grupos TT e TL.

8 Referências

Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol*. 2012;98(1):16-37.

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.

Balance CA, Balance HA, Stewart P. Remarks on the operative treatment of craniofacial palsy of peripheral origin. *Br Med J*. 1903;1(2209):1009-13.

Barton MJ, Morley JW, Stoodley MA, Lauto A, Mahns DA. Nerve repair: toward a sutureless approach. *Neurosurg Rev*. 2014;37(4):585-95.

Beirowski B, Adalbert R, Wagner D, Grumme DS, Addicks K, Ribchester RR, Coleman MP. The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (Wlds) nerves. *BMC Neurosci*. 2005;6(1):6.

Bercury KK, Macklin WB. Dynamics and mechanisms of CNS myelination. *Dev Cell*. 2015;32(4):447-58.

Berkuo ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. *Bioestatística*. 2. ed. São Paulo: EPU; 1981.

Bertelli JA, Taleb M, Mira JC, Ghizoni MF. Variation in nerve autograft length increases fibre misdirection and decreases pruning effectiveness: an experimental study in the rat median nerve. *Neurol Res*. 2005;27(6):657-65.

Bhama PK, Hadlock TA. Contemporary facial reanimation. *Facial Plast Surg*. 2014;30(2):145-51.

Bianchi B, Ferri A, Ferrari S, Copelli C, Salvagni L, Sesenna E. The masseteric nerve: a versatile power source in facial animation techniques. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014;52(3):264-9.

Biglioli F, Colombo V, Tarabbia F, Autelitano L, Rabbiosi D, Colletti G, Giovanditto F, Battista V, Frigerio A. Recovery of emotional smiling function in free-flap facial reanimation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012a;70(10):2413-8.

Biglioli F, Colombo V, Tarabbia F, Pedrazzoli M, Battista V, Giovanditto F, Dalla Toffola E, Lozza A, Frigerio A. Double innervation in free-flap surgery for long-standing facial paralysis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2012b;65(10):1343-9.

Biglioli F. Facial reanimations: part I - recent paralyses. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2015a;53(10):901-6.

Biglioli F. Facial reanimations: part II - long-standing paralyses. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2015b;53(10):907-12.

Bora FW Jr. A comparison of epineural, perineural and epiperineural methods of nerve suture. *Clin Orthop Relat Res*. 1978;(133):91-4.

Brasil. Presidência da República. Decreto nº 6.899 de 15 de Julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, estabelece normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais – CIUCA, mediante a regulamentação da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências.

Brasil. Presidência da República. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

Braun RM. Epineural nerve suture. *Clin Orthop*. 1982;163:50-6.

Brushart TM. Preferential motor reinnervation: a sequential double-labeling study. *Restor Neurol Neurosci*. 1990;1(3):281-7.

Canan S, Bozkurt HH, Acar M, Vlamings R, Aktas A, Sahin B, Temel Y, Kaplan S. An efficient stereological sampling approach for quantitative assessment of nerve regeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008;34(6):638-49.

Cardenas-Mejia A, Covarrubias-Ramirez JV, Bello-Margolis A, Rozen S. Double innervated free functional muscle transfer for facial reanimation. *J Plast Surg Hand Surg*. 2015;49(3):183-8.

Carlson BM. The biology of long-term denervated skeletal muscle. *Eur J Transl Myol*. 2014;24(1):3293.

Costa MP, Cunha AS, Silva CF, Barros TEP, Ferreira MC. Utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortop Bras*. 2006;14(1):25-9.

Cunha, AS. *Reconstrução de defeito de nervo fibular em ratos com veia glicerolada: análise histológica e funcional* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2013.

Dalla Toffola E, Pavese C, Cecini M, Petrucci L, Ricotti S, Bejor M, Salimbeni G, Biglioli F, Klersy C. Hypoglossal-facial nerve anastomosis and rehabilitation in patients with complete facial palsy: cohort study of 30 patients followed up for three years. *Funct Neurol*. 2014;29(3):183-7.

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 Luca AC, Lacour SP, Raffoul W, di Summa PG. Extracellular matrix components in peripheral nerve repair: how to affect neural cellular response and nerve regeneration? *Neural Regen Res*. 2014;9(22):1943-8.

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

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.

