

ANDREI BORIN

**USO DO AMP CÍCLICO NA REGENERAÇÃO DO  
NERVO FACIAL DE RATOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo –  
Escola Paulista de Medicina para a obtenção do Título de  
Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação  
em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Orientador: Prof. Dr. Yotaka Fukuda

Co-orientador: Prof. Dr. José Ricardo Gurgel Testa

SÃO PAULO

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Borin, Andrei

**Uso do AMP cíclico na regeneração do nervo facial de ratos**/Andrei Borin.—São Paulo, 2007.

vii, 55f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista Medicina. Programa de Pós-Graduação em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Título em inglês: Use of cyclic AMP on facial nerve regeneration of rats.

1. Nervo facial. 2. Regeneração nervosa. 3. Ratos 4. AMP cíclico. 5. Histologia.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OTORRINOLARINGOLOGIA  
E CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO

COORDENADOR: Prof. Dr. Luc Louis Maurice Weckx

*“... tentar sempre ir de vento em popa, tentar obter facilmente os sucessos, sem passar por dificuldades nem vicissitudes e sem fazer os máximos esforços, constitui pura ilusão.”*

MAO TSÉ-TUNG

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Laudelirio e Julia Borin, pela paciência.

Ao amigo, colega, sócio e “co-pesquisador”, Ronaldo Nunes Toledo.

Aos professores de otorrinolaringologia, Yotaka Fukuda, José Ricardo Gurgel Testa, Oswaldo Laércio Mendonça Cruz, Paulo de Lima Pontes e Luc Louis Maurice Weckx, pela oportunidade de obter mais este título acadêmico.

Aos professores Paulo Lee Ho (Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan), Silvio Eduardo Duailibi (CINTERGEN), Luiz Eugênio Araújo Moraes Mello (Neurofisiologia UNIFESP/EPM) e Edna Haapalainen (CEME UNIFESP/EPM), por abrirem seus laboratórios para o desenvolvimento desta tese.

Aos “colegas de laboratório”, Márcia, André, Flávia (todos do CEME UNIFESP/EPM) e Ivone (da Neurofisiologia UNIFESP/EPM), pela boa vontade ao me ensinarem.

Às amigas e aos amigos que, direta ou indiretamente, colaboraram para esta tese: Alessandra Zanoni, Carolina Oliveira, Cláudia Regina Figueiredo, Flávia Fazolo, Kátia da Silva Costa, Paula Mattos, Simone Damasceno de Faria, Fábio Akira Suzuki e todos aqueles de quem eu posso ter-me esquecido.

Ao Abul.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

## ÍNDICE

Resumo .....	vii
Introdução .....	1
Objetivo .....	5
Revisão da Literatura .....	6
Método .....	10
Resultados .....	16
Discussão .....	28
Conclusão .....	35
Referências .....	36

## RESUMO

**OBJETIVO:** Estudar a possível influência neurotrófica do nucleotídeo cíclico adenosina monofosfato (AMPc) na regeneração do nervo facial de ratos Wistar.

**MÉTODO:** Trinta e dois animais foram submetidos à transecção completa e sutura imediata do nervo facial direito, sendo divididos em expostos e não expostos à aplicação tópica de AMPc, com análises comportamentais (movimentação de vibrissas e fechamento da rima palpebral) e histométrica (contagem de fibras mielinizadas) em dois períodos - 14 e 28 dias após a lesão.

**RESULTADO:** Encontramos diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) na análise comportamental, no 14º dia, e na análise histométrica, nos 14º e 28º dias, sugerindo uma precocidade na regeneração do nervo facial exposto ao AMPc. **CONCLUSÃO:** Nosso estudo constatou um possível efeito neurotrófico do AMPc na regeneração do nervo facial em ratos.

1. Nervo facial; 2. Regeneração nervosa; 3. Ratos; 4. AMP cíclico; 5. Histologia.



## INTRODUÇÃO

---

*“Nossa ciência é uma gota, nossa ignorância um mar.”*  
WILLIAM JAMES

O famoso livro de anatomia humana Gardner/Gray/O’Rahilly define que a mímica facial é exercida por 22 grupos musculares derivados do segundo arco branquial, os quais, em conjunto, permitem as quase que infindáveis formas de expressões humanas (O’Rahilly, 1988). Todos esses músculos são inervados pela divisão motora do 7º nervo craniano - o facial. Se isto não fosse suficientemente enfático para demonstrar a importância deste nervo, ele é ainda responsável pela motricidade de músculos cervicais, pela eferência do reflexo estapediano, pela inervação sensitiva de parte da orelha externa, por parte da capacidade sensorial gustativa e pelo controle autônomo de glândulas exócrinas. Assim, considerando todas as possibilidades funcionais desempenhadas por nervos (motora, sensitiva, sensorial e autônoma), o nervo facial assume todas elas. Trata-se de um nervo *completo* no sentido “literal” da palavra: *“adjetiva ao que não falta nada no que pode ter”* (Ferreira, 1994).

A lesão do nervo facial proporciona graves disfunções, com impactos cosméticos, funcionais e psicológicos nas pessoas acometidas (Bento e Miniti, 1989; Testa e Fukuda, 1993; Kohmura et al, 1999; Choi e Dunn, 2001). As deficiências sensorial, sensitiva e autônoma, em geral têm importância menor, já que as inervações contralateral e por outros nervos acabam por minimizá-las. Porém, no aspecto motor, uma lesão do nervo facial se faz sentir em toda sua magnitude, devido à quase exclusividade da sua distribuição homolateral, bem como por uma exteriorização dramática na face do paciente. Funcionalmente prejudica a mastigação, a proteção ocular, a fala e as manifestações emocionais tão características na comunicação humana, gerando graves discriminações que uma pessoa de rosto disforme sofre em nossa sociedade.

Desde 1881 já encontramos relatos de tentativas, ainda que com resultados pouco expressivos, de correções cirúrgicas de nervos faciais lesados, mas é só em 1927 que Bunnell reporta um caso de sucesso (Gluck, 1881; Bunnell, 1927). Muito se deveu aos dois grandes conflitos bélicos mundiais do século passado no estudo das lesões de nervos (Davis et al, 1945). Na Primeira Guerra Mundial, descreveram-se particularmente os achados de exame físico e métodos diagnósticos para estas lesões, mas pouca atenção se deu à sua reparação. Na Segunda Guerra Mundial, adotou-se como regra um maior cuidado na descrição médica do tipo de lesão e reparação efetuadas, culminando, em 1942, no “Senior Consultant in Neurologic Surgery to the European Theater of Operations”, no qual já se defendia a sutura alinhada, pouco tensa e precoce. Discutia-se também o uso de sulfonamida tópica para propiciar um melhor resultado funcional. Já era na época uma maneira de procurar otimizar o procedimento.

Muito se avançou nestes anos, porém as técnicas atuais em relação à reparação de nervos faciais lesados ainda apresentam resultados ímpios (Bento e Miniti, 1989; Gilad et al, 1996; Toriumi et al, 1997; Choi e Dunn, 2001). À parte aos estudos sobre a técnica cirúrgica em si, diversos fatores vêm sendo estudados para tentar melhorar os resultados da regeneração de nervos periféricos após lesões. Levi-Montalcini e Hamburger (1951) observaram que alguns tumores eram capazes de induzir o crescimento exacerbado de nervos periféricos, aventando que os mesmos deveriam produzir substâncias endógenas para tal. Desde então, lesões de nervos faciais são utilizadas em paradigmas experimentais para se estudar o efeito de diversos fatores físicos, químicos e biológicos sobre a sua regeneração. Pesquisas já demonstraram efeitos positivos na recuperação destas lesões quando realizada a exposição dos animais a pulsos eletromagnéticos, a realização de implante de células no local da lesão e a aplicação tópica e/ou sistêmica de diversas substâncias como “nerve growth factor”, “fibroblast growth factor”, “glial derived neurotrophic factor”, “platelet derived growth factor”, “insulin-like growth factor 1”, “ciliary neurotrophic factor”, testosterona, estradiol, nimodipina, “brain derived neurotrophic factor” e poliaminas, entre outras (Sendtner et al, 1990; Jones, 1993; Kinderman e Jones, 1994; Lindsay, 1995; Gilad et al, 1996; Toriumi et al, 1997; Byers et al,

1998; Kohmura et al, 1999; Mattsson et al, 1999; Choi e Dunn, 2001; Guntina-Lichius et al, 2001; Jones et al 2001). Hefti (1994) definiu como fatores neurotróficos as proteínas capazes de regular a sobrevivência e a diferenciação de células neurais, o desenvolvimento e a manutenção da integridade do sistema nervoso e a plasticidade neuronal. Atualmente se questiona tal definição, uma vez que não só proteínas exercem esta função neurotrófica, como também se reconhecem outras propriedades desses fatores, como a de serem facilitadores do crescimento neural, auxiliares na ramificação nervosa, indutores do anabolismo neuronal, moduladores da neurotransmissão e da condutibilidade elétrica (Oliveira e Bernal, 2002).

O nucleotídeo adenosina monofosfato cíclico (AMPc) é derivado de um anel de purina, sendo formado a partir da adenosina trifosfato, pela adenilato ciclase, e degradado em adenosina monofosfato (AMP) pela fosfodiesterase (ver ANEXO I) (Martin Jr, 1982). Desde a descrição de sua estrutura molecular em 1957 por Sutherland e Rall, o sistema de resposta mediado pelo AMPc foi comprovado em todas as células eucariotas, e a sua enzima formadora foi isolada em todos os tecidos de mamíferos já testados (Rall, 1982; Darnell et al, 1990). Ocupa hoje o papel de principal mensageiro intracelular na resposta a diversos estímulos metabólicos (Darnell et al, 1990; Junqueira e Carneiro, 1997; Sampath et al, 2002). Inicialmente estudado nas pesquisas sobre o efeito do glucagon em hepatócitos, este nucleotídeo intracelular vem sendo responsabilizado por uma série de eventos intracelulares, desde o controle do tônus e do inotropismo cardíacos até a maturação de células ovarianas e a atividade das células adrenais (Rall et al, 1956; Darnell et al, 1990; Katz, 1990). Vários estudos atuais vêm correlacionando esta molécula também à resistência ou susceptibilidade de células tumorais a quimioterápicos, sendo sua manipulação um dos caminhos promissores para potencializar o tratamento de diversos tipos de neoplasias (Ciardello e Tortora, 1998; Lerner et al, 2000; Cho-Chung et al, 2002). Tradicional na cultura hindu, a erva *Coleus forskohlii* é indicada para insônia, convulsão e doenças cardíacas, sendo sua atuação farmacológica explicada através do estímulo da adenilato ciclase (Worley et al, 1987).

Diversos estudos vêm esclarecendo o papel do AMPc no sistema neurológico. Clinicamente, está envolvido no crescimento de tumores como

astrocitomas, ependimomas e adenomas hipofisários, e na expressão protéica específica de neurônios de pacientes com doença de Alzheimer, entre outros (Wolozin et al, 1993; Woods et al, 2002). Em culturas de células, influencia desde a sobrevivência e a diferenciação neuronal de “PC 12 cells”, até a produção de mielina por células de Schwann, incluindo também o estabelecimento de sinapses interneuronais e o nível de atividade de células gliais (Nirenberg et al, 1983; Sobue e Pleasure, 1984; Ho e Raw, 1992; Melcangi et al, 1995; Cheng e Feldman, 1997; Hong et al, 1998; Lambeng et al, 2001; Piiper et al, 2002). Em animais, parece estar relacionado à capacidade de resistência à hipoxia dos neurônios das tartarugas durante mergulhos prolongados e também à extrema capacidade de regeneração da medula espinal de peixes (Hochachka et al, 1996; Bhatt et al, 2004). Em ratos, na década de 70 do século passado, foi testado na recuperação de nervos ciáticos, mas com resultados conflitantes (Pichichero et al, 1973; McQuarrie et al, 1977; Black e Lasek, 1979). Na década de 80, novos resultados promissores na recuperação de nervos ciáticos de roedores com o uso de AMPc são relatados na literatura (Gershenbaum e Roisen, 1980; Kilmer e Carlsen, 1987). Não encontramos trabalhos na literatura que avaliassem a influência do AMPc na regeneração de nervos faciais de mamíferos, sendo nossa proposta de trabalho estudá-la.

