



Brazilian Journal of Otorhinolaryngology

ISSN: 1808-8694

revista@aborlccf.org.br

Associação Brasileira de
Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-
Facial
Brasil

Borin, Andrei; Nunes Toledo, Ronaldo; Damasceno de Faria, Simone; Gurgel Testa, José Ricardo;
Mendonça Cruz, Oswaldo Laércio

Modelo experimental comportamental e histológico da regeneração do nervo facial em ratos
Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, vol. 72, núm. 6, noviembre-diciembre, 2006, pp. 775-784
Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial
São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=392437769008>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Modelo experimental comportamental e histológico da regeneração do nervo facial em ratos

Andrei Borin¹, Ronaldo Nunes Toledo², Simone Damasceno de Faria³, José Ricardo Gurgel Testa⁴, Oswaldo Laércio Mendonça Cruz⁵

Behavioral and histologic experimental model of facial nerve regeneration in rats

Palavras-chave: histologia, modelo animal, nervo facial, rato wistar, regeneração neural.

Keywords: histology, animal model, facial nerve, wistar rat, nerve regeneration.

Resumo / Summary

O estabelecimento de modelos experimentais é o passo inicial para estudos de regeneração neural. **Objetivo:** Estabelecer modelo experimental de regeneração do nervo facial. **Materiais e Métodos:** Ratos Wistar com secção completa e sutura do tronco do nervo facial extratemporal, com análise comportamental e histológica até 9 semanas. **Forma do Estudo:** Estudo prospectivo experimental. **Resultados:** Progressiva recuperação clínica e histológica dos animais. **Conclusão:** Estabelecemos um método aceitável para o estudo de regeneração do nervo facial em ratos.

To setup an experimental model is the first step to study neural regeneration. **Aim:** Setting up an experimental model on facial nerve regeneration. **Material and Methods:** Wistar rats with complete sectioning and suturing of the extratemporal facial nerve trunk; with a behavioral and histological analysis for 9 weeks. **Study Design:** Experimental prospective study. **Results:** Progressive clinical and histological recovery of the animals. **Conclusion:** Our method is acceptable to study facial nerve regeneration in rats.

¹ Mestre em otorrinolaringologia pela UNIFESP/EPM, pós-graduando/ Doutorando.

² Mestre em otorrinolaringologia pela UNIFESP/EPM, pós-graduando/ Doutorando.

³ Mestre em otorrinolaringologia pela UNIFESP/EPM, médica.

⁴ Doutor em otorrinolaringologia pela UNIFESP/EPM, professor adjunto da disciplina de otorrinolaringologia da UNIFESP/EPM.

⁵ Professor livre-docente pela FMUSP, professor afiliado da UNIFESP/EPM.

Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo.

Endereço para correspondência: Andrei Borin - Rua Loefgreen 1587 apto. 152 V. Clementino São Paulo SP 04040-032.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 2/5/2006 e aprovado em 20/6/2006.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 2 de maio de 2006. Cod. 1891.

Artigo aceito em 20 de junho de 2006.

INTRODUÇÃO

O sétimo nervo craniano, o nervo facial (NF), desempenha um papel muito importante em diversas funções do organismo. É o grande responsável pela motricidade da hemiface homolateral, desempenhando ainda um papel na motricidade de músculos cervicais, na eferência do reflexo estapediano, na sensibilidade de parte da orelha externa, na capacidade gustativa e no controle autonômico de glândulas exócrinas. Uma lesão do NF apresenta um impacto importante no bem estar do paciente, já que acarreta prejuízos cosméticos, funcionais e psicológicos¹⁻³.

Desde o século XVII, a literatura médica já apresenta tentativas de reparação do NF lesado⁴, mas é só em 1927 que Bunnel reporta um caso de sucesso do mesmo⁵. Na Segunda Grande Guerra do século XX, aproveitando a infinidade de pacientes gerados nos campos de batalha, iniciaram-se esforços para a recuperação de lesões neurais, os quais culminaram em 1942 na divulgação do “Senior Consultant in Neurologic Surgery to the European Theater of Operations”⁶, no qual já se defendia uma sutura precoce e sem tensão para um melhor resultado de recuperação funcional. Porém, ainda hoje os resultados de recuperação do NF lesado se apresentam ímpios^{1,2,7,8}. Diversos estudos vem sendo publicados quanto às influências de inúmeros fatores no resultado final da recuperação do NF, abordando técnica cirúrgica², administração de substâncias neurotróficas^{1,7,9} e até exposição à pulsos eletromagnéticos¹⁰. E todos estes esforços envolvem a obtenção de um modelo experimental para isto.

Objetivamos com este trabalho o estabelecimento de um paradigma experimental de lesão completa do NF, de fácil obtenção e que permita uma análise temporal da regeneração do mesmo, visando implementar futuros estudos sobre a utilização de fatores neurotróficos.

MÉTODO

O projeto de pesquisa deste estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/ EPM sob o número 0418/05.

Foram utilizados ratos Wistar, adultos, com peso entre 200 e 300g, machos, mantidos em gaiolas adequadas, em sala climatizada e sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e alimento. Foram confeccionados 6 grupos de estudo com lesão e sutura do NF, com sacrifício e análise histológica do nervo imediata e com 1, 3, 5, 7 e 9 semanas. O Grupo de 9 semanas (9 SEM) obedeceu ao seguinte algoritmo:

D0 D01 D07 D14 D21 D28 D35 D42 D49 D56 D63
|_____|_____|_____|_____|_____|_____|_____|_____|
cirurgia inicial observação comportamental sacrifício
* lesão nervo e sutura * histologia do nervo

OBS: D01 (primeiro dia pós operatório), D07 (sétimo dia pós operatório), D14 (décimo quarto dia pós-operatório)...

Já os demais grupos (0 SEM, 1 SEM, 3 SEM, 5 SEM e 7 SEM) tiveram a observação comportamental suspensa e sacrifício dos animais estabelecidos no D0, D7, D21, D35 e D49, respectivamente. No “D0” os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico inicial utilizando-se microscópio cirúrgico DF-Vasconcelos® M90, seguindo os seguintes passos:

1) anestesia intraperitoneal com cloridrato de xilasina 2% (0,5 ml/Kg de peso) e cloridrato de ketamina 10% (0,9 ml/Kg de peso);

2) tricotomia retroauricular direita;

3) incisão vertical retroauricular interessando pele, subcutâneo e platisma;

4) dissecção romba e identificação da margem tendinosa do músculo clavotrapeziano, do tronco e bifurcação do nervo facial direito e da veia jugular externa;

5) secção completa do nervo facial com microtesoura à aproximadamente 3mm de sua emergência (entre margem tendinosa do clavotrapeziano e veia jugular externa) e imediata sutura com nylon 9-0;

6) fechamento da pele e subcutâneo em pontos separados com nylon 4-0.