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

- Dellon AL, Ferreira MC, Williams EH, Rosson GD. Which end is up? Terminology for terminolateral (end-to-side) nerve repair: a review. *J Reconstr Microsurg*. 2010;26(5):295-301.
- Dobel C, Miltner WH, Witte OW, Volk GF, Guntinas-Lichius O. Emotional impact of facial palsy. *Laryngorhinootologie*. 2013;92(1):9-23.
- Ehrart EA, Ferreira MC, Marchese AT, Leao PP. Neurorrafias com técnica microcirúrgica permitem melhor reabilitação e podem evitar a degeneração walleriana. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 1975;33(3):193-9.
- Eren F, Yuksel F, Ulkur E, et al. Nerve regeneration through a healthy nerve trunk: a new and hopeful conduit for bridging nerve defects. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116(6):1697–1705.
- 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.
- Farber SJ, Glaus SW, Moore AM, Hunter DA, Mackinnon SE, Johnson PJ. Supercharge nerve transfer to enhance motor recovery: a laboratory study. *J Hand Surg Am*. 2013;38(3):466-77.
- Faria, JCM. *Estudo crítico do tratamento da paralisia facial com transplante do músculo grácil* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2002.
- Faria JCM, Scopel GP, Busnardo FF, Ferreira MC. Nerve sources for facial reanimation with muscle transplant in patients with unilateral facial palsy: clinical analysis of three techniques. *Ann Plast Surg*. 2007;59(1):87-91.
- Faria JCM, Scopel GP, Ferreira MC. Facial reanimation with masseteric nerve: babysitter or permanent procedure? Preliminary results. *Ann Plast Surg*. 2010;64(1):31-4.
- Faroni A, Mobasser SA, Kingham PJ, Reid AJ. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;82-83:160-7.

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

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

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

Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery.* 1998;18(7):397-405.

Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997;14(1-2):67-116.

Fujiwara T, Matsuda K, Kubo T, Tomita K, Hattori R, Masuoka T, Yano K, Hosokawa K. Axonal supercharging technique using reverse end-to-side neurorrhaphy in peripheral nerve repair: an experimental study in the rat model. *J Neurosurg.* 2007;107(4):821-9.

Furukawa H, Saito A, Mol W, Sekido M, Sasaki S, Yamamoto Y. Double innervation occurs in the facial mimetic muscles after facial-hypoglossal end-to-side neural repair: rat model for neural supercharge concept. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008;61(3):257-64.

Geuna S, Gigo-Benato D, Rodrigues Ade C. On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibres. *Microsurgery.* 2004;24(1):72-6.

Geuna S, Raimondo S, Ronchi G, di Scipio F, Tos P, Czaja K, Fornaro M. Chapter 3: Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:27-46.

Geuna S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *J Neurosci Methods.* 2015;243:39-46.

Geuna S, Raimondo S, Fregnan F, Haastert-Talini K, Grothe C. In vitro models for peripheral nerve regeneration. *Eur J Neurosci.* 2016;43(3):287-96.

Glenn TD, Talbot WS. Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury. *Curr Opin Neurobiol.* 2013;23(6):1041-8.

Gordon T, Yang JF, Ayer K, Stein RB, Tyreman N. Recovery potential of muscle after partial denervation: a comparison between rats and humans. *Brain Res Bull.* 1993;30(3-4):477-82.

Gordon T. Nerve Regeneration: understanding biology and its Influence on return of function after nerve transfers. *Hand Clin.* 2016;32(2):103-17.

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(Pt3):331-47.

Griffin JW, Hogan MV, Chhabra AB, Deal DN. Peripheral nerve repair and reconstruction. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(23):2144-51.

Hall S. Nerve repair: a neurobiologist's view. *J Hand Surg. [Br].* 2001;26:129-36.

Haninec P, Sámal F, Tomás R, Houstava L, Dubovský P. Direct repair (nerve grafting), neurotization, and end-to-side neurorrhaphy in the treatment of brachial plexus injury. *J Neurosurg.* 2007;106(3):391-9.

Harii K, Ohmori K, Torii S. Free gracilis muscle transplantation, with microvascular anastomoses for the treatment of facial paralysis. A preliminary report. *Plast Reconstr Surg.* 1976;57(2):133-43.

Harii K. Microvascular free muscle transplantation for reanimation of facial paralysis. *Clin Plast Surg.* 1979;6(3):361-75.