---

## OBJETIVO

*“... para quem a sabedoria não valia a pena se não fosse possível se servir dela para inventar uma nova maneira de preparar feijão.”*

GABRIEL GARCIA MARQUEZ

Analisar em paradigma experimental a possível influência neurotrófica da administração tópica do nucleotídeo adenosina monofosfato cíclico (AMPC) na regeneração do nervo facial de ratos, através de parâmetros comportamentais e histométricos.

---

## REVISÃO DA LITERATURA

*“Apenas uma pequena parte do pensamento universal repousa sobre o conhecimento próprio; a maior parte é devido às experiências de épocas precedentes.”*

ADOLF HITLER

De acordo com as orientações atuais do Programa de Pós-graduação em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da UNIFESP-EPM, a revisão bibliográfica apresentada deve ficar restrita àqueles trabalhos com tema, objetivo e método semelhantes aos da tese (“classe A”) e aos com tema e objetivo semelhantes, mas com metodologia diferente (“classe B”). Em nossas pesquisas, baseadas no MEDLINE (1966-2006) e LILACS, não encontramos nenhuma referência no cruzamento dos descritores “nervo facial” e “AMP cíclico”. Trabalhos “classe B” que justificam a pesquisa do AMPc como possível fator neurotrófico são apresentados sob forma esquemática:

### TRABALHOS “IN VITRO”

#### **Roisen, Murphy e Braden (1972)**

- **MODELO:** cultura de neurônios sensitivos de embrião de galinha.
- **ACHADO:** o dibutiril-AMPc (1 e 5 mM) teve efeito estimulante na cultura semelhante ao “Nerve Growth Factor” (controle positivo); efeito menor foi constatado com AMPc (5 mM); e nulo com AMP (5 mM) e salina (controle negativo).
- **DISCUSSÃO:**
  1. o AMPc estimularia a cultura neuronal por influenciar a formação de microtúbulos;
  2. o dibutiril-AMPc teria uma ação maior que AMPc puro por penetrar mais nas células e ser menos susceptível à AMPc-fosfodiesterase.

### **Sobue e Pleasure (1984)**

- MODELO: cultura de células de Schwann de ratos.
- ACHADO: o dibutiril-AMPc (1 mM) e o bromo-AMPc (1 mM) estimularam a produção de mielina nas células de Schwann.
- DISCUSSÃO: o aumento do AMPc estimularia a maturação das células de Schwann.

### **Zabrenetzky, Krygier-Brévarit e Spencer (1984)**

- MODELO: membrana celular de células de Schwann de nervo ciático de ratos.
- ACHADO: o AMPc estimulou a atividade das proteínas quinases que controlam a produção de mielina nas células de Schwann.
- DISCUSSÃO: o AMPc estimularia a produção de mielina pelas células de Schwann.

### **Cheng e Feldman (1997)**

- MODELO: cultura de células de Schwann de ratos.
- ACHADO: a adição de 1 mM de bromo-AMPc levou à diferenciação e expressão de mielina nas culturas.
- DISCUSSÃO: confirmaria a estimulação das células de Schwann pelo AMPc.

## TRABALHOS "IN VIVO"

### **Appenzeller e Palmer (1972)**

- MODELO: lesão do nervo ciático de rato por esmagamento (10 segundos).
- ACHADO: o AMPc dosado no nervo se elevou após 1 hora da lesão, atingindo um pico em 24 horas.

- DISCUSSÃO: o AMPc poderia participar do processo regenerativo desencadeado após a lesão neural, podendo estar envolvido no estímulo do próprio neurônio e/ou das células de Schwann.

#### **Pichichero, Beer e Clody (1973)**

- MODELO: lesão do nervo ciático de rato por esmagamento (2 segundos) e por secção parcial.
- ACHADO: a administração de 50 mg/kg/dia de dibutiril-AMPc intramuscular provocou melhora dos testes de sensibilidade, sendo mais precoce a recuperação em relação ao controle (no 7º dia, quando utilizada a esmagadura do nervo, e no 12º dia, quando houve a secção parcial).
- DISCUSSÃO: o estímulo com AMPc levaria a uma recuperação mais precoce da capacidade sensitiva do nervo ciático.

#### **McQuarrie, Grafstein e Gershon (1977)**

- MODELO: lesão do nervo ciático de rato por esmagamento (10 segundos).
- ACHADO: a administração de 50 mg/kg/dia de dibutiril-AMPc intramuscular não provocou melhora dos testes sensitivos e nem do padrão histológico do nervo (até 9º dia) em relação ao controle.
- DISCUSSÃO: o estímulo com AMPc não promoveria a regeneração neural.

#### **Black e Lasek (1979)**

- MODELO: lesão do nervo ciático de rato por esmagamento (5-7 segundos).
- ACHADO: a administração de 50 mg/kg/dia de dibutiril-AMPc intramuscular não estimulou a regeneração de neurônios motores (até 8º dia) através da análise histológica com marcador anterógrado.
- DISCUSSÃO: o estímulo com AMPc não promoveria a regeneração neural.

#### **Gershenbaum e Roisen (1980)**

- MODELO: lesão do nervo ciático de rato por esmagamento (10 segundos).



- ACHADO: a administração de 50 mg/kg/dia de dibutilil-AMPc intramuscular estimulou a recuperação sensitiva (a partir do 12º dia) e acelerou a degeneração Walleriana e a formação de novas fibras neurais (a partir do 10º dia) em análise por microscopia eletrônica.
- DISCUSSÃO: o AMPc aceleraria a regeneração neural por ação no próprio axônio e/ou nas células de Schwann.

#### **Kilmer e Carlsen (1984)**

- MODELO: lesão do nervo ciático de rã por congelamento.
- ACHADO: a aplicação tópica de “forskolin” (estimulador da adenilato ciclase) levou a uma recuperação sensitiva acelerada, por análise através de marcador anterógrado injetado no gânglio dorsal.
- DISCUSSÃO: a elevação do AMPc endógeno celular estimularia regeneração neural por influenciar na síntese de RNA (no núcleo celular) e/ou na formação de microtúbulos (ação local).

#### **Kilmer e Carlsen (1987)**

- MODELO: lesão do nervo ciático de hamster por esmagamento (30 segundos).
- ACHADO: as aplicações tópicas de “forskolin” (estimulador da adenilato ciclase), de dibutilil-AMPc, de bromo-AMPc e de teofilina (inibidor da AMPc-fosfodiesterase) estimularam a recuperação sensitiva a partir do 6º dia.
- DISCUSSÃO: o aumento endógeno e exógeno do AMPc no sítio de lesão estimularia a regeneração neural.

#### **Bhatt, Otto, Depoister e Fetcho (2004)**

- MODELO: medula espinal de peixe lesada por transecção.
- ACHADO: injeção de dibutilil-AMPc em corpos neuronais estimulou o crescimento do axônio na medula espinal.
- DISCUSSÃO: o AMPc estimularia a regeneração no sistema nervoso central.



Para a liberação do AMPc junto ao sítio de sutura neural, utilizamos bombas osmóticas (Alzet<sup>®</sup> Mini-osmotic Pump model 2002) acopladas a cateter próprio de polietileno, que garantem a entrega da solução em estudo na quantidade de 0,5 µl/hora, por 14 dias. Nos grupos 1 e 3 foi utilizada uma solução de dibutilil-AMPc 1mM, produzida através da manipulação de sal da Sigma<sup>®</sup> (“N<sup>6</sup>,2′-O-dibutiryladenosine 3′:5′-cyclic monophosphate”) diluído em RL. As bombas foram mantidas em um banho com solução de cloreto de sódio 0,9%, a 37° C, por um período de 6 horas antes da implantação, pré-requisito para a utilização da mesma acoplada a cateter, conforme orientação do próprio fabricante. Nos grupos 2 e 4 os mesmos procedimentos foram adotados, mas as bombas foram preenchidas com RL padrão.

No “D 0” os animais foram submetidos ao **procedimento cirúrgico inicial**, utilizando-se microscópio cirúrgico DF-Vasconcelos<sup>®</sup> M90, observando os seguintes passos: 1) anestesia com cloridrato de xilasina 2% (0,5 ml/Kg de peso) e cloridrato de quetamina 10% (0,9 ml/Kg de peso) intraperitoneal; 2) tricotomia retroauricular direita; 3) incisão vertical retroauricular interessando pele, subcutâneo e platisma; 4) dissecação roma e identificação da margem tendinosa do músculo clavotrapeziano, tronco do nervo facial e veia jugular externa; 5) secção completa do tronco do nervo facial com microtesoura a aproximadamente 2-3 mm de sua emergência (entre margem tendinosa do clavotrapeziano e veia jugular externa) e imediata sutura epineural com um ponto de nylon 9-0; 6) confecção de “loja” no subcutâneo da região interescapular para locar a bomba osmótica e posicionamento da ponta do cateter a aproximadamente 2 mm da sutura neural, sendo fixada com prolene 7-0 a ponta do cateter e com nylon 5-0 no músculo clavotrapeziano; 7) fechamento da pele e subcutâneo com pontos separados de nylon 4-0.

Em dias alternados e consecutivos à cirurgia (D1, D3, D5...) – até completar 14 ou 28 dias, de acordo com o grupo – os animais foram submetidos à **observação comportamental 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, a amplitude e a frequência das vibrissas, foi dado um valor numérico, conforme a escala que segue confeccionada em nosso estudo piloto sobre o tema (Borin et al, 2006).

QUADRO 1 – Pontuação clínica da movimentação das vibrissas

PONTOS	MOVIMENTO
0	Sem movimento
1	Tremor leve
2	Movimentação efetiva, mas com posicionamento das vibrissas posteriorizado em relação ao contralateral
3	Movimentação efetiva e com posicionamento semelhante ao contralateral, mas com amplitude e frequência inferiores
4	Movimentação efetiva com posicionamento e amplitude semelhantes ao contralateral, mas com frequência inferior
5	Movimentação efetiva com posicionamento, amplitude e frequência semelhantes ao contralateral

Nestes mesmos dias, observamos também o fechamento palpebral dos animais mediante estímulo de jato de ar, produzido pela compressão rápida do êmbolo de uma seringa de 20 ml direcionado contra cada globo ocular. Aqui, não comparamos o lado direito (lesado) ao lado esquerdo (não lesado), pois, devido ao posicionamento lateralizado dos olhos destes animais, não conseguimos estimular os dois lados simultaneamente. Levando-se em conta o fechamento palpebral observado, foi dado um valor numérico, conforme a escala a seguir também definida em nosso estudo piloto sobre o tema (Borin et al, 2006).

QUADRO 2 – Pontuação clínica do fechamento da rima palpebral

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

Após 14 ou 28 dias, de acordo com o grupo em que se encontravam, os animais foram sacrificados através da superdosagem dos mesmos anestésicos utilizados na cirurgia inicial. Nova dissecação do nervo facial direito permitiu a localização da sutura neural prévia, sendo retirado o fragmento distal a esta para análise histológica. Também se realizou a retirada do tronco do nervo facial contralateral (esquerdo) de todos os ratos, sendo enviados em conjunto 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 0,1 M pH 7,4), sendo então processados para análise histológica no CEME-UNIFESP/EPM (Centro de Microscopia Eletrônica), seguindo o protocolo: 1) quatro lavagens sucessivas em solução tampão cacodilato de sódio (0,1 M pH 7,4), sendo que as duas primeiras lavagens em temperatura ambiente por 15 minutos, a terceira a 4° C por 12 horas e a quarta a temperatura ambiente por 15 minutos; 2) pós-fixação com tetróxido de ósmio 2% em solução tampão cacodilato de sódio (0,1 M pH 7,4) por uma hora, seguida por duas lavagens rápidas (1 minuto) e sucessivas com água destilada; 3) imersão em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% por 30 minutos, seguida de duas lavagens rápidas (1 minuto) e sucessivas com água destilada; 4) 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); 5) dois banhos de imersão consecutivos em óxido de propileno por 20 minutos cada; 6) infiltração em mistura de resina tipo Araldite 502<sup>®</sup>: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, e colocação em resina pura por quatro a cinco horas em vácuo; 7) transferência para moldes de inclusão, sendo orientados horizontalmente para obtenção de cortes transversais dos nervos, seguido de polimerização da resina em estufa a 60° C por 72 horas.