Nos respectivos dias destinados à observação clínica, os animais foram submetidos à observação da mímica facial espontânea para observação do movimento das vibrissas, comparando o lado direito (lesado) ao lado esquerdo (não-lesado) durante o movimento típico do rato ao explorar o ambiente. Levando-se em conta o posicionamento, amplitude e a freqüência do movimento das vibrissas, foi dado um valor numérico conforme a escala do Quadro 1.

Nestes mesmos dias, observamos também o fechamento ocular dos animais mediante estímulo de jato de ar, produzido pela compressão rápida do êmbolo de uma

Quadro 1. Escala de pontuação para observação do movimento de vibrissas.

Pontos	Movimento
0	Sem movimento
1	Tremor leve
2	Movimentação efetiva com posicionamento posteriorizado e amplitude e freqüências inferiores ao contra-lateral
3	Movimentação efetiva com posicionamento semelhante ao contra-lateral, mas com amplitude e freqüência inferiores
4	Movimentação efetiva com posicionamento e amplitude semelhantes ao contra-lateral, mas com freqüência inferior
5	Movimentação efetiva com posicionamento, amplitude e freqüência semelhantes ao contra-lateral

seringa de 20 ml direcionado contra cada globo ocular. Aqui, não comparamos o lado direito (lesado) ao lado esquerdo (não-lesado) já que o posicionamento lateralizado dos globos oculares nestes animais não permite o estímulo bilateral simultâneo. Levando-se em conta o fechamento da rima ocular observado, foi dado um valor numérico conforme a escala do Quadro 2.

Quadro 2. Escala de pontuação para observação do fechamento da rima ocular.

Pontos	Movimento
0	Sem movimento perceptível
1	Contração, mas sem fechamento perceptível da rima ocular
2	Fechamento de até 25% da rima ocular
3	Fechamento de 25 a 50% da rima ocular
4	Fechamento de 50 a 75% da rima ocular
5	Fechamento entre 75 e 100% da rima ocular

Em cada dia definido para o sacrifício, de acordo com o grupo em questão, os animais foram sacrificados através da superdosagem dos mesmos anestésicos utilizados na cirurgia inicial. Nova dissecção do nervo facial direito permitiu a localização da sutura neural prévia, sendo retirado o fragmento imediatamente distal ao ponto de sutura para análise histológica. Os fragmentos de nervo foram colocados em frascos individuais com solução fixadora Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%, tamponados com cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4), sendo então processados para análise histológica no CEME (Centro de Microscopia Eletrônica) da UNIFESP/EPM, seguindo o protocolo: quatro lavagens sucessivas em solução tampão cacodilato de sódio (0,1M pH 7,4), sendo que as duas primeiras lavagens em temperatura ambiente por 15 minutos; a terceira à 4º C por 12 horas; a quarta à temperatura ambiente por 15 minutos. Pós-fixação com tetróxido de ósmio 2% em solução tampão cacodilato de sódio (0,1 M pH 7,4) por uma hora, seguidas por duas lavagens rápidas (1 minuto) e sucessivas com água destilada. Imersão em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% por 30 minutos, seguidas de duas lavagens rápidas (1 minuto) e sucessivas com água destilada. Desidratação em banhos de imersão sucessivos em concentrações crescentes de etanol: 70% por 30 minutos (1 vez), 90% por 30 minutos (1 vez) e 100% por 20 minutos (2 vezes). Dois banhos de imersão consecutivos em óxido de propileno por 20 minutos cada. Infiltração em mistura de resina tipo Araldite 502®:óxido de propileno em concentrações de 1:3, 1:2 e 1:1 por 60 minutos cada, agitando-se por rotação e em temperatura ambiente. Após, colocação em resina pura por quatro a cinco horas em vácuo. Transferidos para moldes de inclusão e orientados

horizontalmente para obtenção de cortes transversais dos nervos, seguido de polimerização da resina em estufa a 60º C por 72 horas. Os blocos obtidos após este preparo foram aparados e cortados em ultramicrotomo Leica Reichert Ultracuts®, com navalhas de vidro, obtendo cortes semifinos de 0,3 µm de espessura. Em seguida, os cortes foram colocados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina 1%.

Os cortes foram visibilizados em microscópio óptico Nikon Optiphot II® acoplado a um sistema analisador de imagem Leica Quantimet 500 QWIN®, com imagens digitalizadas através de câmera Sony XC 003P®. Foram obtidas imagens com objetiva de 40 vezes e aumento total de 860 vezes na imagem digitalizada. Estas imagens foram impressas em papel fotográfico no formato 10 x 15cm para a realização de uma análise qualitativa e quantitativa histométrica da regeneração neural através da análise das fibras mielinizadas.

Para a análise qualitativa, as fotos foram dispostas seqüencialmente de acordo com o tempo entre lesão e sacrificio do animal e observado a presença de fibras mielinizadas, seu diâmetro relativo e a uniformidade de sua distribuição no nervo.

Para a análise quantitativa, foi confeccionado uma “máscara” de 10 x 15cm em uma folha de acetato transparente, na qual foram desenhadas 18 “janelas” de 1,5 x 1,5cm, numeradas de 1 a 18, distribuídas uniformemente em 3 linhas (6 “janelas” por linha). Aproveitamos a Figura 4, que será apresentada nos resultados, para realizar uma fotomontagem para exemplificar a confecção destas “janelas”. Através de um sorteio randomizado, foram escolhidas 3 “janelas” por linha para se realizar uma contagem de fibras mielinizadas, num total de 9 “janelas” por foto. Esta contagem obedeceu ao método histométrico clássico¹¹ de considerar “válidos” os elementos que estavam totalmente “inclusos” na área da janela e os só parcialmente inclusos, mas que foram interceptados pelas arestas superior e esquerda. Foram desconsideradas nas contagens aqueles só parcialmente inclusos interceptados pelas arestas inferior e direita. As contagens de cada uma destas nove “janelas” foram somadas, obtendo a contagem total para cada rato. Durante a contagem, se alguma das “janelas” foi considerada como inadequada, seja por não estar totalmente sobre a área neural (englobando bainha e/ou tecidos adjacentes), ou as fibras estarem cortadas obliquamente, ou ainda por problemas quanto à coloração (depósitos homogêneos de azul de toluidina), a “janela” em questão foi substituída pela sua sucessora na mesma linha. Caso esta nova “janela” já houvesse sido selecionada para a contagem durante o sorteio inicial, a janela sucessora a esta foi escolhida. Em caso de necessidade de substituir as janelas 6, 12 ou 18 (finais das linhas), optamos pela 1, 7 e 13 (iniciais das linhas).