Hayashi A, Pannucci C, Moradzadeh A, Kawamura D, Magill C, Hunter DA, Tong AY, Parsanian A, Mackinnon SE, Myckatyn TM. Axotomy or compression is required for axonal sprouting following end-to-side neurorrhaphy. *Exp Neurol.* 2008;211(2):539-50.

Hennig R, Dietrichs E. Transient reinnervation of antagonistic muscles by the same motoneuron. *Exp Neurol.* 1994;130(2):331-6.

Hoffman PN. A conditioning lesion induces changes in gene expression and axonal transport that enhance regeneration by increasing the intrinsic growth state of axons. *Exp. Neurol.* 2010;223(1):11-8.

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

Hontanilla B, Marre D, Cabello A. Masseteric nerve for reanimation of the smile in short-term facial paralysis. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2014;52(2):118-23.

Houdek MT, Shin AY. Management and complications of traumatic peripheral nerve injuries. *Hand Clin.* 2015;31(2):151-63.

Hunter DA, Moradzadeh A, Whitlock EL, Brenner MJ, Myckatyn TM, Wei CH, Tung TH, Mackinnon SE. Binary imaging analysis for comprehensive quantitative histomorphometry of peripheral nerve. *J Neurosci Methods.* 2007;166(1):116-24.

Isaacs JE, Allen D, Chen LE, Nunley J 2nd. Reverse end-to-side neurotization. *J Reconstr Microsurg.* 2005;21(1):43-8; discussion 49-50.

Isaacs JE, Cheatham S, Gagnon EB, Razavi A, McDowell CL. Reverse end-to-side neurotization in a regenerating nerve. *J Reconstr Microsurg.* 2008;24(7):489-96.

Ito M, Kudo M. Reinnervation by axon collaterals from single facial motoneurons to multiple muscle targets following axotomy in the adult guinea pig. *Acta Anat (Basel).* 1994;151(2):124-30.

Jaeger MRO, Braga-Silva J, Gehlen D, Pereira-Filho Gde A, Zettler CG, de Souza MA, Veas JR, Sebben A. End-to-end versus end-to-side motor and sensory neurorrhaphy in the repair of the acute muscle denervation. *Ann Plast Surg.* 2011;67(4):391-6.

Jones S, Eisenberg HM, Jia X. Advances and future applications of augmented peripheral nerve regeneration. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9).Pii:E1494.

Jung JM, Chung MS, Kim MB, Baek GH. Contribution of the proximal nerve stump in end-to-side nerve repair: in a rat model. *Clin Orthop Surg*. 2009;1(2): 90–5.

Kalbermatten DF, Pettersson J, Kingham PJ, Pierer G, Wiberg M, Terenghi G. New fibrin conduit for peripheral nerve repair. *J Reconstr Microsurg*. 2009;25(1):27-33.

Kemp SW, Alant J, Walsh SK, Webb AA, Midha R. Behavioural and anatomical analysis of selective tibial nerve branch transfer to the deep peroneal nerve in the rat. *Eur J Neurosci*. 2010;31(6):1074-90.

Koeppen AH. Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J Neurol Sci*. 2004;220(1-2):115–7.

Kondo Y, Moriyama H, Hirai S, Qu N, Itoh M. The relationship between Bell's palsy and morphometric aspects of the facial nerve. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012;269(6):1691-5.

Körte W. Ein Fall von Nerven Pfropfung des Nervus facialis auf den Nervus hypoglossus. *Dtsch Med Wochenschr*. 1903;17:293-5.

Ladak A, Spinner RJ. Double fascicular nerve transfer for elbow flexion: is 2 better than 1? *Neurosurgery*. 2013;72(6):1055-56.

Lemos SPS, Hayashi I, Cunha AS, Silva CF, Filho TEPB, Costa MP, Ferreira MC. Glycerol-preserved allogeneous nerve: an experimental study with rats. *Acta Ortop Bras*. 2008; 16(3):133-7.

Lifchez SD, Means KR Jr, Dunn RE, Williams EH, Dellon AL. Intra- and inter-examiner variability in performing Tinel's test. *J Hand Surg Am*. 2010;35(2):212-6.

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. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand*. 1987;58(2):145-69.

Lutz BS, Ma SF, Chuang DC, Wei FC. Role of the target in end-to-side neurorrhaphy: reinnervation of a single muscle vs. multiple muscles. *J Reconstr Microsurg*. 2000;16(6):443-8.