Os blocos obtidos após este preparo foram aparados e cortados em ultramicrótomo Leica Reichert Ultracuts<sup>®</sup>, com navalhas de vidro, obtendo-se cortes 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<sup>®</sup> acoplado a um sistema analisador de imagem Leica Quantimet 500 QWIN<sup>®</sup>, com imagens digitalizadas através de câmera Sony XC 003P<sup>®</sup>. 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 15 cm para realização de uma análise histológica qualitativa e quantitativa da regeneração neural, através da análise das fibras mielinizadas.

Para a **análise histológica qualitativa**, as fotos foram dispostas seqüencialmente de acordo com o tempo entre lesão e sacrifício do animal, sendo observada a presença de fibras mielinizadas e a sua distribuição no nervo.

Para a **análise histológica quantitativa**, foi confeccionada uma “máscara” de 10 x 15 cm em uma folha plástica transparente, na qual foram desenhadas 18 “janelas” de 1,5 x 1,5 cm, numeradas de 1 a 18, distribuídas de maneira uniforme em 3 linhas (6 “janelas” por linha). Através de um sorteio randômico, foram escolhidas 3 “janelas” por linha para se realizar uma contagem de fibras mielinizadas, num total de 9 “janelas” por foto, correspondendo à uma área total de 6399,679 µm<sup>2</sup> por nervo. Esta contagem obedeceu ao método histométrico clássico 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 (Abercrombie, 1946). Foram desconsiderados nas contagens aqueles só parcialmente inclusos, interceptados pelas arestas inferior e direita. As contagens de cada uma destas nove “janelas” foram somadas, obtendo-se o resultado total para cada rato nos quesitos: nervo facial esquerdo, nervo facial direito e razão direito/esquerdo. 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 devido às fibras estarem cortadas obliquamente, ou ainda com 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, a janela seguinte à mesma foi escolhida. Em caso de necessidade de substituir as janelas 6, 12 ou 18 (finais das linhas), optamos pela 1, 7 e 13 respectivamente (iniciais das linhas).

A **análise estatística** dos dados baseou-se na combinação de dois eventos: intervenção (droga - administração ou não de AMPc) e tempo (período - 14 ou 28 dias). Foram analisados os dados obtidos para cada grupo quanto a:

- 1) pontuação clínica da movimentação das vibrissas;
- 2) pontuação clínica do fechamento da rima palpebral;
- 3) pontuação clínica total (vibrissas + rima palpebral);
- 4) contagem das fibras do nervo facial esquerdo;
- 5) contagem das fibras do nervo facial direito;
- 6) razão direito/esquerdo da contagem de fibras.

Para a análise comparativa, utilizamos o teste de análise de variância (ANOVA) por se tratar de três ou mais grupos e de informações com mensuração numérica em amostras independentes, buscando detectar possíveis diferenças nas médias dos grupos. Uma vez detectada uma diferença, aplicamos um teste de “comparações múltiplas” (POST HOC) para localizar esta diferença (Maxwell e Satake, 1997). O nível de significância adotado foi de 5%.

## RESULTADOS

---

*“Aquele modesta ciência, que distingue o um do dois e do três. Refiro-me em resumo à ciência dos números e do cálculo. Ou não é ela de tal modo que toda arte e ciência é forçada a ter parte nela?”*  
PLATÃO

Foram submetidos à cirurgia inicial trinta e dois animais, oito em cada grupo experimental. Com uma semana de pós-operatório, observamos a ocorrência de uma formação tumoral amolecida envolvendo a bomba osmótica do animal “AMPc 9”, sendo o mesmo sacrificado e detectado um processo inflamatório encapsulado, com conteúdo purulento envolvendo a mesma. Descartamos este animal do estudo e submetemos mais um ao procedimento cirúrgico, completando novamente oito espécimes por grupo. Utilizamos, assim, trinta e três animais neste estudo.

Durante a realização do sacrifício dos animais, tivemos a impressão subjetiva de uma maior aderência entre os tecidos durante a dissecação do tronco facial direito nos animais dos grupos AMPc 14D e AMPc 28D. Além disso, seus nervos faciais aparentemente apresentavam um “maior diâmetro”, sendo estas impressões subjetivas anotadas em suas fichas de observação. Não encontramos dificuldades em localizar a sutura epineural realizada anteriormente, retirando com segurança o segmento distal à mesma em todos os animais.

### 1) Observação Comportamental

Todos os dados relativos à observação comportamental com as respectivas pontuações clínicas se encontram reproduzidos no APÊNDICE I. Observamos uma melhora da movimentação facial temporalmente em todos os quesitos e em todos os grupos. Seguem as análises descritivas e comparativas para cada quesito de pontuação clínica.



### 1.1) Pontuação clínica da movimentação de vibrissas

Tabela 1.1.1 – Médias e Desvios-padrão da pontuação clínica da movimentação de vibrissas

Período		CTRL	AMPc
14 dias	Média	0,750	0,946
	Desvio-padrão	0,148	0,264
	n	8	8
28 dias	Média	1,321	1,241
	Desvio-padrão	0,273	0,235
	n	8	8

Tabela 1.1.2 – Teste ANOVA para pontuação clínica da movimentação de vibrissas

EFEITO	(p)
Droga	0,4908
Período	<0,0001 *
Droga x Período	0,1071

Tabela 1.1.3 – Teste POST HOC para pontuação clínica da movimentação de vibrissas

	CTRL 14D	CTRL 28D	AMPc 14D
CTRL 28D	<0,0001*		
AMPc 14D	0,1058	0,0035*	
AMPc 28D	<0,0001*	0,4999	0,0183*

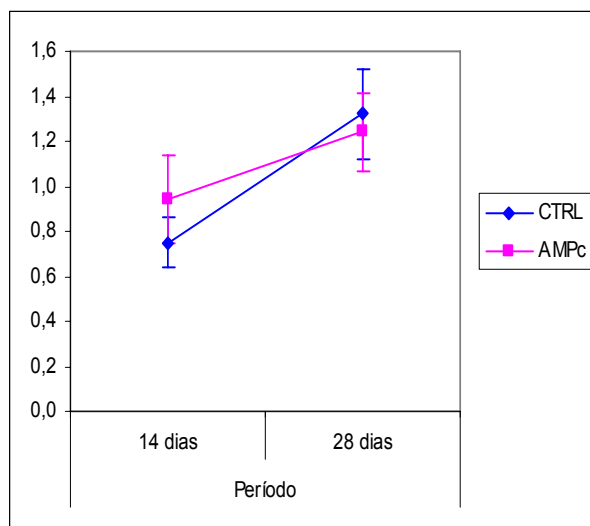


Gráfico 1.1 – Pontuação clínica da movimentação de vibrissas (Intervalo de confiança para a média: média  $\pm$  1,96 \* desvio-padrão /  $\sqrt{(n-1)}$ )

**INTERPRETAÇÃO:** Por meio de comparações múltiplas temos que, independentemente da presença ou não do AMPc, os grupos de 28 dias apresentaram maiores índices que os grupos de 14 dias.

## 1.2) Pontuação clínica do fechamento da rima palpebral

Tabela 1.2.1 – Médias e Desvios-padrão da pontuação clínica do fechamento da rima palpebral

Período		CTRL	AMPc
14 dias	Média	1,089	1,768
	Desvio-padrão	0,295	0,540
	n	8	8
28 dias	Média	2,143	2,295
	Desvio-padrão	0,589	0,436
	n	8	8

Tabela 1.2.2 – Teste ANOVA para pontuação clínica do fechamento da rima palpebral

EFEITO	(p)
Droga	0,0206 *
Período	<0,0001 *
Droga x Período	0,1306

Tabela 1.2.3 – Teste POST HOC para pontuação clínica do fechamento da rima palpebral

	CTRL 14D	CTRL 28D	AMPc 14D
CTRL 28D	<b>0,0001*</b>		
AMPc 14D	<b>0,0084*</b>	0,1282	
AMPc 28D	<b>&lt;0,0001*</b>	0,5308	<b>0,0360*</b>

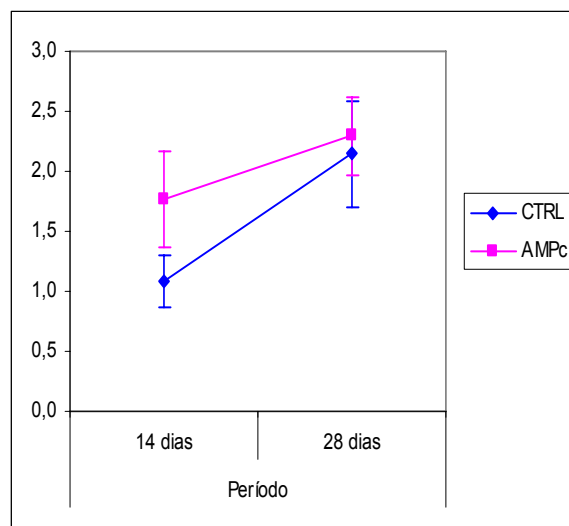


Gráfico 1.2 – Pontuação clínica do fechamento da rima palpebral (Intervalo de confiança para a média: média  $\pm$  1,96 \* desvio-padrão /  $\sqrt{(n-1)}$ )

**INTERPRETAÇÃO:** Por meio de comparações múltiplas temos que, independentemente da presença ou não do AMPc, os grupos de 28 dias apresentaram maiores índices que os grupos de 14 dias. Além disto, o grupo AMPc 14D apresentou um índice maior que o grupo CTRL 14D.

### 1.3) Pontuação clínica total (vibrissas + rima palpebral)

Tabela 1.3.1 – Médias e Desvios-padrão da pontuação clínica total

Período		CTRL	AMPc
14 dias	Média	1,839	2,714
	Desvio-padrão	0,407	0,752
	n	8	8
28 dias	Média	3,464	3,536
	Desvio-padrão	0,848	0,632
	n	8	8

Tabela 1.3.2 – Teste ANOVA para pontuação clínica total

EFEITO	(p)
Droga	0,0590
Período	<0,0001 *
Droga x Período	0,1058

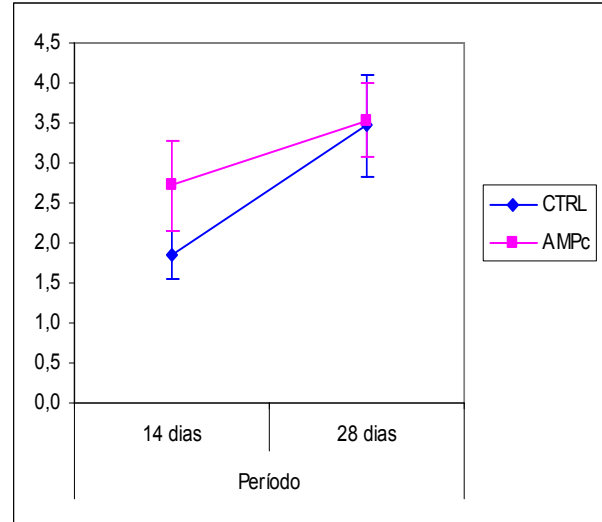


Gráfico 1.3 – Pontuação clínica total (Intervalo de confiança para a média: média  $\pm$  1,96 \* desvio-padrão /  $\sqrt{(n-1)}$ )

Tabela 1.3.3 – Teste POST HOC para pontuação clínica total

	CTRL 14D	CTRL 28D	AMPc 14D
CTRL 28D	<b>0,0001*</b>		
AMPc 14D	<b>0,0157*</b>	<b>0,0358*</b>	
AMPc 28D	<b>&lt;0,0001*</b>	0,8351	<b>0,0225*</b>

**INTERPRETAÇÃO:** Por meio de comparações múltiplas temos que, independentemente da presença ou não do AMPc, os grupos de 28 dias apresentaram maiores índices que os grupos de 14 dias. Houve também uma tendência para o grupo AMPc 14D apresentar um índice maior que o CTRL 14D, porém isto não foi significativo no teste ANOVA.

## 2) Análise Histológica Qualitativa

Obtivemos um total de sessenta e quatro imagens correspondentes aos nervos faciais direito e esquerdo de cada um dos oito animais de cada grupo, disponibilizadas em formato digital no CD apresentado no ANEXO III. Destas, em quatro ocorreu o corte oblíquo de parte das fibras mielinizadas – fotos C16 E (CTRL 14D), C6 E (CTRL 28D), AMP5 E (AMPc 14D) e AMP17 E (AMPc 28D) – fato que não impossibilitou a análise histométrica das mesmas, já que apresentavam ainda um grande percentual de fibras cortadas perpendicularmente, como o ideal.