RESULTADOS

Foram utilizados dois animais para cada grupo de estudo, num total de 12 ratos. Os resultados da observação comportamental destes animais se encontram apresentados na Tabela 1. Os pontos obtidos por cada rato relativos à movimentação das vibrissas e ao fechamento da rima ocular foram somados e realizamos a média dos dois ani-

mais pertencentes a cada grupo, confeccionando o Gráfico 1. Neste, podemos inferir uma recuperação temporal dos animais ao longo das nove semanas de observação clínica. Análises estatísticas não foram realizadas por termos uma amostra de apenas dois animais por grupo, mas nota-se uma clara tendência de recuperação clínica, saindo de uma média de 2 pontos no grupo 1SEM para 7,5 pontos no grupo 9SEM. Uma “linha de tendência” foi calculada e

Tabela 1. Resultados da observação comportamental dos animais.

Observação das Vibrissas											
Grupo	rato	D01	D07	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D63
1 SEM	I	0	1								
1 SEM	XII	0	1								
3 SEM	VII	0	1	1	2						
3 SEM	VI	0	1	1	1						
5 SEM	IV	0	1	1	2	2	2				
5 SEM	X	0	1	1	2	2	2				
7 SEM	V	0	1	1	2	2	2	2	2		
7 SEM	VIII	0	1	1	2	2	2	2	2		
9 SEM	IX	0	1	1	2	2	2	3	3	3	3
9 SEM	XI	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2
Observação da Rima Ocular											
Grupo	rato	D1	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D63
1 SEM	I	0	1								
1 SEM	XII	0	1								
3 SEM	VII	0	1	1	3						
3 SEM	VI	0	1	1	1						
5 SEM	IV	1	1	1	2	3	4				
5 SEM	X	0	1	1	3	3	4				
7 SEM	V	1	1	1	3	4	4	4	5		
7 SEM	VIII	0	1	1	3	3	4	5	5		
9 SEM	IX	0	1	1	3	4	4	4	5	5	5
9 SEM	XI	0	1	1	3	4	4	5	5	5	5
TOTAL (Somatória da observação das Vibrissas e da Rima Ocular)											
Grupo	rato	D1	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D63
1 SEM	I	0	2								
1 SEM	XII	0	2								
3 SEM	VII	0	2	2	5						
3 SEM	VI	0	2	2	2						
5 SEM	IV	1	2	2	4	5	6				
5 SEM	X	0	2	2	5	5	6				
7 SEM	V	1	2	2	5	6	6	6	7		
7 SEM	VIII	0	2	2	5	5	6	7	7		
9 SEM	IX	0	2	2	5	6	6	7	8	8	8
9 SEM	XI	0	2	2	5	6	6	7	7	7	7

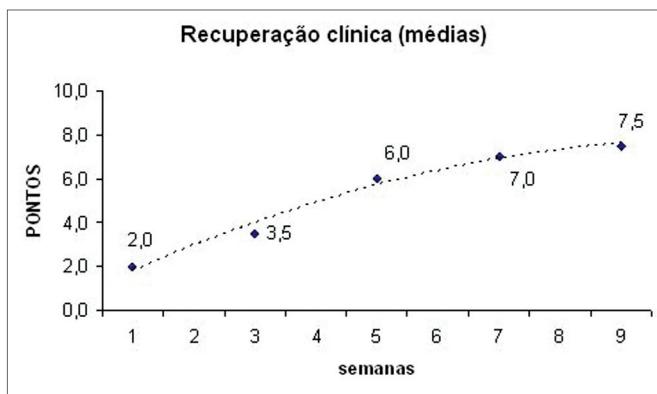


Gráfico 1. Médias de recuperação clínica após transecção e sutura do nervo facial.

inserida no mesmo para facilitar a percepção deste fato.

Apresentamos as 12 fotos obtidas para cada um dos animais (Figuras 1 a 12). Utilizando estas imagens na análise histológica qualitativa, podemos notar que no grupo 0 SEM (Figuras 1 e 2) observamos a presença de fibras regulares, de forma circular, distribuídas homogeneousmente por todo o campo. No grupo 1 SEM (Figuras 3 e 4) notamos a quase que total ausência de fibras mielinizadas, sendo que na Figura 4 notamos um depósito do corante em parte do campo observado. No grupo 3 SEM, observando a Figura 5 (rato VII), notamos a presença de fibras mielinizadas de pequeno diâmetro agrupadas em algumas áreas do nervo; já na Figura 6 (rato VI), observamos um aspecto muito semelhante ao grupo 1 SEM. No grupo 5 SEM, na Figura 8 (rato X), notamos uma “retração” do material, o que impossibilitou uma análise qualitativa; já na Figura 7, observamos uma acentuação da presença de pequenas fibras mielinizadas por toda a área neural. Nos grupos 7 SEM (Figuras 9 e 10) e 9 SEM (Figuras 11 e 12), essa presença vai se acentuando ainda mais, já com algumas fibras “grandes”, semelhantes ao grupo 0 SEM, sobretudo na Figura 12 (rato IX).

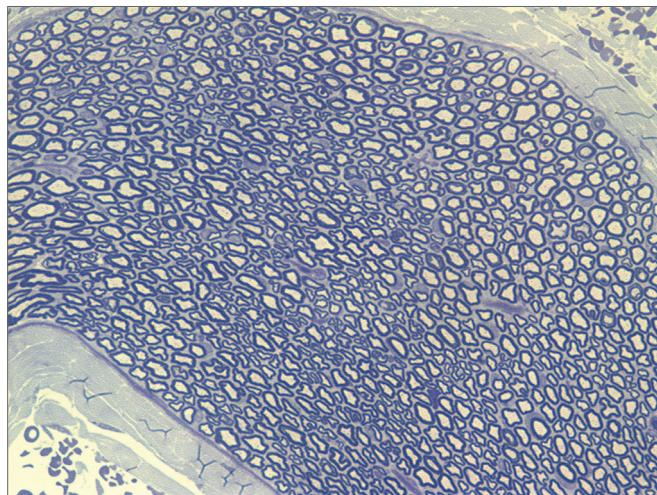


Figura 1. Microscopia do tronco do nervo facial sem lesão (RATO II)

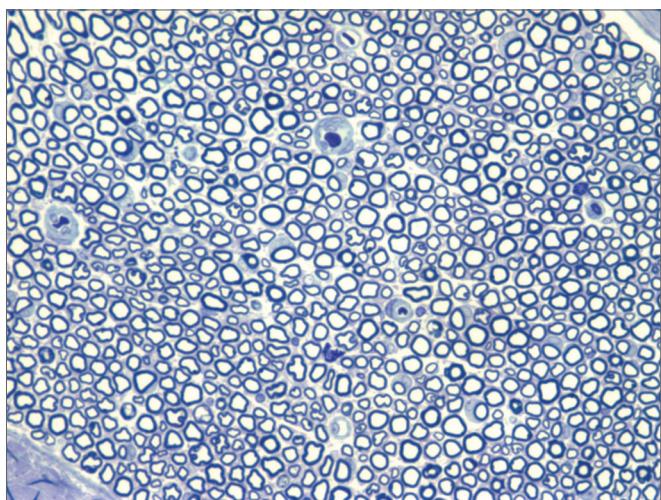


Figura 2. Microscopia do tronco do nervo facial sem lesão (RATO III)