Machado A, Haertel L. *Neuroanatomia funcional*. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2013.

Mackinnon SE, Dellon AL, Lundborg G, Hudson AR, Hunter DA. A study of neurotrophism in a primate model. *J Hand Surg Am*. 1986;11(6):888-94.

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.

Mackinnon SE, Novak CB, Myckatyn TM, Tung TH. Results of reinnervation of the biceps and brachialis muscles with a double fascicular transfer for elbow flexion. *J Hand Surg Am*. 2005;30(5):978-85.

Maggi SP, Lowe JB 3rd, Mackinnon SE. Pathophysiology of nerve injury. *Clin Plast Surg*. 2003;30(2):109-26.

Manktelow RT, Zuker RM. Muscle transplantation by fascicular territory. *Plast Reconstr Surg*. 1984;73(5):751-7.

Martins RS, Teodoro WR, Simplicio H, Capellozi VL, Siqueira MG, Yoshinari NH, Pereira JP, Teixeira MJ. Influence of suture on peripheral nerve regeneration and collagen production at the site of neurorrhaphy: an experimental study. *Neurosurgery*. 2011;68(3):765-72.

Meals RA, Nelissen RG. The origin and meaning of "neurotization". *J Hand Surg Am*. 1995;20(1):144-6.

Millesi H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve injuries. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1982;19:25-37.

Mutsumi O, Kentaro T, Noriko U, Satoshi U, Tsutomu H, Alisa O, Mayuko H, Hiroki M. One-stage dual latissimus dorsi muscle flap transfer with a pair of vascular anastomoses and double nerve suturing for long-standing facial paralysis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015;68(6):e113-9.

Naff NJ, Ecklund JM. History of peripheral nerve surgery techniques. *Neurosurg Clin N Am*. 2001;12(1):197-209.

Nepomuceno AN, Politani EL, Silva EG, Salomone R, Longo MVL, Salles AG, Faria JCM, Gemperli R. Tibial and fibular nerves evaluation using intraoperative electromyography in rats. *Acta Cir Bras*. 2016;31(8):542-8.

Normand EA, Rasband MN. Subcellular patterning: axonal domains with specialized structure and function. *Dev Cell*. 2015;32(4):459-68.

O'Brien BM, Franklin JD, Morrison WA. Cross-facial nerve grafts and microneurovascular free muscle transfer for long established facial palsy. *Br J Plast Surg*. 1980;33(2):202-15.

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

Placheta E, Wood MD, Lafontaine C, Liu EH, Hendry JM, Angelov DN, Frey M, Gordon T, Borschel GH. Enhancement of facial nerve motoneuron regeneration through cross-face nerve grafts by adding end-to-side sensory axons. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(2):460-71.

Prodanov D, Feirabend HK. Automated characterization of nerve fibers labeled fluorescently: determination of size, class and spatial distribution. *Brain Res*. 2008;1233:35-50.

Puopolo M. Biostatistical approaches to reducing the number of animals used in biomedical research. *Ann Ist Super Sanità*. 2004;40(2):157-63.

Robinson AJ, Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia clínica: eletroterapia e teste eletrofisiológico*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2001.

Robinson LR. How electrodiagnosis predicts clinical outcome of focal peripheral nerve lesions. *Muscle Nerve*. 2015;52(3):321-33.

Rodriguez A, Chuang DC, Chen KT, Chen RF, Lyu RK, Ko YS. Comparative study of single, double, and triple nerve transfer to a common target: experimental study of rat brachial plexus. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(3):1155-62.

- Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 6. ed. Belmont (CA): Thomson; 2006.
- Sabatier MJ, To BN, Nicolini J, English AW. Effect of axon misdirection on recovery of electromyographic activity and kinematics after peripheral nerve injury. *Cells Tissues Organs*. 2011;193(5):298-309.
- Salles GS Jr, Faria JC, Busnardo FF, Gemperli R, Ferreira MC. Evaluation of nerve regeneration in diabetic rats. *Acta Cir Bras*. 2013;28(7):509-17.
- Scaramella LF. The anastomosis between the two facial nerves. [Article in Italian] *Arch Ital Otol Rinol Laringol Patol Cervicofacciale*. 1971;82:209-15.
- Scaramella LF. Cross-face facial nerve anastomosis. Historical notes. *Ear Nose Throat J*. 1996;75(6):343-54.
- Scheibe PO. Number of samples-hypothesis testing. *Nucl Med Biol*. 2008;35:3-9.
- Schnaider TB, Souza C. Aspectos éticos da experimentação animal. *Rev Bras Anesthesiol*. 2003;53(2):278-85.
- Seddon HJ. A Classification of Nerve Injuries. *Br Med J*. 1942;2(4260):237-9.
- Seddon HJ, Medawar PB, Smith H. Rate of regeneration of peripheral nerves in man. *J Physiol*. 1943;102(2):191-215.
- Seddon HJ. Use of autogenous grafts for repair of large nerve gaps in peripheral nerves. *Br J Surg*. 1947;35:151-67.
- Sforza C, Frigerio A, Mapelli A, Tarabbia F, Annoni I, Colombo V, Latiff M, Pimenta Ferreira CL, Rabbiosi D, Sidequersky FV, Zago M, Biglioli F. Double-powered free gracilis muscle transfer for smile reanimation: A longitudinal optoelectronic study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015;68(7):930-9.
- Smith JW. Microsurgery of peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg*. 1964;33:317.

Smith JW. A new technique of facial animation. *In*: Hueston VT, ed. Transcripts of the Fifth International Congress of Plastic and Reconstructive Surgery. Melbourne, Australia: Butterworth; 1971:83–84.

Snyder-Warwick AK, Fattah AY, Zive L, Halliday W, Borschel GH, Zuker RM. The degree of facial movement following microvascular muscle transfer in pediatric facial reanimation depends on donor motor nerve axonal density. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(2):370e-81e.

Socolovsky M, Malessy M, Lopez D, Guedes F, Flores L. Current concepts in plasticity and nerve transfers: relationship between surgical techniques and outcomes. *Neurosurg Focus*. 2017;42(3):E13.

Spira M. Anastomosis of masseteric nerve to lower division of facial nerve for correction of lower facial paralysis. *Plast Reconstr Surg*. 1978;61(3):330-4.

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

Sulaiman W, Gordon T. Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application. *Ochsner J*. 2013;13(1):100-8.

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

Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve*. 1990;13(9):771-84.

Swanson AN, Wolfe SW, Khazzam M, Feinberg J, Ehteshami J, Doty S. Comparison of neurotization versus nerve repair in an animal model of chronically denervated muscle. *J Hand Surg Am*. 2008;33(7):1093-9.

Tamai S, Komatsu S, Sakamoto H, Sano S, Sasauchi H. Free muscle transplants in dogs, with microsurgical neurovascular anastomoses. *Plast Reconstr Surg*. 1970;46:219-25.

Tanaka T, Yoshida S. Mechanisms of remyelination: recent insight from experimental models. *Biomol Concepts*. 2014;5(4):289-98.

Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim*. 2015;54(2):120–32.

Terzis JK. "Babysitters." *An exciting new concept in facial reanimation*. In: Proceedings of the 6th International Symposium on the facial nerve. Rio de Janeiro, Brazil: Kugler and Ghendini Publications; 1990.

Terzis JK, Sun DD, Thanos PK. Historical and basic science review: past, present, and future of nerve repair. *J Reconstr Microsurg*. 1997;13(3):215-25.

Terzis JK, Tzafetta K. "Babysitter" procedure with concomitant muscle transfer in facial paralysis. *Plast Reconstr Surg*. 2009a;124(4):1142-56.

Terzis JK, Wang W, Zhao Y. Effect of axonal load on the functional and aesthetic outcomes of the cross-facial nerve graft procedure for facial reanimation. *Plast Reconstr Surg*. 2009b;124(5):1499-512.

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

Tomita K, Hosokawa K, Yano K. Reanimation of reversible facial paralysis by the double innervation technique using an intraneural-dissected sural nerve graft. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63(6):e535-9.

Tos P, Battiston B, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG, Hill MA, Lanzetta M, Owen ER. Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts. *Microsurgery*. 2000;20(2):65-71.

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

Tung TH. Nerve transfers. *Clin Plast Surg*. 2014;41(3):551-9.

Urso-Baiarada FG, MacQuillan AH, Grobbelaar AO. The bottle-neck theory: accounting for clinical and experimental variability in the outcome of functional muscle transfer. *Plast Reconstr Surg*. 2007;119(3):1129-31.