Comparando as imagens correspondentes ao nervo facial esquerdo (sem lesão) de todos os grupos, não notamos diferenças entre eles. Apresentaram distribuição uniforme, homogênea e regular de fibras mielinizadas por toda a imagem. Apresentamos a FIGURA 1, correspondente ao rato C4 (CTRL 28D), como ilustrativa do padrão acima descrito.

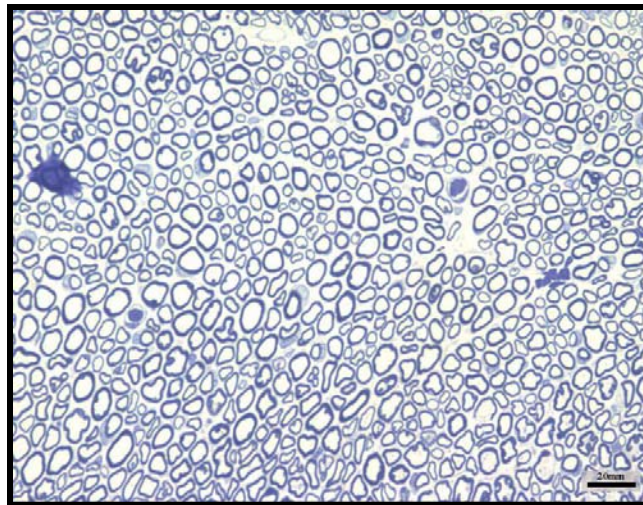


FIGURA 1 – Padrão típico do nervo facial esquerdo (SEM LESÃO) em todos os grupos

Nos grupos CTRL 14D e AMPc 14D, observando as imagens correspondentes ao nervo facial direito (lado lesado), notamos a presença de pequenas fibras mielinizadas, de diâmetro muito inferior, quando comparadas ao respectivo contralateral, muitas vezes agrupadas e não distribuídas

uniformemente pela imagem. Este aspecto nos pareceu um pouco mais evidente em alguns animais que em outros, sendo também mais presente no grupo AMPc 14D que no CTRL 14D. Apresentamos as FIGURAS 2 e 3 – animais AMP7 e C11 respectivamente – para ilustrar estas observações.

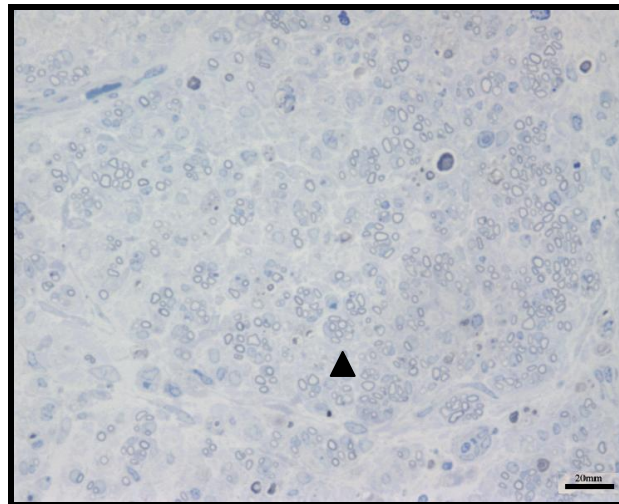


FIGURA 2 – Aspecto típico do nervo facial direito do grupo AMPc 14D (cabeça de seta exemplificando agrupamento de pequenas fibras mielinizadas)

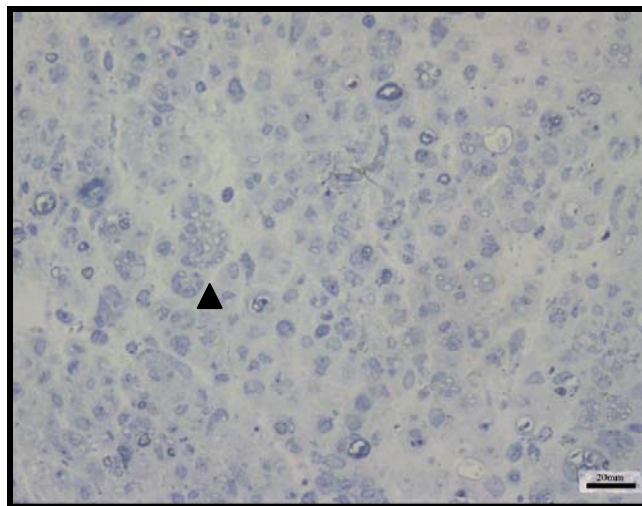


FIGURA 3 – Aspecto típico do nervo facial direito do grupo CTRL 14D (cabeça de seta exemplificando agrupamento de pequenas fibras mielinizadas)

Nos grupos CTRL 28D e AMPc 28D, observando as imagens correspondentes ao nervo facial direito, notamos um maior número e homogeneidade destas pequenas fibras mielinizadas, já não tão agrupadas, mas ainda variando entre os animais de cada grupo e também talvez um tanto mais intensas no grupo CTRL 28D que no AMPc 28D. Notamos, ainda, a presença de algumas fibras de maior diâmetro, já um tanto semelhantes ao lado esquerdo. Apresentamos as FIGURAS 4 e 5 – correspondendo aos animais AMP1 e C2 respectivamente – para ilustrar estas observações.

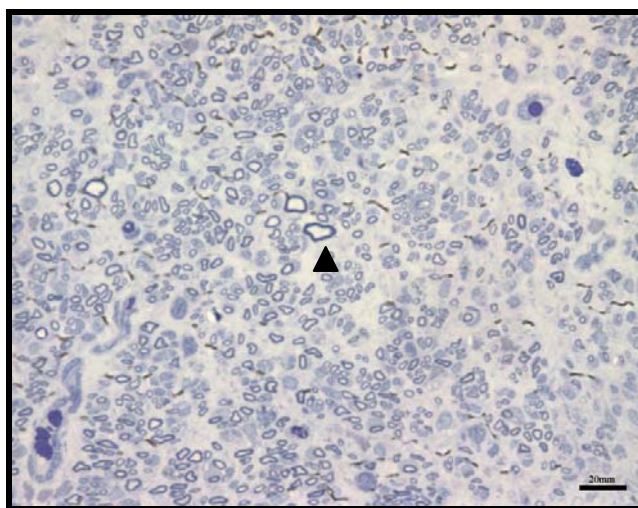


FIGURA 4 – Aspecto típico do nervo facial direito do grupo AMPc 28D (cabeça de seta exemplificando fibra mielinizada de maior diâmetro)

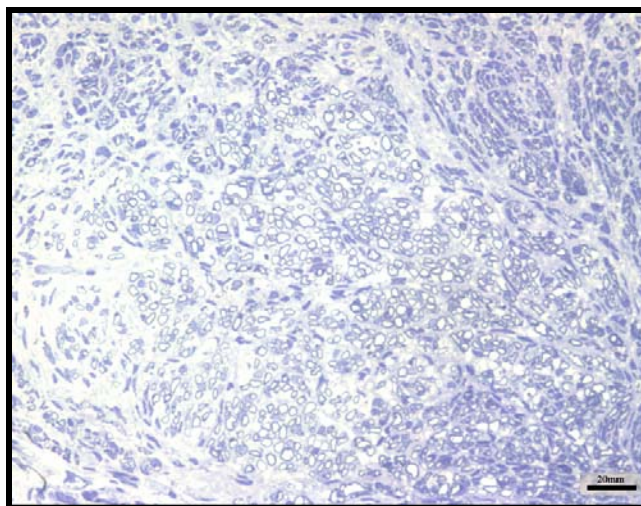


FIGURA 5 – Aspecto típico do nervo facial direito do grupo CTRL 28D

### 3) Análise Histológica Quantitativa (Histométrica)

Os dados relativos à contagem de fibras mielinizadas se encontram integralmente reproduzidos no APÊNDICE II. Durante a realização da mesma, das 576 “janelas” selecionadas por sorteio randômico, 14 delas não se mostraram adequadas para a contagem e foram substituídas - 9 por apresentarem fibras visivelmente cortadas obliquamente e 5 por abrangerem áreas claramente externas ao feixe neural. A análise comparativa referente às contagens de fibras dos lados esquerdo e direito e à razão direito/esquerdo são apresentadas a seguir.



### 3.1) Contagem de fibras mielinizadas do nervo facial esquerdo

Tabela 3.1.1 – Médias e Desvios-padrão da contagem de fibras do nervo facial esquerdo

Período		CTRL	AMPc
14 dias	Média	104,750	110,375
	Desvio-padrão	19,667	23,360
	n	8	8
28 dias	Média	98,625	110,125
	Desvio-padrão	14,232	11,457
	n	8	8

Tabela 3.1.2 – Teste ANOVA para contagem de fibras do nervo facial esquerdo

EFEITO	(p)
Droga	0,1843
Período	0,6163
Droga x Período	0,6441

Tabela 3.1.3 – Teste POST HOC para contagem de fibras do nervo facial esquerdo

**NÃO SE APLICA POIS NÃO HOUVE DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTES NO TESTE ANOVA**

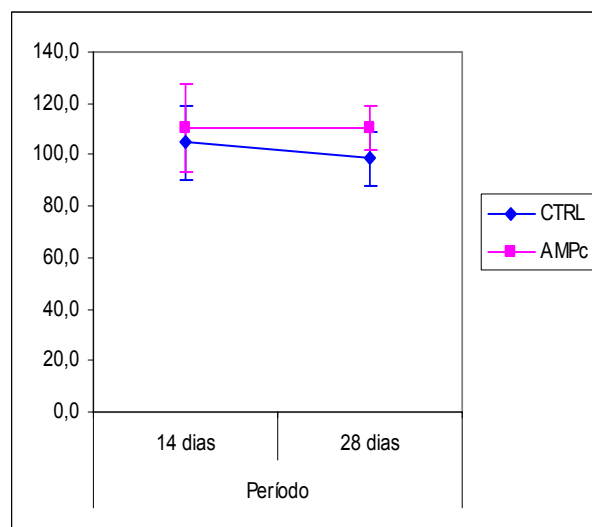


Gráfico 3.1 – Contagem de fibras do nervo facial esquerdo (Intervalo de confiança para a média: média  $\pm$  1,96 \* desvio-padrão /  $\sqrt{(n-1)}$ )

**INTERPRETAÇÃO:** Nenhum dos quatro grupos demonstrou resultados estatisticamente diferentes.



### 3.2) Contagem de fibras mielinizadas do nervo facial direito

Tabela 3.2.1 – Médias e Desvios-padrão da contagem de fibras do nervo facial direito

Período		CTRL	AMPc
14 dias	Média	9,375	32,625
	Desvio-padrão	11,488	24,160
	n	8	8
28 dias	Média	123,250	92,125
	Desvio-padrão	16,816	13,021
	n	8	8

Tabela 3.2.2 – Teste ANOVA para contagem de fibras do nervo facial direito

EFEITO	(p)
Droga	0,5199
Período	<0,0001 *
Droga x Período	<0,0001 *

Tabela 3.2.3 – Teste POST HOC para contagem de fibras do nervo facial direito

	CTRL 14D	CTRL 28D	AMPc 14D
CTRL 28D	<0,0001*		
AMPc 14D	0,0111*	<0,0001*	
AMPc 28D	<0,0001*	0,0011*	<0,0001*

**INTERPRETAÇÃO:** Por meio de comparações múltiplas temos que, independentemente da presença ou não do AMPc, os grupos de 28 dias apresentaram maiores contagens que os grupos de 14 dias. Já o grupo AMPc 14D apresentou uma contagem superior ao grupo CTRL 14D, e o grupo AMPc 28D, menor que CTRL 28D.