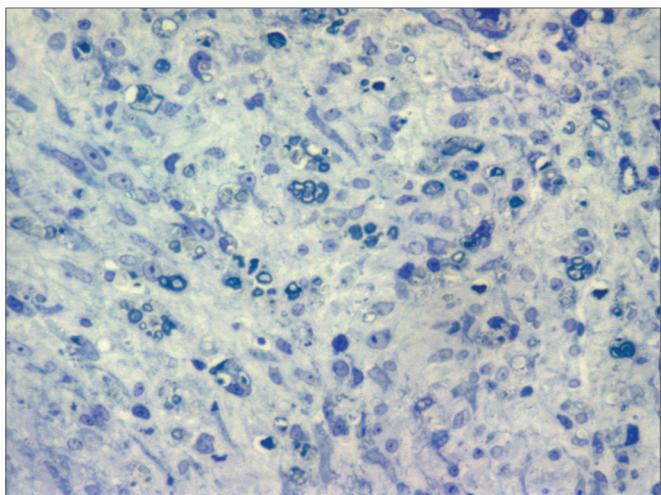


Figura 3. Microscopia do tronco do nervo facial após 1 semana de transecção e sutura (RATO I)

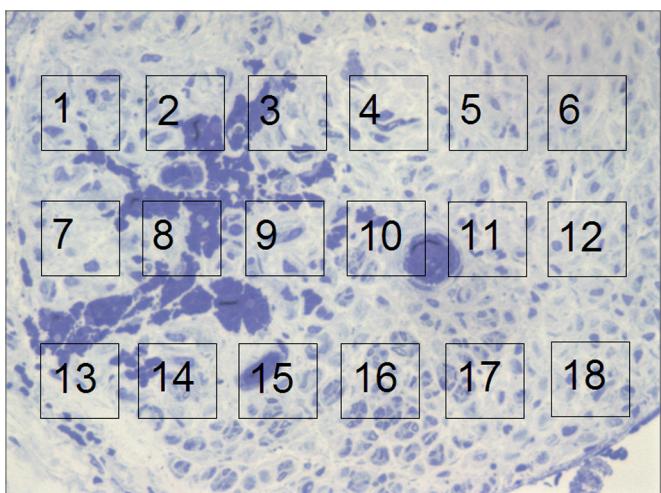


Figura 4. Microscopia do tronco do nervo facial após 1 semana de transecção e sutura (RATO XII); e simulação de “máscara” de contagem de fibras mielinizadas.

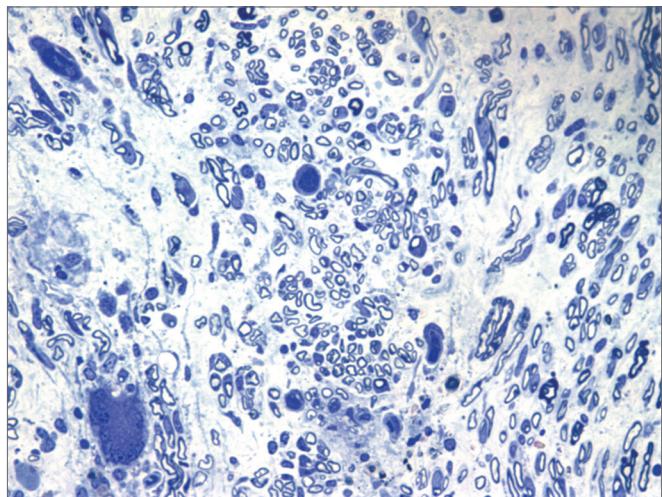


Figura 5. Microscopia do tronco do nervo facial após 3 semanas de transecção e sutura (RATO VII)

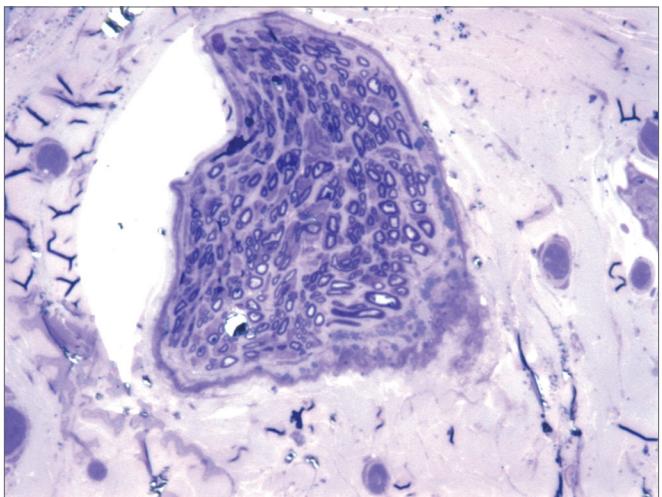


Figura 8. Microscopia do tronco do nervo facial após 5 semanas de transecção e sutura (RATO X)

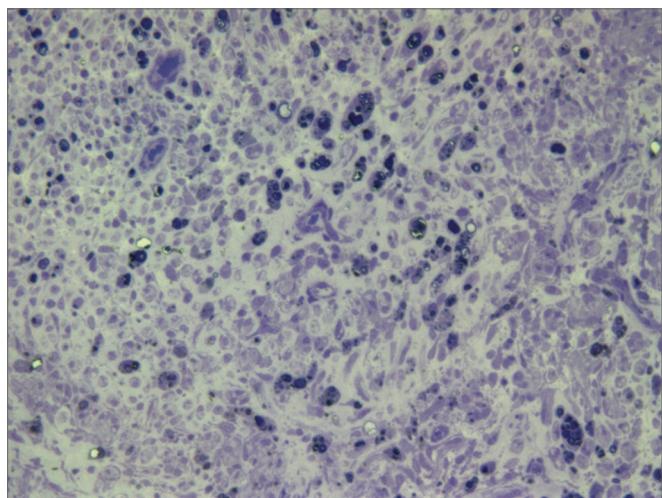


Figura 6. Microscopia do tronco do nervo facial após 3 semanas de transecção e sutura (RATO VI)