Valls-Solé J. Facial nerve palsy and hemifacial spasm. *Handb Clin Neurol*. 2013;115:367-80.

Van de Graaf RC, Ijpma FF, Nicolai JP. Sir Charles Alfred Ballance (1856-1936) and the introduction of facial nerve crossover anastomosis in 1895. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2009;62(1):43-9.

Vedung S, Hakelius L, Stålberg E. Cross-face nerve grafting followed by free muscle transplantation in young patients with long-standing facial paralysis. Reanimation of the cheek and the angle of the mouth. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1984;18(2):201-8.

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

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

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

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

Wu P, Chawla A, Spinner RJ, Yu C, Yaszemski MJ, Windebank AJ, Wang H. Key changes in denervated muscles and their impact on regeneration and reinnervation. *Neural Regen Res*. 2014;9(20):1796-809.

Yamamoto Y, Sekido M, Furukawa H, Oyama A, Tsutsumida A, Sasaki S. Surgical rehabilitation of reversible facial palsy: facial-hypoglossal network system based on neural signal augmentation/neural supercharge concept. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2007;60(3):223-31.

Yan YH, Yan JG, Sanger JR, Zhang LL, Riley DA, Matloub HS. Nerve repair at different angles of attachment: experiment in rats. *J Reconstr Microsurg.* 2002;18(8):703-8.

Yu Y, Zhang P, Yin X, et al. Specificity of motor axon regeneration: a comparison of recovery following biodegradable conduit small gap tubulization and epineurial neurorrhaphy. *Am J Transl Res.* 2015;7(1):53-65.

Zuker RM, Manktelow RT. A smile for the Möbius' syndrome patient. *Ann Plast Surg.* 1989;22(3):188-94.

Zuker RM, Manktelow RT. Functioning free muscle transfers. *Hand Clin.* 2007;23(1):57-72.

Zumiotti AV, Ferreira MC, Azze RJ, Mattar JR. Estudo sobre a influência da sutura distal em enxertos longos de nervo com emprego de técnica microcirúrgica. *Rev Bras Ortop.* 1988;23(8):231-4.

Apêndice

7 – ORIGINAL ARTICLE MODELS, BIOLOGICAL

Tibial and fibular nerves evaluation using intraoperative electromyography in rats¹

André Coelho Nepomuceno^d, Elisa Landucci Politaniⁱⁱ, Eduardo Guandelini da Silvaⁱ, Raquel Salomoneⁱⁱ, Marco Vinicius Losso Longo^v, Alessandra Grassi Salles^v, José Carlos Marques de Faria^{vi}, Rolf Gemperli^{vii}

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020160080000007>

ⁱMD, Plastic Surgeon, Fellow PhD degree, General Surgery Program, Department of Plastic Surgery and Microsurgery, Medical School, Universidade de São Paulo (USP), Brazil. Design the protocol, scientific content of the study, technical procedures, manuscript preparation and writing, English language.

ⁱⁱGraduate student, Medical School, USP, São Paulo-SP, Brazil. Acquisition, analysis and interpretation of data; technical procedures.

ⁱⁱⁱPhD, Otorhinolaryngologist, Department of Otorhinolaryngology, USP, São Paulo-SP, Brazil. Design the protocol; technical procedures; acquisition, analysis and interpretation of data; manuscript writing; critical revision.

^{iv}PhD, Plastic Surgeon, Department of Plastic Surgery and Microsurgery, Medical School, USP, São Paulo-SP, Brazil. Technical procedures, analysis of data.

^vPhD, Plastic Surgeon, Department of Plastic Surgery and Microsurgery, Medical School, USP, São Paulo-SP, Brazil. Analysis of data, manuscript writing, critical revision.

^{vi}Full Professor, Plastic Surgeon, Department of Plastic Surgery and Microsurgery, Medical School, USP, São Paulo-SP, Brazil. Intellectual and scientific content of the study, critical revision.

^{vii}Chairman and Head, Department of Plastic Surgery and Microsurgery, Medical School, USP, São Paulo-SP, Brazil. Intellectual and scientific content of the study.

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate a new model of intraoperative electromyographic (EMG) assessment of the tibial and fibular nerves, and its respective motor units in rats.