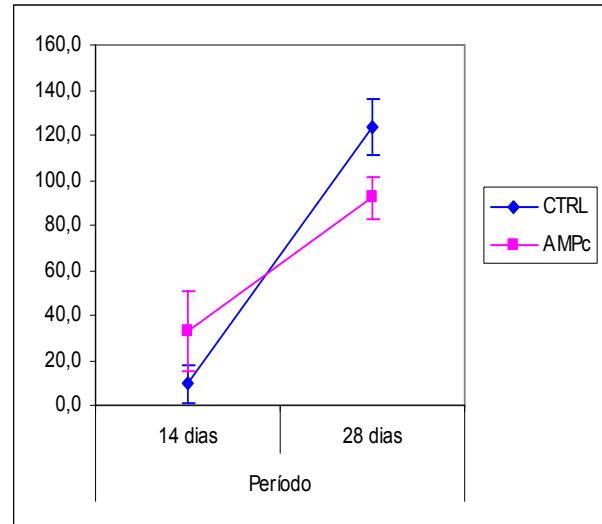


Gráfico 3.2 – Contagem de fibras do nervo facial direito (Intervalo de confiança para a média: média  $\pm$  1,96 \* desvio-padrão /  $\sqrt{(n-1)}$ )

### 3.3) Razão direito/esquerdo da contagem de fibras

Tabela 3.3.1 – Médias e Desvios-padrão da razão direito/esquerdo da contagem de fibras (valores em %)

Período		CTRL	AMPc
14 dias	Média	9,695	30,603
	Desvio-padrão	11,913	24,090
	n	8	8
28 dias	Média	127,531	84,590
	Desvio-padrão	26,981	15,472
	n	8	8

Tabela 3.3.2 – Teste ANOVA para razão direito/esquerdo da contagem de fibras

EFEITO	(p)
Droga	0,1407
Período	<0,0001 *
Droga x Período	0,0001 *

Tabela 3.3.3 – Teste POST HOC para razão direito/esquerdo da contagem de fibras

	CTRL 14D	CTRL 28D	AMPc 14D
CTRL 28D	<0,0001*		
AMPc 14D	0,0415*	<0,0001*	
AMPc 28D	<0,0001*	0,0003*	<0,0001*

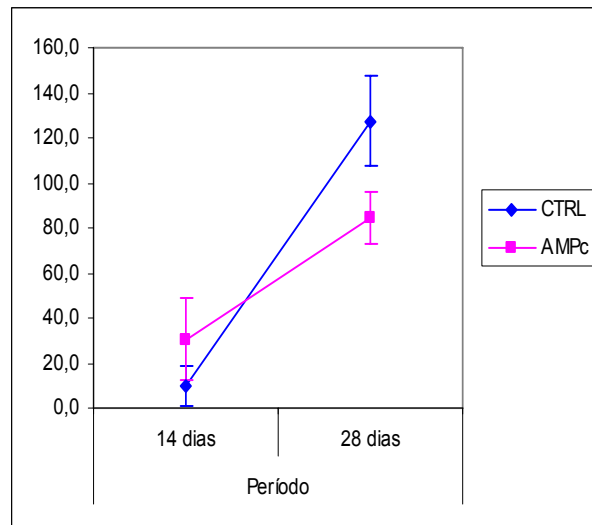


Gráfico 3.1 – Razão direito/esquerdo da contagem de fibras (Intervalo de confiança para a média: média  $\pm$  1,96 \* desvio-padrão /  $\sqrt{(n-1)}$ )

**INTERPRETAÇÃO:** Por meio de comparações múltiplas temos que, independentemente da presença ou não do AMPc, os grupos de 28 dias apresentaram índices maiores que os grupos de 14 dias. Já o grupo AMPc 14D apresentou um índice maior que o grupo CTRL 14D, e o grupo AMPc 28D, menor que CTRL 28D.

#### 4) Resumo dos resultados

Adotando um nível de significância de 5%, podemos apresentar o quadro a seguir como resumo das análises comparativas entre os diversos quesitos.

Quadro 3 – Resumo dos resultados encontrados adotando uma significância de 5%.

QUESITO	RESULTADO
movimento de vibrissas	AMPc 14D = CTRL 14D < AMPc 28D = CTRL 28D
fechamento da rima palpebral	AMPc 14D > CTRL 14D < AMPc 28D = CTRL 28D
total clínico (vibrissas + rima palpebral)	AMPc 14D = CTRL 14D < AMPc 28D = CTRL 28D
contagem fibras nervo esquerdo (não lesado)	AMPc 14D = CTRL 14D = AMPc 28D = CTRL 28D
contagem fibras nervo direito (lesado)	AMPc 14D > CTRL 14D < AMPc 28D < CTRL 28D
razão direito/esquerdo contagem de fibras	AMPc 14D > CTRL 14D < AMPc 28D < CTRL 28D

*“... o conhecimento científico tem propriedades fractais; não importa o quanto aprendemos, seja o que for que sobrar, por menor que possa parecer, é tão infinitamente complexo quanto o foi no começo.”*

ISAAC ASIMOV

Estudos sobre AMPc exógeno influenciando o crescimento e a diferenciação celulares são incertos e dependentes do tipo e do momento do ciclo celular estudado (Friedman, 1982). Diversos autores aventam um possível papel neurotrófico da administração exógena de AMPc baseados em evidências experimentais “in vitro”, como: estímulo positivo na cultura de neurônios; aumento em número e maturação de colônias de células de Schwann; aumento da atividade de células gliais; diferenciação neuronal de “PC12 cell”; aumento de sinapses entre neurônios (Roisen et al, 1972; Friedman, 1982; Niremberg et al 1983; Sobue e Pleasure, 1984; Ho e Raw, 1992; Melcangi et al, 1995; Cheng e Feldman, 1997; Hong et al, 1998; Lambeng et al, 2001; Piiper et al, 2002). Em modelo “in vivo” apresenta também resultados promissores quando correlacionado à aceleração da recuperação de lesões de medula espinal em peixes (Bhatt et al 2004).

Estudos sobre a influência da administração exógena sistêmica de AMPc na regeneração de nervos periféricos em roedores apresentam resultados conflitantes. Pichichero et al (1973) defenderam que a administração diária de AMPc em ratos acelerou a recuperação da lesão do nervo ciático por esmagamento, quando analisada uma escala comportamental. Porém, McQuarrie et al (1977), realizando também uma lesão por esmagamento, não encontraram evidências de uma possível ação neurotrófica do AMPc quando utilizada uma análise comportamental e histológica, fato corroborado por Black e Lasek (1979). Na década seguinte, Gershenbaum e Roisen (1980) repetem o modelo de esmagamento do ciático em ratos e a administração diária sistêmica de AMPc, encontrando evidências comportamentais e histológicas (por microscopia

eletrônica) de efeitos benéficos na recuperação neural. Muito desse aparente conflito entre trabalhos pode ser explicado por uma crítica à metodologia utilizada.

O modelo utilizado por estes autores, o do esmagamento do nervo ciático, é, a nosso ver, não homogêneo em relação à lesão, pois, como relatado, o tempo de esmagamento variou de 2 a 30 segundos e não se mensurou a “pressão” utilizada para tanto. O tempo de análise dos resultados também variou, sendo observada uma resposta positiva nos trabalhos de Pichichero et al (1973) e Gershenbaum e Roisen (1980) após o 12º dia, enquanto os trabalhos de McQuarrie et al (1977) e Black e Lasek (1979) foram encerrados com 9 e 8 dias, respectivamente. Além disto, alguns autores só utilizaram avaliações comportamentais, enquanto outros associaram análises histológicas.

Em 1984, Kilmer e Carlsen (1984) realizaram a aplicação tópica de “forskolin”, um estimulador da adenilato ciclase que promove aumentos endógenos de AMPc, com resultados positivos na regeneração do nervo ciático em anfíbios. Os mesmos autores, trabalhando com hamster e utilizando modelo de esmagamento do ciático, propuseram a entrega do AMPc por “pellets” no local da lesão neural, encontrando resultados promissores (Kilmer e Carlsen, 1987). Estudos sobre a influência da administração exógena de AMPc devem garantir a penetração desta substância na célula, já que a mesma não possui receptores extracelulares, sendo exclusivamente de ação intracelular (Rall, 1982). Os análogos dibutiril-AMPc ou bromo-AMPc suprem esta exigência e se mostram também menos susceptíveis à ação das fosfodiesterases, tendo uma ação mais evidente que o nucleotídeo puro (Roisen et al, 1972; Lerner et al, 2000). Consideramos como preferencial a administração tópica de fatores de crescimento, prevendo que seu possível uso em humanos utilizaria uma dose menor do que no seu uso sistêmico, tendo assim um menor risco de efeitos colaterais (Kohmura et al, 1999). Além disso, diversos fatores neurotróficos apresentam ação em outros grupos celulares, o que poderia hipoteticamente estimular o desenvolvimento de tumores quando utilizado sistemicamente, dúvida em muito semelhante ao que acontece na reposição hormonal estrogênica em pacientes com antecedentes familiares de câncer de mama. Outra vantagem na aplicação tópica é o fato de utilizarmos o nervo

contralateral como controle do lado lesado (Guntinas-Lichius et al, 1997; Kohmura et al, 1999; Moran e Graeber, 2004).

A partir desta análise crítica de trabalhos precedentes, optamos por algumas modificações metodológicas em nosso trabalho. Decidimos realizar a secção completa e sutura do nervo, por se tratar de uma lesão mais reprodutível, já que esta é sempre grau V na classificação de Sunderland, sendo ainda a que reproduz melhor a correção cirúrgica realizada em nervos de seres humanos (Barrs, 1991; Wong e Mattox, 1991; Guntinas-Lichius et al, 1997). A sutura com apenas um ponto no nervo facial foi utilizada por uma questão de limitação técnica, e concordamos que pode representar mais uma “aproximação” dos cotos que uma sutura epineural totalmente efetiva, porém esta mesma técnica foi utilizada por outros autores e considerada adequada (Fernandez et al, 1992; Fernandez et al 1995). Optamos, também, pela entrega tópica de dibutiril-AMPC pelos motivos acima. Além disto, escolhemos estender nosso trabalho até o 28º dia, para garantir uma avaliação mais confiável e, também, associar as avaliações comportamentais e histológicas a fim de aumentar sua objetividade. Uma discussão mais profunda sobre a metodologia adotada pelo nosso grupo de estudo se encontra em artigo publicado (Borin et al, 2006).

Nossa análise comportamental demonstrou uma recuperação acelerada do fechamento da rima palpebral pelo AMPC (tabela 1.2.1), mas não da movimentação de vibrissas (tabela 1.1.1), no 14º dia, sendo este efeito não detectado quando analisados os animais no 28º dia. Essa observação coaduna com a de outros autores que ressaltam ser o retorno parcial do “blink reflex” o sinal mais precoce de recuperação do nervo facial em modelos experimentais (Jones, 1993; Costa et al, 2006). Além disto, Kohmura et al (1999), pesquisando o efeito neurotrófico do “brain derived neurotrophic factor” (BDNF) em nervos faciais de ratos, vivenciaram uma situação muito semelhante, na qual o fator em questão teve um efeito na precocidade da recuperação clínica nos primeiros 14 dias, que não se manteve após 23 dias. Assim, parece-nos que o AMPC poderia estimular a precocidade da recuperação, mas não seus resultados finais funcionais, fato que voltaremos a discutir quando abordarmos nossos resultados histológicos. Além disto, é inegável

que nossa análise de mímica facial em ratos apresenta uma série de limitações quanto à percepção de nuances de expressões, quando comparadas às escalas utilizadas na prática clínica em humanos. Perdemos, assim, a capacidade de detectar diferenças mais sutis em momentos mais avançados de recuperação da motricidade da face dos ratos.

Ainda discutindo nossos achados comportamentais, poderíamos estranhar que, em tão pouco tempo, nossos animais já demonstrassem movimentação facial. Gershbaum e Roisen (1980) ficaram estupefatos com o fato do nervo ciático de ratos demonstrar atividade clínica após dois a três dias da lesão. Em nosso estudo piloto (Borin et al, 2006), também já havíamos detectado um retorno de aproximadamente 35% da função facial em 3 semanas e de 60% em 5 semanas. Kohmura et al (1999) também notaram esta recuperação precoce com 14 dias após a transecção completa e sutura de nervos faciais de ratos, fato igualmente destacado por outros autores (Moran e Graeber, 2004). Isto poderia representar uma “inervação cruzada”, refletindo a atividade do núcleo facial contralateral, como sugerido por alguns autores, inervação pelo trigêmio da musculatura da face e/ou uma taxa de regeneração acentuadamente maior no rato que no homem, conforme proposto por outros (Boyle, 1966; Gershenbaum e Roisen 1980; Fernandez et al, 1992; Fernandez et al, 1995; Guntinas-Lichius et al, 1996).

Optamos por realizar uma análise comportamental, porque esta reflete não apenas o aspecto anatômico, mas também o resultado final do processo de regeneração, que é a recuperação da funcionalidade do movimento facial (Choi e Dunn, 2001). Porém, ela apresenta maior subjetividade e menor reprodutibilidade (Frykman et al, 1988). Associamos, então, uma avaliação histométrica por microscopia óptica das fibras mielinizadas do nervo para tentar fortalecer nossas análises (Costa et al, 2006).

A contagem de fibras do nervo facial esquerdo (lado não lesado) não variou significativamente nos quatro grupos deste experimento (tabela 3.1.1). Isto confirma não só os achados que descrevem a não variabilidade deste critério interespécimes, mesmo de pesos e idades diferentes, como também possibilita a

utilização das amostras do lado não lesado como controle do lado lesado (Semba e Egger, 1986; Guntinas-Lichius et al, 1997; Chen et al, 2000; Yian et al, 2001).

Os dados referentes à contagem de fibras mielinizadas do nervo facial direito (lado lesado) (tabela 3.2.1) no 14º dia demonstraram um aumento significativo desta no grupo exposto ao AMPc quando comparado com o controle, fato este confirmado pelas análises da razão direito/esquerdo (tabela 3.3.1). Aparentemente, o AMPc estimulou um início precoce da regeneração neural, acelerando o brotamento axonal a partir do coto proximal. Tais constatações são baseadas não só na superioridade numérica de fibras encontradas, mas também no aspecto descrito em nossa análise qualitativa da histologia, onde encontramos grupamentos de pequenas fibras em “blocos”, aspecto que pode corresponder ao corte transversal de “botões de crescimento neurais” constituídos de pequenas fibras imaturas, como descrito por outros autores (McQuarrie et al, 1977; Hildebrand et al, 1986; Lewin et al, 1997; Guntinas-Lichius et al, 2001; Costa et al, 2006). Através de microscopia eletrônica, Gershenbaum e Roisen (1980) detectaram que, em modelo de nervo ciático de ratos, o AMPc acelerou o início da degeneração Walleriana, no 3º dia pós-lesão, e também descreveram uma superioridade numérica na contagem de fibras, no 10º dia, no grupo exposto ao nucleotídeo.

Diversos autores aventam inúmeros mecanismos através dos quais o AMPc poderia ter uma ação estimuladora na regeneração neural, porém são afirmações que se mantêm inconclusivas (Gershenbaum e Roisen, 1980; Kilmer e Carlsen, 1987). Influências na expressão gênica e no citoesqueleto de diversos grupos celulares envolvidos em regeneração neural já foram demonstradas (Roisen et al, 1972; Zor, 1983; Kilmer e Carlsen, 1984; Hochachka et al 1996; Montiminy et al, 1996; Cho-Chung et al, 2002). Acredita-se que o nucleotídeo poderia estimular as populações neuronais em si e também as de “suporte”, como a microglia, macrófagos e células de Schwann (Friedman, 1982; Niremberg et al, 1983; Sobue e Pleasure, 1984; Melcangi et al, 1995; Cheng e Feldman, 1997). Promoveria, assim, a “limpeza” do sítio de lesão ao estimular a remoção de restos celulares, aceleraria a degeneração Walleriana, a mielinização e também o desenvolvimento do botão de crescimento neuronal, por ação no núcleo celular do neurônio e no sítio de lesão (Appenzeller e Palmer, 1972; Gershenbaum



e Roisen, 1980; Kilmer e Carlsen, 1984; Kilmer e Carlsen, 1987). Nosso estudo não contemplou a investigação do mecanismo de ação do AMPc e, portanto, aceitamos as suposições destes autores.

No 28º dia, encontramos uma inversão do achado histométrico anterior, quando a contagem do grupo controle suplantou a do grupo exposto ao nucleotídeo (tabela 3.2.1), e também ao próprio lado contralateral (razão direito/esquerdo 127%) (tabela 3.3.1). Este resultado, aparentemente conflitante, pode ser explicado por diversas hipóteses. Em nosso desenho experimental, o AMPc foi “entregue” pela bomba osmótica apenas nos primeiros 14 dias, ficando as duas semanas seguintes sem ação. Isto poderia sugerir que a ação neurotrófica do nucleotídeo seria garantida apenas na presença deste, desaparecendo no período seguinte e gerando até uma perda daquelas fibras inicialmente “hiperestimuladas”. Além disto, outros autores defendem que o brotamento neural é estimulado por fatores locais como o AMPc, enquanto o alongamento depende de mudanças metabólicas no corpo nuclear do neurônio e que, por isso, uma entrega tópica poderia perder o efeito no decorrer do tempo (Kilmer e Carlsen, 1987). Quanto ao fato da contagem do lado direito suplantar a do lado esquerdo no grupo CTRL 28D, McQuarrie et al (1977) afirmaram que, após a lesão unilateral do nervo ciático, a contagem de fibras do lado lesado suplantou em 40% a do lado não lesado, atribuindo o fato à ocorrência de um múltiplo brotamento. Isto também foi constatado por Byers et al (1998), em estudo de regeneração do nervo facial em ratos.

Em culturas celulares, os fatores neurotróficos podem induzir uma diferenciação celular com mudanças fenotípicas, acompanhada de uma queda na contagem numérica. Em culturas de células originárias de neuroblastomas, por exemplo, o AMPc aumenta o seu grau de diferenciação (por estimular o surgimento de dendritos), ao mesmo tempo em que diminui o número total de células (Friedman, 1982). Assim, no nosso estudo, poderíamos estar presenciando uma precocidade no brotamento axonal, com um efeito secundário de queda no número total de fibras em regeneração. Caso isto seja verdadeiro, aparentemente

não afetaria o resultado funcional final, já que a análise comportamental dos grupos AMPc 28D e CTRL 28D mostraram-se similares.

Outra explicação seria o fato de, no decorrer da regeneração, algumas fibras iniciais presentes nos botões de crescimento irem aos poucos sendo “selecionadas como vencedoras”, aumentando seu diâmetro e mielinização, para melhorar sua capacidade de condução, enquanto outras seriam perdidas em virtude de sua ineficiência (Boyle, 1966; Hildebrand et al, 1986; Lewin et al, 1997; Chen et al, 2000; Guntinas-Lichius et al, 1997; Guntinas-Lichius et al, 2000). Kohmura et al (1999), estudando o papel do BDNF na recuperação do nervo facial de rato submetido a transecção e sutura, analisaram a regeneração neural por hibridização “in situ” da expressão do RNA mensageiro (RNAm) da proteína GAP43, a qual participa do crescimento axonal. Encontraram no grupo exposto ao BDNF uma recuperação clínica mais acentuada no 14º dia, acompanhada de uma elevação do RNAm GAP43, enquanto que no 28º dia obtiveram um achado comportamental semelhante entre grupo controle e BDNF, com expressão do RNAm GAP43 mais elevado no grupo controle nesta fase tardia. Atribuíram este achado ao fato do grupo estimulado pelo fator neurotrófico estar numa fase mais “avançada” de regeneração, na qual a expressão desta proteína já estaria baixa. Em similaridade, poderíamos sugerir que o grupo AMPc 28D estaria realmente mais avançado no processo regenerativo, onde já evidenciaríamos um passo além da multiplicação do brotamento, enquanto o CTRL 28D estaria numa fase anterior, ainda aumentando em número e não em eficiência suas fibras, já que funcionalmente os dois grupos atingiram resultados clínicos semelhantes.

Infelizmente nosso paradigma é limitado e não permite refutar ou aceitar nenhuma destas hipóteses. Mudanças metodológicas, como o aumento do tempo de exposição ao AMPc com entregas mais prolongadas, a sua disponibilização direta e/ou sistêmica aos núcleos centrais do facial, análises histológicas em outros períodos como no 21º dia e posteriores ao 28º, e quantificação da mielinização e do diâmetro de fibras, seriam indicadas para a continuidade deste estudo.

## CONCLUSÃO

---

*“Fui porventura compreendido? – Dionísio contra o Crucifixo...”*  
FRIEDRICH NIETZSCHE

Existem evidências comportamentais e histométricas de uma ação neurotrófica desempenhada pela administração tópica de AMP cíclico na fase inicial da regeneração do nervo facial de ratos (14 dias).

## REFERÊNCIAS

*“Li muito. Não sei se fiquei sabendo grande coisa, a não ser que minha ignorância era incomensurável.”*

WILLIAM SOMERSET MAUGHAM

- Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anatom Rec* 1946;94(2):239-46.
- Appenzeller O, Palmer G. The cyclic AMP (adenosine 3'5'-phosphate) content of sciatic nerve: changes after crush. *Brain Res* 1972;42:521-4.
- Barrs DM. Facial nerve trauma: optimal timing for repair. *Laryngoscope* 1991;101:835-48.
- Bento RF, Miniti A. Comparison between fibrin tissue adhesive, epineural suture and natural union in the intratemporal facial nerve of cats. *Acta Otolaryngol Suppl* 1989;465:1-36.
- Bhatt DH, Otto SJ, Depoister B, Fetcho JR. Cyclic AMP-induced repair of zebrafish spinal circuits. *Science* 2004;305:254-8.
- Black MM, Lasek RJ. Slowing of the rate of axonal regeneration during growth and maturation. *Exp Neurol* 1979;63:108-19.
- Borin A, Toledo RN, Faria SD, Testa JRG, Cruz OLM. Modelo experimental comportamental e histológico da regeneração do nervo facial em ratos. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2006;72(6):776-85.
- Boyle WF. Facial-nerve paralysis: an experimental investigation of facial-nerve regeneration in monkeys. *Laryngoscope* 1966;76(12):1921-48.
- 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.
- Byers JM, Clark KF, Thompson GC. Effect of pulsed electromagnetic stimulation on facial nerve regeneration. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:383-9.
- Chen Y-S, Hsu C-J, Liu T-C, 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.
- Cheng HL, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-5 in Schwann cell differentiation. *J Cell Physiol* 1997;171:161-7.
- Cho-Chung YS, Nesterova M, Becker KG, Srivastava R, Park YG, Lee YN, Cho YS, Kim MK, Neary C, Cheadle C. Dissecting the circuitry of protein kinase A and cAMP signaling in cancer genesis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;968:22-36.
- Choi D, Dunn LT. Facial nerve repair and regeneration: an overview of basic principles for neurosurgeons. *Acta Neurochir (Wien)* 2001;143:107-14.
- Ciardello F, Tortora G. Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: biological significance and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 1998;4:821-8.
- Costa HJZR, Silva CF, Korn GP, Lazarini PR. Regeneração pós-traumática do nervo facial em coelhos. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2006;72(6):786-93.
- Darnell J, Lodish H, Baltimore D. *Molecular cell biology*. 2<sup>nd</sup> edition. New York: Scientific American Books; 1990.
- 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.
- 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.