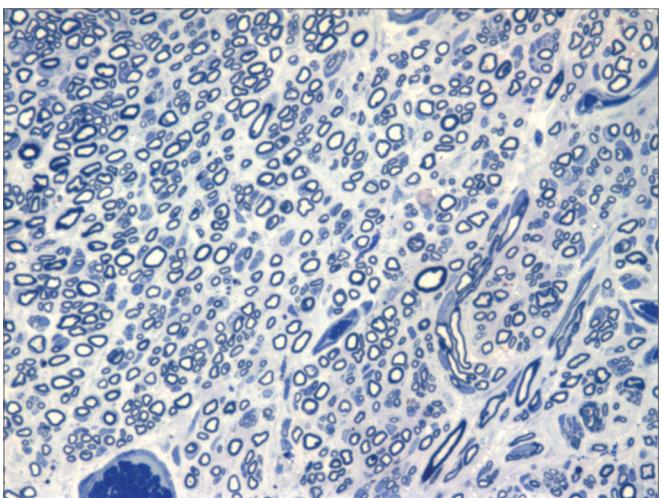


Figura 9. Microscopia do tronco do nervo facial após 7 semanas de transecção e sutura (RATO V)

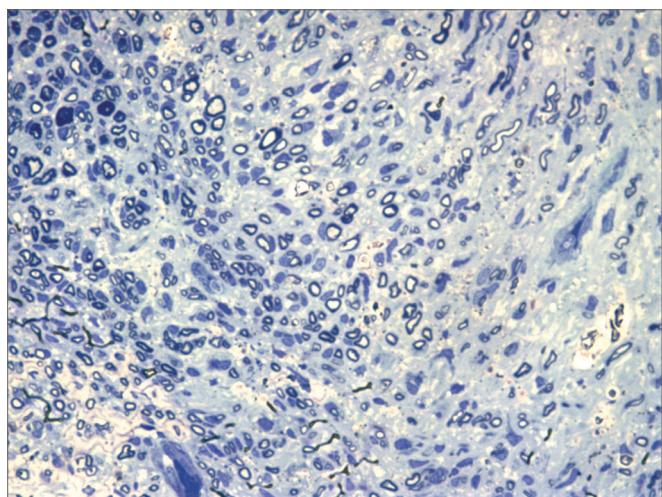


Figura 7. Microscopia do tronco do nervo facial após 5 semanas de transecção e sutura (RATO IV)

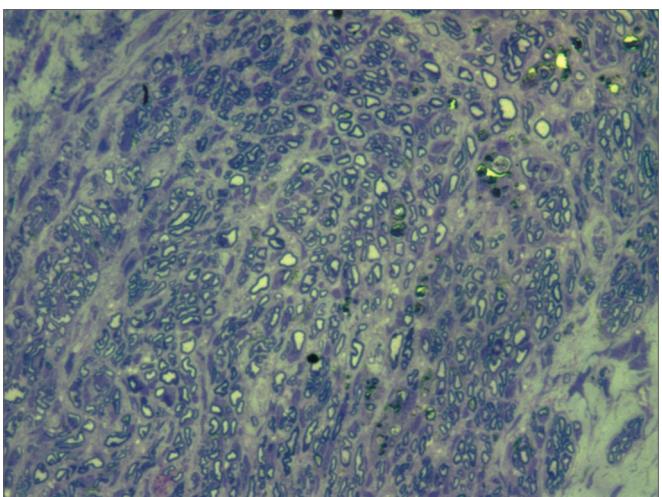


Figura 10. Microscopia do tronco do nervo facial após 7 semanas de transecção e sutura (RATO VIII)

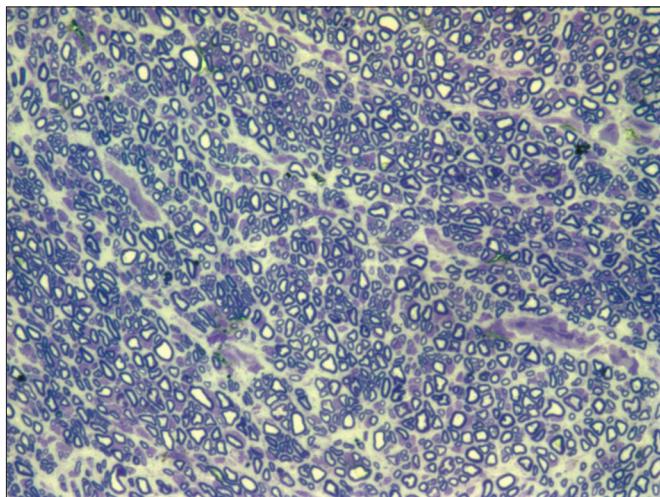


Figura 11. Microscopia do tronco do nervo facial após 9 semanas de transecção e sutura (RATO XI)

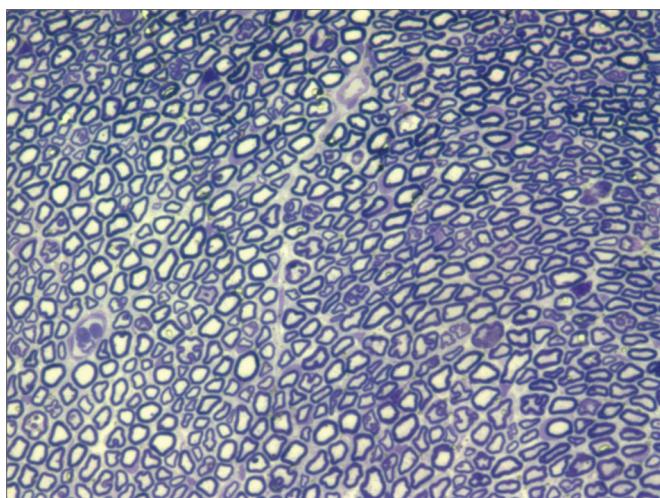


Figura 12. Microscopia do tronco do nervo facial após 9 semanas de transecção e sutura (RATO IX)

Tabela 2. Resultado da contagem de fibras mielinizadas e média por grupo.

GRUPO	RATO	TOTAL RATO												MÉDIA GRUPO
0 SEM	II	17	13	14	17	16	12	13	11	14	127			111,5
0 SEM	III	12	9	9	9	10	11	14	11	11	96			
1 SEM	I	0	1	0	1	0	0	1	1	0	4			2,0
1 SEM	XII	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
3 SEM	VII	1	9	4	7	2	9	4	6	16	58			
3 SEM	VI	0	1	0	0	2	0	0	0	0	3			30,5
5 SEM	IV	10	6	3	12	3	2	9	13	6	64			
5 SEM	X	\	\	\	\	\	\	\	\	\	64,0*			
7 SEM	V	16	15	15	11	7	10	15	12	11	112			108,0
7 SEM	VIII	10	18	12	12	14	3	13	9	13	104			
9 SEM	IX	14	13	8	8	10	12	9	12	8	94			121,0
9 SEM	XI	17	18	17	18	19	14	16	15	14	148			

* dado relativo apenas ao rato IV

Na análise histológica quantitativa, tivemos problemas em duas imagens. Na Figura 4, devido ao depósito de corante já relatado anteriormente, foi necessária a “mudança” de três das nove janelas sorteadas para a realização da contagem. Na Figura 8, a “retração” do material impossibilitou também a análise quantitativa do mesmo. Apresentamos os dados da análise histométrica na Tabela 2, compilando a contagem em cada um das nove “janelas” sorteadas para cada rato, a contagem total de cada animal e a média de cada grupo. Notamos o incremento temporal do número de fibras mielinizadas, sendo que no grupo 7 SEM obtivemos valores muito próximos ao grupo 0 SEM, sendo este suplantado no grupo 9 SEM. O Gráfico 2 ilustra o fato. Aqui também não foram realizadas análises estatísticas por termos uma amostra de apenas dois animais por grupo.