METHODS: Eight Wistar rats underwent intraoperative EMG on both hind limbs at two different moments: week 0 and week 12. Supramaximal electrical stimulation applied on sciatic nerve, and compound muscle action potential recorded on the gastrocnemius muscle (GM) and the extensor digitorum longus muscle (EDLM) through electrodes at specific points. Motor function assessment was performed through Walking Track Test.

RESULTS: Exposing the muscles and nerves for examination did not alter tibial ($p=0.918$) or fibular ($p=0.877$) function between the evaluation moments. Electromyography of the GM, innervated by the tibial nerve, revealed similar amplitude ($p=0.069$) and latency ($p=0.256$) at week 0 and at 12 weeks, creating a standard of normality. Meanwhile, electromyography of the EDLM, innervated by the fibular nerve, showed significant differences between the amplitudes ($p=0.003$) and latencies ($p=0.021$) at the two different moments of observation.

CONCLUSION: Intraoperative electromyography determined and quantified gastrocnemius muscle motor unit integrity, innervated by tibial nerve. Although this study was not useful to, objectively, assess extensor digitorum longus muscle motor unit, innervated by fibular nerve.

Key words: Electromyography. Tibial Nerve. Peroneal Nerve. Rats, Wistar.

constructs that remained viable for more than 28 days in static culture. However, without exposing the vascular lining cells to flow, their functionality and *in vivo* stability are suboptimal. Here, we “prime” the constructs by dynamically perfusing them and determine how flow induced shear stress optimizes the endoluminal surfaces of our tissue-engineered vessels.

MATERIALS AND METHODS: Pluronic F127 fibers, 1.5 mm in diameter, were sacrificed in type I collagen, creating a central looped microchannel. 100 μ L polyculture cell suspension mixture of 5×10^6 cells/mL of human foreskin fibroblasts and 5×10^6 cells/mL of human aortic smooth muscle cells was seeded into the microchannel. The following day, a 100 μ L cell suspension of 5×10^5 cells/mL of human placental pericytes and 5×10^6 cells/mL of human umbilical vein endothelial cells was seeded into the microchannel. All constructs underwent daily media changes in static culture for 7 days, and then half were perfused at 10 dynes/cm² for an additional 7 days. After 14 days, scaffolds were fixed and processed.

RESULTS: After 7 and 14 days of culture, constructs formed intact endoluminal linings along the microchannel with increasing thickness over time. CD31 expressing endothelial cells were noted along the luminal surface after 7 days and throughout the endoluminal lining after 14 days, establishing a neointima. Constructs undergoing static and dynamic culture had robust, vascular linings that spanned the entire microchannel. However, dynamic constructs had a 59% thicker lining in the channel ($p=0.0057$). Ki67 staining demonstrated statistically significant increased cell proliferation in constructs that experienced dynamic perfusion suggesting stimulation by the shear stress ($p=0.0429$).

CONCLUSION: Shear stress through dynamic perfusion was used to optimize the development of a layer of vascular lining cells to provide a non-thrombogenic surface to allow continuous blood flow in these tissue engineered vessels. Exposing pre-vascularized engineered tissues to controlled perfusion produces vessels with architecture that more accurately recapitulates the *in vivo* phenotype and provides a surface for thrombosis-free blood flow, allowing for surgical implantation via microanastomosis.

DISCLOSURE/FINANCIAL SUPPORT: None of the authors has a financial interest in any of the products, devices, or drugs mentioned in this manuscript.

Single and Double Reinnervation of the Gastrocnemius Muscle in Rats - Experimental Model

Andre C. Nepomuceno, MD; José Carlos M. Faria, MD, PhD; Elisa Politani, MS; Eduardo Guandelini, MS; Washington Lima, MD; Marco Longo, MD, PhD; Raquel Salomone, MD, PhD; Alessandra G. Salles, MD, PhD; Rolf Gemperli, MD, PhD

INTRODUCTION: Muscle contraction generated by electrical impulses originated simultaneously from two different neural sources may be an interesting alternative for facial palsy and brachial plexus injury treatment.¹⁻⁴ We hypothesized that double reinnervation leads to better muscle functional recovery. Thus, an experimental model was created to assess double and single muscle reinnervation of the gastrocnemius muscle in rats.