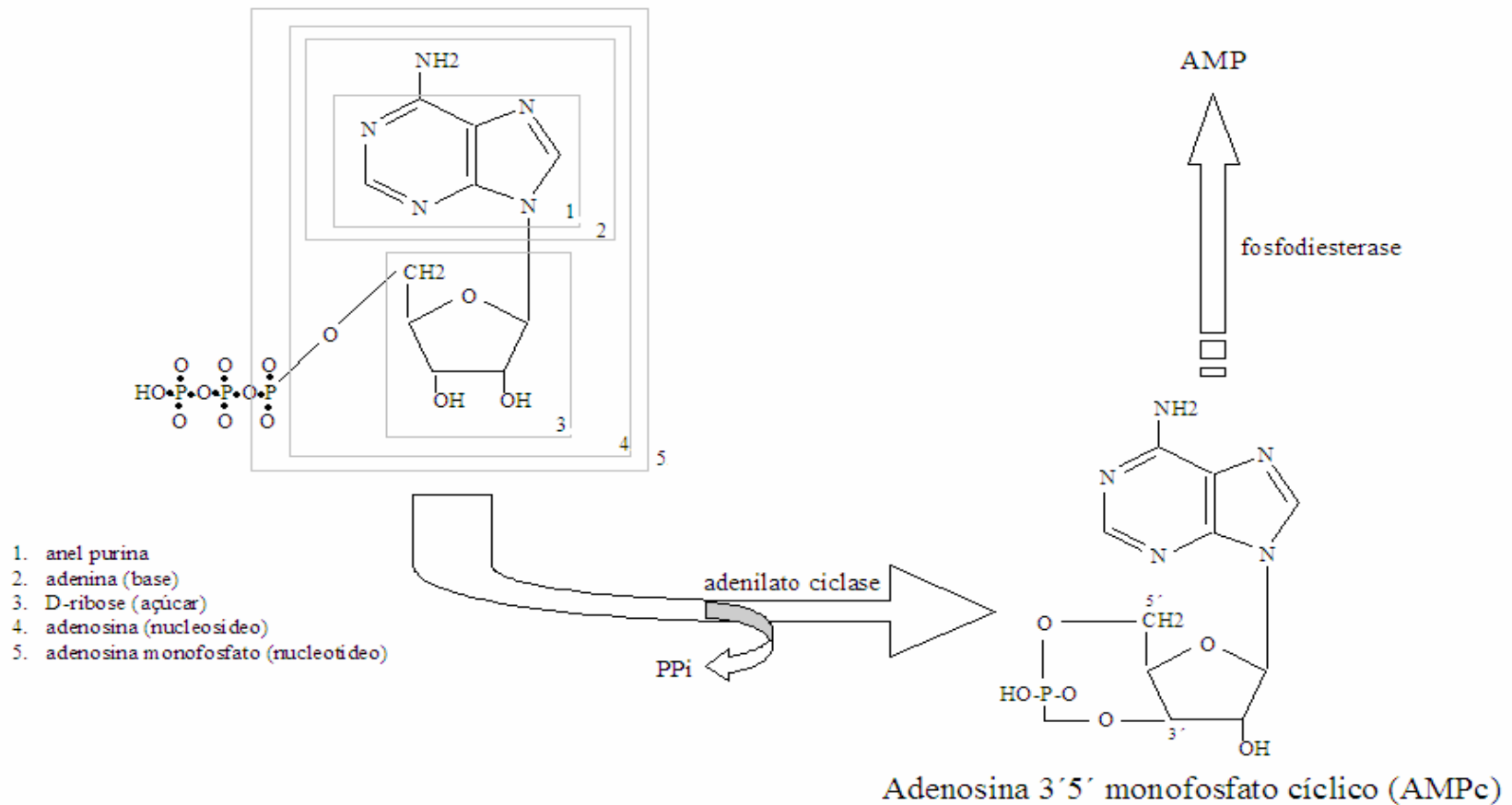
- Fernandez E, Pallini R, Marchese E, Lauretti L, La Marca F. Qualitative, morphological, and somatotopic nuclear changes after facial nerve regeneration in adult rats: a possible challenge to the "no new neurons" dogma. *Neurosurg* 1995;37(3):456-63.
- Ferreira ABH. Novo dicionário básico da língua portuguesa. São Paulo: Nova Fronteira/Folha de São Paulo; 1994.
- Friedman DL. Regulation of the cell cycle and cellular proliferation by cyclic nucleotides. In: Nathanson JA, Kebabian JW. Cyclic nucleotides. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1982. v.58/II, c.18, p.157.
- 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.
- Gershenbaum MR, Roisen FJ. The effects of dibutyl cyclic adenosine monophosphate on the degeneration and regeneration of crush-lesioned rat sciatic nerves. *Neurosci* 1980;5:1565-80.
- 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.
- Gluck T. Ueber Transplantation, regeneration und entzündliche Neubildung. *Berl Klin Wochenschr* 1881;18:529-31.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hefti F. Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases. *J Neurobiol* 1994;25(11):1418-35.
- Hildebrand C, Mustafa GY, Waxman SG. Remodelling of internodes in regenerated rat sciatic nerve: electron microscopic observations. *J Neurocytol* 1986;15:681-92.
- Ho PL, Raw I. Cyclic AMP potentiates bFGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Cell Physiol* 1992;150:647-56.
- Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms of surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:9493-8.
- Hong Y, York RD, Misra-Press A, Carr DW, Stork PJS. The cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase (PKA) is required for the sustained activation of mitogen-activated kinases and gene expression by nerve growth factor. *J Biol Chem* 1998;273(14):8240-7.
- 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.
- Jones KJ, Brown TJ, Damaser M. Neuroprotective effects of gonadal steroids on regenerating peripheral motoneurons. *Brain Res Review* 2001;37:372-82.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. 6a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
- Katz AM. Interplay between inotropic and lusitropic effects of cyclic adenosine monophosphate on the myocardial cell. *Circulation* 1990;82(2): 1-7-11.
- Kilmer SL, Carlsen RC. Forskolin activation of adenylate cyclase in vivo stimulates nerve regeneration. *Nature* 1984;307:455-7.
- Kilmer SL, Carlsen RC. Chronic infusion of agents that increase cyclic AMP concentration enhances the regeneration of mammalian peripheral nerves in vivo. *Exp Neurol* 1987;95:357-67.

- 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.
- Kohmura 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.
- Lambeng N, Michel PP, Agid Y, Ruberg M. The relationship between differentiation and survival in PC12 cells treated with cyclic adenosine monophosphate in the presence of epidermal growth factor or nerve growth factor. *Neurosc Lett* 2001;297:133-6.
- Lerner A, Kim DH, Lee R. The AMPc signaling pathway as a therapeutic target in lymphoid malignancies. *Leuk Lymph* 2000;37(1-2):39-51.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 1951;116:321-62.
- 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.
- Lindsay RM. Neuron saving schemes. *Nature* 1995;373:289-90.
- Martin Jr DW. Nucleotídeos. In: Harper HA, Rodwell VW, Mayes PA, organizadores. *Manual de Química Fisiológica*. São Paulo: Atheneu, 1982. c.10, p.133-41.
- 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.
- Maxwell DL, Satake E. *Research and statistical methods in communications disorders*. EUA: Ed William & Wilkins; 1997.
- 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.
- Melcangi RC, Ballabio M, Magnaghi V, Celotti F. Metabolism of steroids in pure cultures of neurons and glial cells: role of intracellular signaling. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1995;53(1-6):331-6.
- Montiminy M, Brindle P, Arias J, Ferreri K, Armstrong R. Regulation of somatostatin gene transcription by cyclic adenosine monophosphate. *Metabolism* 1996;45(8):4-7.
- Moran LB, Graeber MB. The facial nerve axotomy model. *Brain Res Rev* 2004;(44):154-78.
- Nirenberg M, Wilson S, Higashida H, Rotter A, Krueger K, Busis N, Ray R, Kenimer JG, Adler M. Modulation of synapse formation by cyclic adenosine monophosphate. *Science* 1983;222(4625):794-9.
- O'Rahilly R. Couro cabeludo e face. In: Gardner E, Gray DJ, O'Rahilly R. *Anatomia: estudo regional do corpo humano*. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988. p.642-9.
- Oliveira JAA, Bernal TMO. Fatores neurotróficos de crescimento. In: Campos CAH, Costa HOO, organizadores. *Tratado de Otorrinolaringologia*. São Paulo: Rocca, 2002. v.1, c.9, p.137-55.
- Pichichero M, Beer B, Clody DE. Effects of dibutyryl cyclic AMP on restoration of function of damaged sciatic nerve in rats. *Science* 1973;182:724-5.
- Piiper A, Dikic I, Lutz MP, Leser J, Kronenberger B, Elez R, Cramer H, Müller-Esterl W, Zeuzem S. Cyclic AMP induces transactivation of the receptors for epidermal growth factor and nerve growth factor, thereby modulating activation of MAP kinase, Akt, and neurite outgrowth in PC12 cells. *J Biol Chem* 2002;15:43623-30.
- Rall TW, Sutherland EW, Wosilait WD. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase: III. Reactivation of liver phosphorylase in slices and in extracts. *J Biol Chem* 1956;218:483-95.
- Rall TW. Formation and degradation of cyclic nucleotides: an overview. In: Nathanson JA, Kebedian JW. *Cyclic nucleotides*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1982. v.58/I, c.1, p.3-16.

- Roisen FJ, Murphy RA, Braden WG. Neurite development in vitro. I. The effects of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *J Neurobiol* 1972;3(4):347-68.
- Sampath J, Adachi M, Hatse S, Naesens L, Balzarini J, Flatley R, Matherly L, Schuetz J. Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci* 2002;4(3):1-9.
- 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.
- Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 1990;345:440-1.
- Sobue G, Pleasure D. Schwann cell galactocerebroside induced by derivatives of adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 1984;224(4644):72-4.
- Testa JRG, Fukuda Y. Paralisia facial periférica idiopática: da incidência e dos fatores diagnósticos. *Acta AWHO* 1993;12(1):9-18.
- 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.
- Wolozin B, Lesch P, Lebovics R, Suderland T. Olfactory neuroblasts from Alzheimer donors: studies on APP processing and cell regulation. *Biol Psychiatry* 1993;34:824-38.
- Wong BJB, Mattox DE. The effects of polyamines and polyamine inhibitors on rat sciatic and facial nerve regeneration. *Exp Neurol* 1991;111:263-6.
- Woods SA, Marmor E, Feldkamp M, Lau N, Apicelli AJ, Boss G, Gutmann DH, Guha A. Aberrant G protein signaling in nervous system tumors. *J Neurosurg* 2002;97:627-42.
- Worley PF, Baraban JM, Snyder SH. Beyond receptors: multiple second-messenger systems in brain. *Ann Neurol* 1987;21(3):217-29.
- Yian CH, Paniello RC, Spector JG. Inhibition of motor nerve regeneration in a rabbit facial nerve model. *Laryngoscope* 2001;111:786-91.
- Zabrenetzky V, Krygier-Brévar V, Spencer PS. Cyclic AMP-stimulated protein kinase activity in rabbit peripheral myelin. *Neuroch Res* 1984;9(1):121-32.
- Zor U. Role of cytoskeletal organization in the regulation of adenylate cyclase-cyclic adenosine monophosphate by hormones. *Endoc Rev* 1983;4(1):1-21.

## FORMAÇÃO E DEGRADAÇÃO DO AMPc

Adenosina 5' trifosfato (ATP)





## ANEXO II – Parecer do Comitê de Ética.



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 13 de abril de 2006.  
CEP 1708/05

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) ANDREI BORIN  
Co-Investigadores: Yotaka Fukuda (orientador)  
Disciplina/Departamento: Otorrinolaringologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: Recursos Próprios.

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Estudo experimental sobre a influência do AMP cíclico na recuperação do nervo facial em ratos**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: experimental, categoria C.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.

OBJETIVOS: Testar o uso do AMPc como fator neurotrófico no paradigma de lesão do nervo facial em ratos..

RESUMO: Serão utilizados 32 ratos wistar. Anestésico: ketamina + xilazina. Eutanásia: thionembutal. Será utilizado o modelo de lesão do nervo facial junto ao forame estilomastoide e sutura epineural. Serão constituídos 4 grupos :

1- lesão do nervo + AMPc - sacrifício em 14 dias. 2- lesão do nervo + salina - sacrifício em 14 dias ( controle do grupo 1). 3- lesão do nervo + AMPc -sacrifício em 28 dias. 4- lesão do nervo + salina - sacrifício em 28 dias ( controle do grupo 3). O AMPc será acondicionado em bombas osmóticas implantadas no subcutâneo do animal, com entrega tópica de 0,2ml de solução a 1 milimolar em 14 dias. Serão analisados: parâmetro comportamental, baseado-se em escalas de análise de movimentos faciais de roedores; parâmetro eletrofisiológico, utilizando um eletroestimulador de nervo, determinando o limiar mínimo de contração do nervo facial; parâmetro histológico do nervo facial, avaliado por coloração do segmento distal à lesão inicial, analisando as fibras mielinizadas presentes..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo experimental, utilizando um modelo experimental de lesão do nervo facial, avaliando influência do AMPc na recuperação.

MATERIAL E MÉTODO: .

DETALHAMENTO FINANCEIRO: sem financiamento externo - R\$ 4485,00.

CRONOGRAMA: 6 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 8/4/2007 e 2/4/2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Jpsé Osmar Medina Pestana  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

**ANEXO III** – CD contendo as imagens digitalizadas utilizadas na contagem de fibras mielinizadas.

## ABSTRACT

### Use of cyclic AMP on facial nerve regeneration of rats.

**PURPOSE:** To evaluate the possible neurotrophic influence of cyclic AMP on the facial nerve regeneration of Wistar rats. **METHOD:** Thirty two animals suffered complete transection and immediate suture of the right facial nerve, having been exposed, or not, to topical administration of cyclic AMP. Behavioral and histometric analysis was undertaken in two times – 14 and 28 days. **RESULTS:** We show statistical differences ( $p < 0,05$ ) in the behavioral analysis on the 14<sup>th</sup> day and in the histometric analysis on the 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> days, suggesting an earlier regeneration of the facial nerve when exposed to cAMP. **CONCLUSION:** This study demonstrates a possible neurotrophic effect of cAMP on the facial nerve regeneration of rats.

1. Facial nerve; 2. Nerve regeneration; 3. Rat; 4. Cyclic AMP; 5. Histology.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

DeCS – Descritores em ciências da saúde. (<http://decs.bvs.br>)

Doria Filho U. Introdução à bioestatística para simples mortais. 3ª edição. São Paulo: Negócio Editora, 1999. (ISBN 85-86014-36-2)

Ferreira ABH. Novo dicionário básico da língua portuguesa. São Paulo: Nova Fronteira/Folha de São Paulo, 1994.

Ganança MM, Pontes PAL. Metodologia científica: normatização para redação de teses. Programa de Pós-Graduação em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço; 2005.

Houaiss A. Novo dicionário Folha/Webster's Inglês/Português Português/Inglês. São Paulo: Folha de São Paulo, 1996.

Newman WA. Dorland's illustrated medical dictionary. 25ª edição. Philadelphia: WB Saunder Company, 1994.

Paschoalin MA. Minigramática Paschoalin & Spadoto. São Paulo: FTD, 1997. (ISBN 85-322-2687-6)

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referência. São Paulo, 2001. (ISBN 85-901-8971-6)

Stedman Dicionário Médico. 25ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996 (ISBN 85-277-0327-0)

Sociedade Brasileira de Anatomia. Terminologia anatômica internacional. Editora Manole, 2001. (ISBN 85-204-1105-3)

# APÊNDICE I – DADOS SOBRE OBSERVAÇÃO COMPORTAMENTAL

## MOVIMENTAÇÃO DE VIBRISSAS

<b>CTRL 14D</b>	RATO	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17	D19	D21	D23	D25	D27
	C9	0	0	1	1	1	1	1							
	C10	0	0	1	1	1	1	1							
	C11	0	1	1	1	1	1	1							
	C12	0	0	0	1	1	1	1							
	C13	0	0	1	1	1	1	1							
	C14	0	1	1	1	1	1	2							
	C15	0	1	1	1	1	1	1							
	C16	0	0	0	1	1	1	1							
<b>AMPc 14D</b>	RATO	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17	D19	D21	D23	D25	D27
	AMP4	0	1	2	2	2	2	2							
	AMP5	0	1	1	1	1	1	1							
	AMP6	0	1	1	1	1	1	1							
	AMP7	0	1	1	1	1	1	1							
	AMP8	0	1	1	1	1	1	1							
	AMP10	0	1	1	1	1	1	1							
	AMP11	0	1	1	1	1	1	2							
	AMP12	0	0	1	1	1	1	1							
<b>CTRL 28D</b>	RATO	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17	D19	D21	D23	D25	D27
	C1	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3
	C2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
	C3	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3
	C4	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3
	C5	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	C6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3
	C7	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	C8	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
<b>AMPc 28D</b>	RATO	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17	D19	D21	D23	D25	D27
	AMP1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
	AMP2	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
	AMP3	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
	AMP13	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	AMP14	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
	AMP15	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3
	AMP16	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
	AMP17	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

## FECHAMENTO DA RIMA PALPEBRAL

<b>CTRL 14D</b>	RATO	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17	D19	D21	D23	D25	D27
	C9	1	1	1	1	1	1	1							
	C10	0	1	1	1	1	2	2							
	C11	0	1	1	1	1	1	1							
	C12	0	1	1	1	1	1	1							
	C13	1	1	1	1	2	2	2							
	C14	1	1	1	2	2	2	2							
	C15	0	1	1	1	1	2	2							
	C16	0	0	1	1	1	1	1							
<b>AMPc 14D</b>	RATO	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17	D19	D21	D23	D25	D27
	AMP4	1	2	2	3	3	4	4							
	AMP5	0	0	1	2	2	2	3							
	AMP6	0	1	2	3	3	3	3							
	AMP7	0	1	1	1	2	2	2							
	AMP8	0	0	1	1	2	2	2							
	AMP10	0	1	1	2	2	2	2							
	AMP11	1	2	2	2	2	3	3							
	AMP12	1	1	2	2	2	2	3							
<b>CTRL 14D</b>	RATO	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17	D19	D21	D23	D25	D27
	C1	1	1	1	2	2	2	3	3	4	4	4	4	4	4
	C2	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	3	3
	C3	0	0	1	2	2	2	3	4	4	5	5	5	5	5
	C4	0	0	0	1	1	2	2	2	3	3	4	4	5	5
	C5	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	3	3
	C6	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3
	C7	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	4	4
	C8	0	0	1	1	1	1	2	2	3	3	4	4	4	5
<b>AMPc 28D</b>	RATO	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17	D19	D21	D23	D25	D27
	AMP1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	4	4	4	4	5
	AMP2	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	5	5	5
	AMP3	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	4	4	4
	AMP13	0	0	1	1	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3
	AMP14	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4	5
	AMP15	0	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	4	4	5
	AMP16	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	5
	AMP17	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3

## PONTUAÇÃO CLÍNICA TOTAL

<b>CTRL 14D</b>	RATO	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17	D19	D21	D23	D25	D27
	C9	1	1	2	2	2	2	2							
	C10	0	1	2	2	2	3	3							
	C11	0	2	2	2	2	2	2							
	C12	0	1	1	2	2	2	2							
	C13	1	1	2	2	3	3	3							
	C14	1	2	2	3	3	3	4							
	C15	0	2	2	2	2	3	3							
	C16	0	0	1	2	2	2	2							
<b>AMPc 14D</b>	RATO	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17	D19	D21	D23	D25	D27
	AMP4	1	3	4	5	5	6	6							
	AMP5	0	1	2	3	3	3	4							
	AMP6	0	2	3	4	4	4	4							
	AMP7	0	2	2	2	3	3	3							
	AMP8	0	1	2	2	3	3	3							
	AMP10	0	2	2	3	3	3	3							
	AMP11	1	3	3	3	3	4	5							
	AMP12	1	1	3	3	3	3	4							
<b>CTRL 28D</b>	RATO	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17	D19	D21	D23	D25	D27
	C1	1	2	2	3	3	3	5	5	6	6	6	7	7	7
	C2	0	0	0	1	1	2	2	3	3	3	3	3	5	5
	C3	0	1	2	3	3	3	5	6	6	7	7	7	8	8
	C4	0	0	1	2	2	3	4	4	5	5	6	6	7	8
	C5	0	0	2	2	2	2	2	2	3	3	5	5	5	5
	C6	1	1	2	2	2	2	3	3	3	5	5	5	5	6
	C7	0	1	2	2	2	3	3	3	3	3	5	5	6	6
	C8	0	0	1	2	2	2	3	3	5	5	6	6	6	7
<b>AMPc 28D</b>	RATO	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17	D19	D21	D23	D25	D27
	AMP1	1	1	1	2	2	3	3	3	4	6	6	6	6	7
	AMP2	0	1	2	3	3	4	5	6	6	7	8	8	8	8
	AMP3	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	4	6	6	6
	AMP13	0	0	2	2	2	2	2	3	3	4	5	5	5	5
	AMP14	0	2	2	3	3	3	3	3	3	4	5	5	6	7
	AMP15	0	1	2	3	3	3	3	3	3	5	5	6	7	8
	AMP16	0	2	2	3	3	3	3	3	3	4	4	5	5	7
	AMP17	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4

APÊNDICE II – DADOS DA CONTAGEM DE FIBRAS MIELINIZADAS

<b>CTRL 14D</b>	<b>ESQ</b>									<b>Σ</b>	<b>DIR</b>									<b>Σ</b>	<b>D/E</b>	<b>%</b>	
C9		7	8	3	9	12	10	10	11	11	81		5	5	1	0	3	2	2	3	2	23	28,40
C10		16	11	13	14	16	14	13	14	13	124		0	0	1	1	0	1	0	0	1	4	3,23
C11		12	10	10	11	12	9	10	11	14	99		0	0	1	2	1	0	0	0	0	4	4,04
C12		6	10	11	11	9	8	6	10	7	78		0	0	0	0	0	4	0	0	0	4	5,13
C13		15	15	14	12	14	16	12	13	13	124		1	1	0	0	0	1	0	0	0	3	2,42
C14		12	18	13	18	14	14	9	17	13	128		0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,78
C15		11	13	12	9	9	13	12	8	8	95		1	0	0	0	0	1	1	1	0	4	4,21
C16		13	13	11	9	14	12	10	13	14	109		2	1	5	5	7	2	3	4	3	32	29,36
<b>AMPc 14D</b>	<b>ESQ</b>									<b>Σ</b>	<b>DIR</b>									<b>Σ</b>	<b>D/E</b>	<b>%</b>	
AMP4		16	15	11	13	12	12	12	11	11	113		9	5	6	6	2	6	4	3	5	46	40,71
AMP5		9	12	16	14	15	13	8	16	18	121		3	5	7	6	7	3	8	6	5	50	41,32
AMP6		12	15	11	12	19	17	17	14	11	128		1	0	1	0	2	1	0	1	0	6	4,69
AMP7		17	16	13	17	15	14	18	14	13	137		1	10	9	1	4	11	4	16	6	62	45,26
AMP8		10	8	9	9	7	7	10	10	11	81		0	0	0	0	0	3	0	0	3	6	7,41
AMP10		6	7	8	9	6	8	10	8	7	69		0	1	8	12	7	8	3	4	5	48	69,57
AMP11		13	14	13	10	13	11	13	12	15	114		0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,88
AMP12		14	13	14	13	13	12	13	12	16	120		2	13	9	2	6	0	2	3	5	42	35,00
<b>CTRL 28D</b>	<b>ESQ</b>									<b>Σ</b>	<b>DIR</b>									<b>Σ</b>	<b>D/E</b>	<b>%</b>	
C1		13	14	11	12	12	12	13	11	9	107		13	14	11	13	8	12	10	13	15	109	101,87
C2		17	16	14	12	12	10	15	10	11	117		7	10	14	15	19	10	8	18	14	115	98,29
C3		9	11	11	9	9	10	10	10	8	87		11	13	12	12	14	16	11	15	19	123	141,38
C4		12	7	13	10	9	14	11	12	14	102		11	20	14	19	15	11	12	19	15	136	133,33
C5		7	10	11	8	10	10	7	8	10	81		19	16	17	14	16	15	12	15	14	138	170,37
C6		8	12	10	10	8	12	15	10	11	96		16	17	17	18	14	16	18	17	16	149	155,21
C7		9	14	15	14	13	15	11	12	13	116		17	16	15	16	8	13	7	15	11	118	101,72
C8		6	8	14	8	6	8	12	11	10	83		12	8	13	8	7	10	15	13	12	98	118,07
<b>AMPc 28D</b>	<b>ESQ</b>									<b>Σ</b>	<b>DIR</b>									<b>Σ</b>	<b>D/E</b>	<b>%</b>	
AMP1		14	11	10	13	15	12	13	14	15	117		16	15	8	19	6	11	10	14	13	112	95,73
AMP2		10	13	13	10	11	9	8	10	10	94		12	8	14	13	14	8	11	11	5	96	102,13
AMP3		12	11	12	7	11	10	14	10	8	95		11	12	11	10	14	7	16	13	6	100	105,26
AMP13		14	12	14	15	11	13	14	15	11	119		8	9	9	7	10	7	9	8	6	73	61,34
AMP14		10	15	12	14	13	14	15	14	12	119		11	12	12	6	1	13	14	13	8	90	75,63
AMP15		12	15	15	14	13	14	12	14	12	121		10	18	11	15	7	9	15	6	12	103	85,12
AMP16		16	13	14	16	12	10	11	11	12	115		8	8	8	8	8	11	9	8	14	82	71,30
AMP17		10	13	12	8	10	11	11	14	12	101		4	10	7	10	13	4	4	14	15	81	80,20



*“Foi assim que pude ler meu primeiro conto em letras impressas... Em cada linha ia descobrindo o poder demolidor da letra impressa, pois o que eu havia construído com tanto amor e dor... revelou-se para mim como um monólogo arrevesado e inconsistente, que a duras penas agüentava de pé graças a três ou quatro frases consoladoras.”*

GABRIEL GARCIA MARQUEZ

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)