Procurando observar a correlação entre os resultados da observação clínica e da contagem de fibras mielinizadas, apresentamos a Tabela 3 e o Gráfico 3 que correlacionam estas duas séries de resultados. Organizamos os ratos em uma série crescente de resultados na contagem de fibras mielinizadas, excluindo o rato X desta análise já que não obtivemos uma análise histométrica do mesmo,

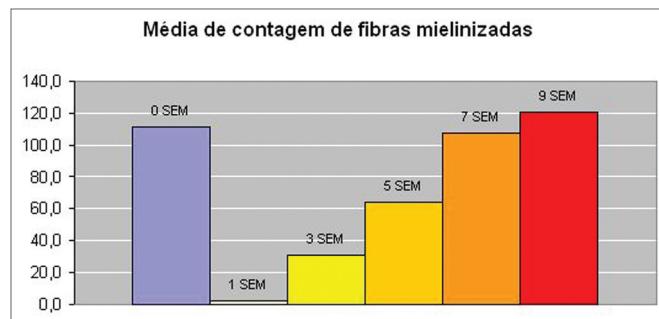


Gráfico 2. Médias de contagem de fibras mielinizadas.

Tabela 3. Correlação entre resultados de contagem das fibras mielinizadas e pontuação da observação comportamental.

RATO	XII	VI	I	VII	IV	IX	VIII	V	XI
GRUPO	1S	3S	1S	3S	5S	9S	7S	7S	9S
Contagem de fibras	0	3	4	58	64	94	104	112	148
Pontuação clínica	2	2	2	5	6	8	7	7	7

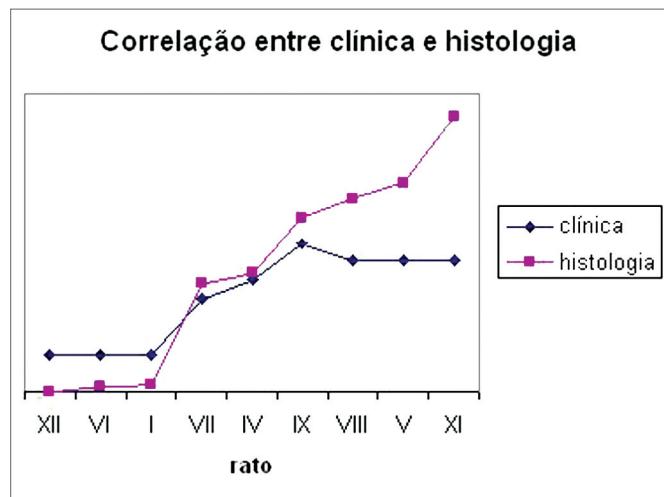


Gráfico 3. Correlação entre resultados de clínica e contagem de fibras.

como já relatado. Em seguida listamos seus resultados na observação clínica e notamos uma correlação direta entre os dois resultados, sobretudo nos grupos 1 SEM, 3 SEM e 5 SEM, nos quais uma maior contagem de fibras indicou uma maior pontuação clínica. Já nos grupos 7 SEM e 9 SEM, uma maior contagem não indicou um melhor resultado clínico diretamente proporcional.

DISCUSSÃO

O estabelecimento de um paradigma experimental de lesão do NF é o passo inicial e fundamental para o estudo da ação de possíveis fatores neurotróficos. Apesar de concordarmos que ainda não há um modelo experimental perfeito¹², este deveria apresentar as características mínimas de ser prático e facilmente reproduzível, permitindo a análise temporal e objetiva do processo de regeneração neural. Diversos animais se prestam ao estabelecimento de modelos experimentais para estudos sobre o NF, como o gato², o coelho¹³, o hamster¹⁴, o camundongo¹⁵, o “guinea pig”¹⁶ e o porco¹⁷. Optamos por utilizar o rato Wistar porque, além de ser um animal já utilizado em estudos semelhantes na literatura¹⁸⁻²⁵, é facilmente obtido no biotério desta Instituição, tem um manejo relativamente fácil podendo ser mantidos em gaiolas coletivas, é facilmente anestesiado e o animal com paralisia facial não apresenta grande morbidade para se alimentar, mesmo quando esta é

bilateral¹². Optamos por padronizar o modelo com animais do sexo masculino porque há relatos sobre a influência do gênero na regeneração neural, sendo naturalmente maior em fêmeas de hamster¹⁴, e para que não houvesse necessidade de controle do ciclo hormonal dos animais. A anatomia do NF extratemporal do rato também já está descrita na literatura, sendo que o seu tronco, de aproximadamente 6mm, é fácil e constantemente acessado por uma incisão retroauricular simples, variando em menos de 2,1% em contagens de fibras mielinicas seriadas, não sofrendo influencias quanto ao peso e idade do animal^{12,26}. Quanto às desvantagens deste animal, citaríamos o fato do tronco do NF do rato ser monofascicular, o que difere do ser humano¹², além da pequena expressão de mimica facial deste animal, o que dificulta o estabelecimento de escalas visuais de recuperade motricidade.

Uma vez estabelecido o animal, procuramos escolher o tipo de lesão neural. Diversos estudos vem utilizando o “esmagamento” do NF^{8,21,27,28}, porém optamos pela seção completa do mesmo por se tratar de uma lesão mais reproduzível já que é sempre grau V na classificação de Suderland^{17,18}. Na reparação de uma lesão completa do NF poderíamos optar por utilizar tubos de silicone, bastões de colágeno, cola de fibrina, fáscia temporal ou enxertos livres neurais ou de músculo^{1,2,7,13}. Optamos pela sutura epineural, pois além de ser bem estabelecida na literatura^{12,16,18,19,20,24,25,29,30}, ela reproduz melhor a correção cirúrgica realizada em nervos de seres humanos³¹, sendo relativamente fácil a obtenção de um bom alinhamento e com pouca tensão dos cotos com apenas 1 ponto, no caso do rato^{1,7}.

Diversos métodos para avaliar a regeneração neural em animais já foram propostos. Escalas comportamentais^{8,28,32,33}, análises eletrofisiológicas^{2,10,19,32}, análises de fibras musculares^{19,20,29}, análises de núcleos centrais^{18,19,21-23,30,34-36} e análises de axônios^{2,10,16,19,31-33} já foram utilizadas na literatura. Optamos por realizar uma análise comportamental porque esta não reflete apenas um aspecto anatômico e sim o aspecto primordial da regeneração que é a recuperação da funcionalidade do movimento facial³⁷. Outros autores, utilizando estudos de lesão do NF em roedores já haviam utilizado escalas clínicas de observação do movimento de vibrissas, em muito semelhantes ao nosso^{8,28}. Procurando incrementar a análise comportamental, associamos a observação do fechamento da rima ocular baseado na experiência de outros autores com animais como o gato². Porém é inegável que esta medida comportamental tem um grande componente de subjetividade e menor reproduzibilidade. Optamos então por associar uma avaliação histométrica, por microscopia óptica das fibras mielinizadas do axônio, que além de ser a mais utilizada na literatura, apresenta um custo aceitável^{16,19,31,32,37-39}. Algumas limitações desta técnica merecem destaque. Ela não permite aferir a presença de fibras amielínicas - só visibilizadas

por microscopia eletrônica, metodologia ainda de alto custo para aplicação em grandes séries^{13,37} - e não avalia o diâmetro e espessura da bainha mielinica, quesitos que seriam interessantes para acompanhar a regeneração. Tentamos avaliar estes dois últimos quesitos através de análises automatizadas de áreas capturadas por sistemas de matizes de cores, porém os dados não se mostraram reproduutíveis e confiáveis, pois existe grande dificuldade em conseguir corar a mielina com um tom específico, problema já relatado por outros autores³⁷.

Uma vez estabelecido o modelo, passamos a discussão de nossos resultados comparados às observações de outros autores na literatura. Quanto à escala de observação comportamental, obtivemos resultados que demonstraram uma recuperação temporal da movimentação facial, o que corresponde bem ao resultado de outros autores que utilizaram modelos semelhantes em roedores^{27,28}. Em uma escala máxima de 10 pontos, nossos animais estabeleceram uma recuperação de 50% da função entre a 3^a e a 5^a semanas e de 75% na 9^a semana, quando encerramos o experimento. O fechamento da rima ocular nos pareceu o parâmetro mais precoce e facilmente observável para esta análise, enquanto o retorno do movimento das vibrissas foi mais lento. Essa observação coaduna com a de outros autores que ressaltam ser o retorno parcial do "blink reflex" o sinal mais precoce de recuperação neural em roedores²⁸.

Quanto à nossa análise qualitativa da histologia, observamos o surgimento de pequenos grupamentos de fibras mielinizadas, sobretudo após a 3^a semana, processo intensificado nas semanas seguintes, acompanhado de um aumento no diâmetro das mesmas, sobretudo na 7^a e 9^a semanas. Esta observação encontra correspondente na literatura em trabalhos com ratos em NF^{19,33} e em nervo ciático³⁸⁻⁴⁰, nos quais os autores evidenciam um aumento gradual em número e diâmetro das fibras mielinizadas ao longo da regeneração neural. Isto seria o reflexo do processo inicial de brotamento múltiplo de fibras do coto proximal que invadem o coto distal e que ao longo do tempo vão aumentando em diâmetro, refletindo uma maior capacidade de condução neural. O tempo em que iniciamos a percepção da regeneração neural também coaduna com as observações clássicas já descritas na literatura, onde a degeneração walleriana se completaria em torno da 2^a semana e o surgimento do brotamento das fibras do coto proximal e o início da "invasão" do coto distal, em torno do 10º dia^{1,7,41}.

Quanto a nossa análise quantitativa histométrica, observamos que a partir da 3^a semana ocorreu um aumento gradativo na contagem de fibras mielinizadas, atingindo um valor muito próximo do normal na 7^a semana e suplantando este na 9^a semana. Este fato também já encontra similaridade na literatura, onde diversos autores relatam um aumento progressivo no número de fibras

mielinicas ao longo do processo de regeneração³⁸⁻⁴⁰. O fato da contagem da 9^a semana suplantar a do grupo controle (OSEM), ao nosso ver é decorrente do menor diâmetro que as fibras deste grupo apresentam em relação ao controle, fibras as quais seriam mais "imaturas" que as de maior diâmetro. Tanto isto nos parece verdade, que o rato IX-9SEM (Figura 9), que foi o que apresentou maior semelhança qualitativa de fibras em relação ao grupo O SEM, e também uma melhor pontuação clínica, apresentou uma quantidade de fibras menor que os ratos XI-9SEM, V-7SEM e VIII-7SEM. Porém, como realizamos apenas 2 animais por grupo, uma comparação estatística entre eles não se mostraria adequada.

Quando comparamos os resultados de nossa análise de comportamento clínico e histométrico (Gráfico 3), podemos observar que uma maior pontuação clínica é acompanhada por uma maior contagem de fibras, sobretudo até um "platô" constituído pelos animais dos grupos 7SEM e 9SEM, onde a contagem permanece ascendente e a melhora clínica praticamente se estabiliza. Essa "dissociação" mais tardia entre os dois parâmetros de regeneração neural, que ocorreu nas últimas semanas, nos parece decorrente de dois fatos. Primeiro, que nossa escala de avaliação clínica é um tanto que limitada, já que como ressaltamos anteriormente, o rato não nos oferece uma expressão facial com movimentos muito refinados disponíveis para a mesma. Segundo, que um aumento apenas em número das fibras não necessariamente reflete uma melhora da função final de movimentação, fato também já ressaltado na literatura^{1,7,37,42}.

CONCLUSÃO

Concordamos que não existe um paradigma experimental perfeito para o estudo da recuperação de lesão do NF, porém acreditamos ter estabelecido um método adequado através de análises comportamental e histométrica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Choi D, Dunn LT. Facial nerve repair and regeneration: an overview of basic principles for neurosurgeons. *Acta Neurochir (Wien)* 2001;143:107-14.
2. Bento RF, Miniti A. Comparison between fibrin tissue adhesive, epineurial suture and natural union in the intratemporal facial nerve of cats. *Acta Otolaryngol Suppl* 1989;465:1-36.
3. Khomura E, Yuguchi T, Yoshimine T, Fujinaka T, Koseki N, Sano A, Kishino A, Nakayama C, Sakaki T, Nonaka M, Takemoto O, Hayakawa T. BDNF atelocollagen mini-pellet accelerates facial nerve regeneration. *Brain Research* 1999;849:235-8.
4. Gluck T. Ueber Transplantation, regeneration und entzündliche neubildung. *Berl Klin Wochenschr* 1881;18:529-31.
5. Bunnell S. Suture of the facial nerve within the temporal bone with a report of the first successful case. *Surg Gynec Obst* 1927;45:7-12.
6. Davis L, Perret G, Carroll W. Surgical principles underlying the use of grafts in the repair of peripheral nerve injuries. *Annals of Surg* 1945;121(5):686-98.

7. Toriumi DM, Wollford TJ, Teitlebaum B, Sabnani K, O'Grady K. Growth factors in nerve regeneration. *Facial Plastic Surg Clin North Am* 1997;5(3):289-302.
8. Gilad VH, Tetzlaff WG, Rabey JM, Gilad GM. Accelerated recovery following polyamines and aminoguanidine treatment after facial nerve injury in rats. *Brain Research* 1996;724:141-4.
9. Lindsay RM. Neuron saving schemes. *Nature* 1995;373:289-90.
10. Byers JM, Clark KF, Thompson GC. Effect of pulsed electromagnetic stimulation on facial nerve regeneration. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:383-9.
11. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anatomical Record* 1946;94(2):239-46.
12. Mattox DE, Felix H. Surgical anatomy of the rat facial nerve. *Am J Otol* 1987;8(1):43-7.
13. Spector JG, Lee P, Derby A, Roufa DG. Early stages of facial nerve regeneration through silicone chambers in the rabbit. *Laryngoscope* 1991;101:1109-23.
14. Kinderman NB, Jones KJ. Axotomy-induced changes in ribosomal RNA levels in female hamster facial motoneurons: differential effects of gender and androgen exposure. *Exp Neurol* 1994;126:144-8.
15. Fawcett JP, Bamji SX, Causing CG, Aloyz R, Reader TA, McLean JH, Miller FD. Functional evidence that BDNF is an anterograde neural trophic factor in the CNS. *J Neurosci* 1998;18(8):2808-21.
16. Yuh-Shyang C, Chuan-Jen H, Tien-Chen L, Yanagihara N, Murakami S. Histological rearrangement in the facial nerve and central nuclei following immediate and delayed hypoglossal-facial anastomosis. *Acta Otolaryngol* 2000;120:551-6.
17. David DM. Facial nerve trauma: optimal timing for repair. *Laryngoscope* 1991;101:835-48.
18. Guntinas-Lichius O, Streppel M, Angelov DN, Stennert E, Neiss WF. Effect of delayed facial-facial suture on facial nerve regeneration: a horseradish peroxidase tracing study in the rat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997;117:670-4.
19. Guntinas-Lichius O, Effenberger K, Angelov DN, Klein J, Streppel M, Stennert E, Neiss WF. Delayed rat facial nerve repair leads to accelerated and enhanced muscle reinnervation with reduced collateral axonal sprouting during a definitive period using a cross-anastomosis paradigm. *Exp Neurol* 2000;162:98-111.
20. Jergovic D, Stal P, Lindman D, Lindvall B, Hildebrand C. Changes in a rat facial nerve after facial nerve injury and repair. *Muscle Nerve* 2001 Sept;1202-12.
21. Terao E, Janssens S, Aguilar VDB, Portier MM, Klosen P. In vivo expression of the intermediate filament peripherin in rat motoneurons: modulation by inhibitory and stimulatory signals. *Neurosci* 2000;101(3):679-88.
22. Hol EM, Schwaiger FW, Werner A, Schmitt A, Raivich G, Kreutzberg GW. Regulation of the lim-type homeobox gene islet-1 during neuronal regeneration. *Neurosci* 1999;88(3):917-25.
23. Hass CA, Donath C, Kreutzberg GW. Differential expression of immediate early genes after transection of the facial nerve. *Neurosci* 1993;53(1):91-99.
24. Fernandez E, Pallini R, Marchese E, Lauretti L, La Marca F. Qualitative, morphological, and somatotopic nuclear changes after facial nerve regeneration in adult rats: a possible challenge to the "no new neurons" dogma. *Neurosurg* 1995;37(3):456-63.
25. Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Schulte E, Stennert E. Qualitative image analysis of the chromatolysis in rat facial nerve and hypoglossal motoneurons following axotomy with and without reinnervation. *Cell Tissue Res* 1996;286:537-41.
26. Semba K, Egger MD. The facial "motor" nerve of the rat: control of vibrissal movement and examination of motor and sensory components. *J Comparative Neurol* 1986;247:144-58.
27. Jones KJ, Brown TJ, Damaser M. Neuroprotective effects of gonadal steroids on regenerating peripheral motoneurons. *Brain Res Review* 2001;37:372-82.
28. Jones KJ. Recovery from facial paralysis following crush injury of the facial nerve in hamsters: differential effects of gender and androgen exposure. *Exp Neurology* 1993;121:133-8.
29. Constantinidis J, Akbarian A, Steinhart H, Iro H, Mautes A. Morphological changes of denervated and reinnervated rat facial muscle. *Acta Otolaryngol* 2001;121:763-7.
30. Fernandez E, Pallini R, Marchese E, Lauretti L, Bozzini V, Sbriccoli A. Reconstruction of peripheral nerves: the phenomenon of bilateral reinnervation of muscles originally innervated by unilateral motoneurons. *Neurosurg* 1992;30(3):364-9.
31. Wong BJF, Mattox DE. The effects of polyamines and polyamine inhibitors on rat sciatic and facial nerve regeneration. *Exp Neurol* 1991;111:263-6.
32. Yian CH, Paniello RC, Spector JG. Inhibition of motor nerve regeneration in a rabbit facial nerve model. *Laryngoscope* 2001;111:786-91.
33. Guntinas-Lichius O, Angelov DN, Tomov TL, Dramiga J, Neiss WF, Wewetzer K. Transplantation of olfactory ensheathing cells stimulates the collateral sprouting from axotomized adult rat facial motoneurons. *Exp neurol* 2001;172:70-80.
34. Dauvergne C, Pinganaud G, Buisseret P, Buisseret-Delmas C, Zerari-Mailly F. Reticular premotor neurons projecting to both facial and hypoglossal nuclei receive trigeminal afferents in rats. *Neurosci Lett* 2001;311:109-12.
35. Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 1990;345:440-1.
36. Mattsson P, Aldskogius H, Sevensson M. Nimodipine-induced improved survival rate of facial motor neurons following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *J Neurosurg* 1999;90:760-5.
37. Frykman GK, McMillan PJ, Yegge S. A review of experimental methods measuring peripheral nerve regeneration in animals. *Orthop Clin North Am* 1988;19(1):209-19.
38. Lewin SL, Utley DS, Cheng ET, Verity AN, Terris DJ. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope* 1997;107:992-9.
39. Gershenbaum MR, Roisen FJ. The effects of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on the degeneration and regeneration of crush-lesioned rat sciatic nerves. *Neurosci* 1980;5:1565-80.
40. McQuarrie IG, Grafstein B, Gershon MD. Axonal regeneration in the rat sciatic nerve: effect of a conditioning lesion and of dbcAMP. *Brain Research* 1977;132:443-53.
41. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 1999;194:1-14.
42. Guntinas-Lichius O, Irintchev A, Streppel M, Lenzen M, Grosheva M, Wewetzer K, Neiss WF, Angelov DN. Factors limiting motor recovery after facial nerve transection in the rat: combined structural and functional analyses. *Eur J Neurosci* 2005;21:391-402.