MATERIALS AND METHODS: Fifty adult Wistar rats after having their right peroneal nerve sectioned were allocated into 5 groups: (C) control; (TS) in which the right tibial nerve was also sectioned and not repaired; (EE) where after section, the right tibial nerve was immediately repaired by primary neurorrhaphy; (ES) where after section, the right tibial nerve was immediately repaired by end-to-end neurorrhaphy associated to end-to-side neurorrhaphy of the peroneal nerve to the tibial nerve distal to the primary neurorrhaphy site; and (CEE) where after section, the right tibial nerve was immediately repaired by convergent end-to-end neurorrhaphy between the proximal stumps of the tibial and peroneal nerves to the distal stump of the tibial nerve. The outcomes were assessed 12 weeks after the experiment by walking track, electromyography, gastrocnemius muscle weight ratio and histomorphometric analysis of distal tibial nerve.

RESULTS: Compared to simple innervation group (EE), the double innervation groups had higher functional results in walking track ($p < 0.05$). When compared to the EE group, the CEE group showed greater amplitude ($p = 0.006$) and higher latency ($p = 0.041$) to electromyography. Regarding muscle weight index, there was no difference between groups of single and double innervation ($p > 0.705$). Histologic analysis revealed higher axonal density in the CEE group compared to the EE group ($p = 0.001$) and the ES group ($p = 0.002$).

Plastic and Reconstructive Surgery

Single versus Double Muscle Reinnervation: An Experimental Study

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PRS-D-17-01365
Article Type:	Experimental
Full Title:	Single versus Double Muscle Reinnervation: An Experimental Study
Corresponding Author:	ANDRE NEPOMUCENO, M.D. Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Sao Paulo, BRAZIL
Order of Authors:	ANDRE C NEPOMUCENO, MD Jose Carlos M Faria, MD Elisa L Politani Eduardo G Silva Raquel Salomone, MD Marco V Longo, MD Alessandra G Salles, MD Rolf Gemperli, MD
Abstract:	<p>Background: Muscle contraction generated by electrical impulses simultaneously originating from two different neural sources may be an interesting treatment alternative for long term facial palsy. An experimental model was designed to evaluate single and double reinnervation of the gastrocnemius muscle in rats.</p> <p>Methods: Fifty adult Wistar rats underwent transection of their right peroneal nerve and were divided into five groups: the control group (C), tibial nerve section group (TS), tibial nerve primary end-to-end neurorrhaphy (PEE) group, tibial nerve primary repair associated with end-to-side peroneal-to-tibial nerve transfer (PRES) group, and tibial nerve repair by convergent end-to-end neurorrhaphy between the proximal stumps of the tibial and peroneal nerves to the distal stump of the tibial nerve (CEE) group. The outcomes were assessed 12 weeks after the experiment by use of a walking track, electromyography, gastrocnemius muscle mass index, and histomorphometric analysis of the distal tibial nerve.</p> <p>Results: The double reinnervation groups (PRES and CEE groups) showed greater functional recovery than the single reinnervation group (PEE group) ($p < 0.05$). The CEE group showed greater amplitude ($p = 0.006$) and higher latency ($p = 0.041$) than the PEE group. There was no difference in the muscle mass index among the reinnervation groups ($p > 0.705$). Histologic analysis revealed greater axonal density in the CEE group than PEE group ($p = 0.001$) and PRES group ($p = 0.002$).</p> <p>Conclusions: The double reinnervation techniques showed earlier and greater functional recovery of the gastrocnemius muscle than did the single reinnervation technique. The CEE group showed a higher number of regenerated axons in the distal tibial nerve stump.</p>
Keywords:	double innervation, end-to-end neurorrhaphy, end-to-side neurorrhaphy, nerve repair, nerve transfer, gastrocnemius muscle, rats.
Manuscript Classifications:	Microsurgery; Muscle physiology; Nerves; Neurophysiology
Additional Information:	
Question	Response
Do you feel the manuscript qualifies as an outcomes study?	Yes

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29/05/2013, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **157/13** intitulado: **“ESTUDO EXPERIMENTAL DE TÉCNICAS DE DUPLA INERVAÇÃO MUSCULAR EM RATOS”** que utilizará **90** animais da espécie **Ratos Wistar (Linhagem albina da espécie Rattus norvegicus)**, apresentado pelo **Departamento de CIRURGIA**

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

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. José Carlos Marques de Faria

Pesquisador (a) Executante: André Coelho Nepomuceno

CEP-FMUSP, 07 de Junho de 2013.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa