

Larissa Vilela Pereira

Regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos após transplante de células-tronco multipotentes de polpa dentária indiferenciadas: comparação com células-tronco multipotentes do estroma mesenquimal de medula óssea indiferenciadas e diferenciadas em *Schwann-like*

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

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Dra. Heloisa Juliana
Zabeu Rossi Costa

Versão Corrigida

(Resolução CoPGr 6018/11 de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Este trabalho recebeu auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (proc: 2014/18764-0).

AGRADECIMENTOS

À **Dra Heloisa Juliana Zabeu Rossi Costa**, orientadora deste projeto, por me ajudar em todas as etapas, desde o desenho do estudo, passando pela execução e dissertação. Agradeço por toda paciência, carinho e disponibilidade ao longo desta trajetória. Profissional de conhecimento excepcional e com grande amor pela pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento** pela minha formação como Otorrinolaringologista e por todos os ensinamentos transmitidos desde então. Agradeço imensamente ao ensino de excelência que me foi oferecido na residência e na Pós-Graduação, o que me torna extremamente orgulhosa por ter feito parte do Serviço de Otorrinolaringologia do HC-FMUSP.

A todos os professores, doutores, fellows e ex-fellows, residentes e ex-residentes do Departamento de Otorrinolaringologia do HC-FMUSP por todos os ensinamentos, conquistas e alegrias atingidos nos últimos sete anos.

À **Prof. Dra. Luciana A Haddad** por toda ajuda e disponibilidade no estudo celular. Pesquisadora de formação exemplar, com conhecimento técnico excepcional e com ética admirável. Sua ajuda foi fundamental na conclusão deste projeto.

À **Prof. Dra. Regina C. Migroni-Neto** e à **Dayanne B. Cruz** pelo apoio, disponibilidade e viabilização das células-tronco de polpa dentária a este estudo.

Ao **Prof. Dr. Bryan Strauss** e à **Dra. Daniela B. Zanatta** pelo auxílio na transdução viral.

À **Dra. Jeanne Oiticica, Cláudia Marchi** e a toda equipe do Laboratório de Investigações Médicas (Lim-32) pelo apoio recebido na cultura e expansão celular. Parabéns a todos pela qualidade e excelência do laboratório e das pesquisas realizadas.

À **Dra Raquel Salomone** e à **Dra. Anna Carolina de Oliveira Fonseca** pelos primeiros ensinamentos no Ambulatório de Paralisia Facial do HC-FMUSP. Parabéns pelo trabalho desenvolvido e por toda ajuda e ensinamentos na minha formação.

Ao **Sr. Gaspar, Roberto CabadoModia Jr.** e **Fernanda A Correia Barrence** pela colaboração recebida para a realização do estudo histológico.

Ao **Prof. Dr.Fayez Bahmad Jr.** pelos ensinamentos durante a Faculdade de Medicina, pelo carinho e recepção no meu retorno a Brasília e a toda sua dedicação à Otorrinolaringologia.

Ao Centro de Biotério da USP por todos os serviços prestados no cuidado dos animais.

À minha família por estar ao meu lado durante toda minha caminhada por todo amor, paciência e apoio ao longo de todos os anos da minha formação, em especial à minha mãe, **Neide Vilela**, e ao meu pai, **José Clemente Pereira**, sem os quais nada seria possível.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo primário	3
2.2 Objetivos secundários.....	3
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 Anatomofisiologia do nervo facial.....	4
3.2 Degeneração neural	5
3.3 Técnicas de reparo neural.....	7
3.4 Neuroconduítes	9
3.5 Células de Schwann	11
3.6 Células-tronco	12
3.6.1 Células-tronco de polpa dentária	12
3.6.2 Células-tronco de medula óssea	16
3.8 Modelo animal.....	19
3.9 Anatomia e histologia do nervo facial de ratos	19
3.10 Avaliação funcional objetiva da regeneração neural	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Materiais.....	21
4.1.1 Seleção de animais.....	21
4.2 Métodos.....	22
4.2.1 Obtenção das células multipotentes de polpa dentária	22
4.2.2 Vetor lentiviral.....	23
4.2.3 Grupos de estudo	23

4.2.4 Protocolo anestésico e preparação dos animais	24
4.2.5 Protocolo cirúrgico	24
4.2.6 Sacrifício dos animais.....	27
4.2.7 Protocolo da avaliação funcional objetiva.....	27
4.2.8 Protocolo de avaliação histológica	29
4.2.8.1 Retirada do nervo facial	29
4.2.8.2 Tratamento do nervo retirado.....	29
4.2.8.3 Estudo histopatológico	30
4.2.8.4 Análise histológica qualitativa	31
4.2.8.5 Análise quantitativa.....	31
4.2.8.6 Análise por imunofluorescência indireta	31
4.2.9 Análise estatística	32
5 RESULTADOS	33
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO.....	45
8 ANEXOS.....	46
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Dissecção e individualização dos ramos mandibular e bucal do nervo facial	25
Figura 2. Isolamento do ramo bucal do nervo facial para posterior secção	26
Figura 3. Aspecto final pós-operatório do Grupo B	27
Tabela 1. Descrição da amplitude do PAMC (mV), densidade axonal distal (axônios/ μm^2) e diâmetro axonal (μm) segundo grupos (auto-enxerto e CTPD) e momentos de avaliação.....	33
Figura 4. Densidade axonal distal.....	34
Figura 5. Diâmetro axonal	34
Figura 6. Amplitude do PAMC	35
Tabela 2. Descrição da amplitude do PAMC (mV) segundo grupos e momentos de avaliação.....	35
Figura 7. Corte histológico do nervo facial de rato corado com azul de toluidina a 1% (Microscopia óptica-400x). A= grupo autoenxerto. B= grupo tratado com CTPD.	37
Figura 8. Imunofluorescência evidenciando marcação em lamina A/C nos segmentos distais dos nervos faciais.....	38
Tabela 3. Descrição da amplitude do PAMC (mV) segundo grupos e momentos de avaliação.....	46
Tabela 4. Resultado das comparações múltiplas da amplitude do PAMC.	46
Tabela 5. Descrição da densidade axonal distal (axônios/ μm^2) e diâmetro axonal (μm) segundo grupos e momentos de avaliação.	47

LISTA DE SIGLAS

AL	Alabama
CA	Califórnia
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de projeto de Pesquisa
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas de São Paulo
INCOR	Instituto do Coração
LIM	Laboratório de Investigações Médicas
MA	Massachussets
USA/EUA	Estados Unidos da América
USP	Universidade de São Paulo
	de São Paulo

LISTA DE ABREVIATURAS

CO ₂	Dióxido de carbono
CS	Células de Schwann
CTA	Células-tronco adiposas
CTMO	Células-tronco do estroma mesenquimal da medula óssea
CTMOd	Células-tronco do estroma mesenquimal da medula óssea diferenciadas em <i>Schwann-like</i>
CTMOi	Células-tronco do estroma mesenquimal da medula óssea indiferenciadas
CTPD	Células-tronco de polpa dentária
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DW	Degeneração Walleriana
Ed.	Edição
EMG	Eletroneuromiografia
Et al.	e outros/entre outros
GALB	Gel acelular de lâmina basal purificada
KCl	Cloreto de potássio
MEM	Meio de cultura mínimo
NaCl	Cloreto de sódio
PAMC	Potencial de ação muscular composto
PBS	Solução de tampão fosfato
PFP	Paralisia facial periférica
pLV-Lacz	Vetor lentiviral
USB	<i>Universal serial bus</i>
V.	Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

-	menos/negativo
%	porcentagem
°C	graus Celsius
+	mais/positivo
<	menor que
=	igual a
>	maior que
±	mais ou menos, cerca de
®	registrado
µl	microlitro
µm	micrômetro
µm ²	micrômetro quadrado
G	força gravitacional
g	grama
H	hora
Hz	Hertz
Kg	quilograma
KHz	quiloHertz
M	mol
mA	miliAmpère
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimol
ms	milissegundo
mV	milivolt
n°	número
ng	nanograma
ng/mL	nanograma por mililitro

p	significância estatística
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
U	unidade
X	vezes/multiplicação
Ω	Ohms

RESUMO

Pereira LV. *Regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos após transplante de células-tronco multipotentes de polpa dentária indiferenciadas: comparação com células-tronco multipotentes do estroma mesenquimal de medula óssea indiferenciadas e diferenciadas em Schwann-like* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: As lesões traumáticas graves do nervo facial, relativamente frequentes no cotidiano do otorrinolaringologista, mesmo que reparadas com as melhores técnicas microcirúrgicas, apresentam recuperação funcional extremamente limitada acarretando grande impacto na motricidade facial e, conseqüentemente, na qualidade de vida dos pacientes. **OBJETIVOS:** Avaliar a recuperação funcional (eletro-neuromiografia), histológica (quantitativa e qualitativa) e imunohistoquímica do ramo mandibular do nervo facial de ratos obtidas após autoenxerto combinado a transplante de células-tronco multipotentes de polpa dentária indiferenciadas (CTPD). Seguiu-se comparação com os resultados anteriormente obtidos pelos mesmos pesquisadores e utilizando mesma técnica cirúrgica após transplante de células-tronco de medula óssea indiferenciadas (CTMOi) e diferenciadas em *Schwann-like* (CTMOD). Realizou-se autoenxerto no ramo mandibular do nervo facial de ratos para reparo de GAP de 5mm provocado por duas neurotmeses sequenciais, reimplantação do próprio fragmento retirado, sendo o mesmo envolvido por tubo de ácido poliglicólico (Grupo A) e preenchido com gel acelular de lâmina basal purificada, com transplante de CTPD (grupo B). Após seis semanas, os animais foram sacrificados e as análises realizadas. **RESULTADOS:** Observou-se que, seis semanas após a cirurgia, os animais do grupo tratado com células-tronco apresentaram valores médios de amplitude do potencial de ação muscular composto (PAMC) (CTPD $3,79 \pm 1,74$ mV; CTMOD $2,7 \pm 0,53$ mV; CTMOi $1,81 \pm 0,77$ mV) estatisticamente superiores ao grupo controle ($0,75 \pm 0,46$ mV, $p < 0,001$). Os diâmetros axonais médios, também, foram significativamente maiores nos grupos tratados com células-tronco (CTPD $3,04 \pm 0,49$ μ m; CTMOD $3,5 \pm 0,16$ μ m; CTMOi $3,15 \pm 0,32$ μ m) do que no grupo controle ($2,13 \pm 0,07$ μ m), com valor de $p < 0,001$. A densidade axonal foi estatisticamente superior no grupo controle ($0,021 \pm 0,003$ axônios/ μ m²) quando comparada aos grupos tratados (CTPD $0,014 \pm 0,004$ axônios/ μ m²; CTMOD $0,017 \pm 0,003$ axônios/ μ m²; CTMOi $0,015 \pm 0,002$ axônios/ μ m², $p = 0,004$). Ao ensaio de imunofluorescência, no grupo tratado com CTPD, observou-se células positivas para lamina humana A/C e para S100, evidenciando, assim, a presença de células humanas com fenótipo de Schwann no segmento distal do nervo analisado. No grupo tratado com CTMOi houve marcação em β -galactosidase, mas não em S100, confirmando a presença de células exógenas, porém não diferenciadas em Schwann. Já no grupo tratado com CTMOD demonstrou a presença de células exógenas com fenótipo de Schwann ao observar a comarcação pelos marcadores β -galactosidase e S100, mantendo, assim, o mesmo fenótipo do observado *in vitro*. **CONCLUSÃO:** Conclui-se que, segundo critérios funcionais e histológicos, a regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos foi superior quando associada ao transplante de CTPD comparativamente ao controle. O grupo tratado com CTPD apresentou melhores resultados funcionais e parâmetros histológicos similares aos obtidos com CTMOi e CTMOD. Nos três grupos tratados com células-tronco, as células exógenas foram observadas após 6 semanas de experimento, com

evidência de integração ao tecido neural e evidência de diferenciação *in vivo* para o fenótipo de Schwann apenas no grupo tratado com CTPD.

Descritores: nervo facial, células-tronco, regeneração nervosa, células de schwann, ratos wistar, eletromiografia, condução nervosa, histologia comparada.

ABSTRACT

Pereira LV. *Regeneration of the mandibular branch of rats' facial nerve after transplanting dental pulp stem cells: comparison with undifferentiated mesenchymal stromal stem cells and differentiated Schwann-like cells* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

INTRODUCTION: Traumatic lesions of the facial nerve, relatively frequent of the daily routine of the otorhinolaryngologist, even if when repaired with the best microsurgical techniques, have limited functional recovery causing great impact on facial motricity, consequently, on patients' quality of life. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to evaluate the functional and histological recovery (quantitative and qualitative) and immunohistochemistry of the mandibular branch of the facial nerve of rats obtained after autograft combined with transplantation of multipotent undifferentiated dental pulp stem cells (DPSC). We compared the results obtained previously by the same researchers and using the same surgical technique after transplantation of undifferentiated bone marrow stem cells (uBMSC) and differentiated to Schwann cell-like (dBMSC). **METHODS:** A 5mm gap in the mandibular branch of the facial nerve was performed by two sequential neurotmesis, followed by autograft with reimplantation of the removed fragment itself, tubulization with a polyglycolic acid tube (Group A) and transplantation with DPSC (group B). After six weeks, the animals were sacrificed and analyzes performed. **RESULTS:** Six weeks after surgery, the animals in the stem cells group had mean values of the amplitude of the compound muscle action potential (CMAP) (DPSC 3.79 ± 1.74 mV; dBMSC 2.7 ± 0.53 mV; uBMSC 1.81 ± 0.77 mV) statistically higher than the control group (0.75 ± 0.46 mV, $p < 0.001$). Medium axon diameters were also significantly higher in the stem cells treated groups (DPSC 3.04 ± 0.49 μ m, dBMSC 3.5 ± 0.16 μ m, uBMSC 3.15 ± 0.32 μ m) than in the control group (2.13 ± 0.07 μ m), with a value of $p < 0.001$. The axonal density was statistically higher in the control group (0.021 ± 0.003 axons/ μ m²) when compared to the treated groups (DPSC 0.014 ± 0.004 axons/ μ m², dBMSC 0.017 ± 0.003 axons/ μ m², uBMSC 0.015 ± 0.002 axons/ μ m², $p = 0.004$). In the immunofluorescence assay, cells positive for human laminA/C and for S100 were observed in the DPSC-treated group, thus evidencing the presence of human cells with Schwann cells phenotype in the distal segment of the nerve analyzed. In the group treated with uBMSC there was β -galactosidase, but not in S100, confirming the presence of exogenous but undifferentiated cells. In the group treated with dBMSC, the presence of exogenous cells with Schwann cells phenotype was observed by observing the comarcation by β -galactosidase and S100 markers, thus maintaining the same phenotype as that observed *in vitro*. **CONCLUSION:** According to functional and histological criteria, the regeneration of the mandibular branch of the facial nerve of rats was superior when associated with the DPSC transplant compared to the control. The DPSC treated group had better functional results and histological parameters similar to those obtained with uBMSC and dBMSC. In the stem cells-treated groups, exogenous cells were observed after 6 weeks of experiment with evidence of neural tissue integration and evidence of *in vivo* differentiation for the Schwann cells phenotype only in the DPSC-treated group.

Descriptors: facial nerve; stem cells; nerve regeneration; schwann cells; rats wistar; electromyography; neural conduction; histology comparative.

1 INTRODUÇÃO

A paralisia facial periférica (PFP), por seu impacto na motricidade da face e, conseqüente, efeito desfigurante, acarreta grande impacto na expressão dos sentimentos, na comunicação e na auto-estima dos pacientes. Além disso, associa-se a disfunções orgânicas alimentares, fonoarticulatórias e oculares (Bento e Miniti, 1989).

Considerada a mononeuropatia aguda mais comum, a PFP apresenta incidência de 20 a 30 casos por 100.000 pessoas (Gaudin *et al.*, 2016), tendo como principal etiologia a viral, também conhecida como PFP de “Bell” (Cawthorne 1965; James 1996; Jackson *et al.* 1999; Lazarini *et al.*, 2006). A segunda causa mais prevalente de PFP corresponde aos traumas de cabeça e pescoço, que têm apresentado aumento da incidência no cotidiano do otorrinolaringologista pelo crescimento da violência na sociedade moderna (Bento *et al.*, 1985; May *et al.*, 2000; Toulqoat *et al.*, 2013). Em traumas de cabeça e pescoço, o facial é o nervo craniano mais acometido, sendo seu trajeto intratemporal o principal local de lesões (Turner, 1944). Cerca de 50% das fraturas temporais estão associadas a lesão do nervo facial e PFP (Singh *et al.*, 2015). Além disso, observa-se que 57% dos casos de PFP traumática associam-se a lesões graves com perda de continuidade parcial ou total do nervo (Yanigara *et al.*, 1982, Bento *et al.*, 1985).

Nas lesões graves do nervo facial (neurotme), como as observadas em traumas ou em ressecções tumorais, a recuperação espontânea não é esperada e os resultados funcionais cirúrgicos de procedimentos habitualmente realizados como sutura término-terminal ou auto-enxerto são limitados quanto à recuperação da motricidade facial (Bento *et al.*, 1985; Spector *et al.*, 2000; Darrouzet *et al.*, 2001).

Assim, a busca por uma melhor recuperação funcional nos pacientes acometidos lesões graves (neurotme) do nervo facial determinou o desenvolvimento de diversos modelos experimentais utilizando técnicas microcirúrgicas com autoenxerto, uso de cola biológica de fibrina, neurotubulização, sutura química e transplante de células-tronco (Bento, 1988; Bento e Miniti, 1989; Bento e Miniti, 1993; Costa, 1998; Costa, 2003; Costa *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2012; Salomone *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2013; Salomone *et al.*, 2013; Bento *et al.*, 2014, do Nascimento, 2017).

A terapia com células-tronco demonstra, cada vez mais, evidências de eficácia para

uma futura aplicação na prática clínica (Sell *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2011; Kerkis *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2013; Salomone *et al.*, 2013; Didilescu *et al.*, 2013). No entanto, apesar das células-tronco de diversas origens (medula óssea, adiposa, e polpa dentária) apresentarem propriedades similares como auto-renovação, habilidade de diferenciar-se em outros tipos celulares e capacidade, *in vivo*, de reconstruir um novo tecido, o seu desenvolvimento e potencial terapêutico estão relacionados a origem embrionária e localização anatômica da fonte doadora (Caplan *et al.*, 1991).

Estudos experimentais com a utilização de CTPD demonstraram efeitos positivos sobre a regeneração do nervo facial (Sasaki *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2011). Porém, estes estudos ainda são escassos, necessitando de maiores evidências que comprovem a real eficácia das CTPD no tratamento de lesões graves do nervo facial. As CTPD compõem uma população heterogênea de células ecto-mesenquimais multipotentes, com taxa de proliferação celular *in vitro* superior às de células-tronco de medula óssea (CTMO) e com efeitos positivos na regeneração neural. Possuem vantagens clínicas, comparativamente aos outros tipos celulares, pela simplicidade e baixa morbidade em sua obtenção e extração (Sell *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2011; Kerkis *et al.*, 2012; Didilescu *et al.*, 2013).

O melhor conhecimento do potencial terapêutico de cada tipo celular, além de suas vantagens e desvantagens, permitirá um melhor direcionamento clínico da aplicabilidade das células-tronco, potencializando, por consequência, os resultados obtidos. O presente estudo visa proporcionar dados para um maior embasamento científico auxiliando na decisão de qual tipo celular utilizar em um futuro ensaio clínico para tratamento de lesões graves do nervo facial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Avaliação do resultado funcional do autoenxerto do ramo mandibular do nervo facial de ratos combinado a transplante de CTPD por meio da amplitude do potencial de ação muscular composto obtido por eletroneuromiografia.

2.2 Objetivos secundários

- a) Avaliação histológica qualitativa e quantitativa do ramo mandibular do nervo facial de ratos submetidos a autoenxerto combinado com transplante de CTPD através de parâmetros qualitativos do tecido, da densidade axonal e do diâmetro axonal.
- b) Avaliação imunohistoquímica do ramo mandibular do nervo facial de ratos submetidos a autoenxerto combinado com transplante de CTPD, através da observação das células transplantadas no tecido.
- c) Comparação dos resultados funcionais (amplitude do PAMC), histológicos (parâmetros qualitativos e quantitativos do tecido) e imunohistoquímicos do grupo tratado com CTPD com dados anteriormente obtidos após transplante de CTMOi e CTMOd utilizando-se a mesma técnica cirúrgica e realizados pelos mesmos pesquisadores do presente estudo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomofisiologia do nervo facial

O nervo facial, também conhecido como sétimo nervo craniano, é caracteristicamente misto, sendo composto por uma porção motora e outra visceral, denominada nervo intermédio. A porção motora inerva a musculatura derivada do segundo arco branquial, que consiste na face, pela musculatura responsável por sua motricidade; no pescoço, pelo músculo estilo-hióide e ventre posterior do músculo digástrico; e na orelha média, pela musculatura responsável pela eferência do reflexo estapediano. Já o nervo intermédio possui tanto fibras viscerais sensitivas gustativas para os dois terços anteriores da língua e palato, como fibras pré-gangliônicas parassimpáticas para os gânglios pterigopalatino e submandibular, inervando as glândulas lacrimais, submandibular e sublingual (Bento *et al.*, 1985; Sweet, 1994; May *et al.*, 2000).

O trajeto do nervo facial inicia-se na junção ponto-medular, cursando pelo conduto auditivo interno juntamente com o nervo vestibulococlear. Depois, segue pelo canal do nervo facial, também conhecido como canal de Falópio, que consiste em três segmentos (labiríntico, timpânico e mastoideo), com comprimento de cerca de 33mm. A porção labiríntica é caracterizada por ser o segmento com menor diâmetro interno, cerca de 0,68mm, sendo, assim, o local com maior predisposição a compressões em casos de edema neural (Diamond, 1979).

O primeiro ramo do nervo facial consiste no nervo petroso superficial maior, que emerge ao nível do gânglio geniculado e inerva as glândulas lacrimais e palatinas. O segundo ramo é o nervo estapédio, responsável pela via eferente do reflexo estapediano; seguido do nervo corda do tímpano, que emerge cerca de 6mm acima do forame estilomastoideo. O nervo corda do tímpano contém fibras secretomotoras para as glândulas sublingual e submandibular e aferentes viscerais para receptores gustativos dos dois terços anteriores da língua. As fibras remanescentes do nervo facial emergem do forame estilomastoideo e atravessam a glândula parótida, dividindo-se em cinco ramos (temporal, zigomático, bucal, mandibular e cervical) para inervação da musculatura facial (Diamond, 1979).

Segundo Diamond (1979), na fossa média craniana, o nervo facial é suprido pela artéria cerebelar ântero-inferior. No interior do osso temporal, no trajeto do gânglio geniculado até o forame estilomastoideo, ele é irrigado pelos ramos petrosos da artéria menígea média e estilomastoideo da artéria auricular posterior. Estas artérias e suas respectivas veias localizam-se no tecido conectivo frouxo (epineuro) entre o perióstio do canal ósseo e a bainha neural. Em seu curso extra-temporal, o nervo é irrigado pelos ramos anastomóticos das artérias estilomastoidea, auricular posterior, temporal superficial e facial transversa.

3.2 Degeneração neural

Após a secção de uma fibra nervosa, ocorre um processo degenerativo não limitado apenas ao local da injúria, como, também, acometendo o corpo celular, os segmentos proximal e distal do nervo, as terminações da placa neuromuscular e os receptores sensoriais (May, 1986; Mackinnon *et al.*, 1988).

Cerca de sete horas após a lesão neural, inicia-se, no corpo celular, um processo denominado cromatólise que se caracteriza, morfológicamente, por ingurgitamento e, conseqüente, arredondamento da célula, associado a degeneração da substância da Nissl, migração do núcleo do centro para a periferia, aumento na produção de RNA, de proteínas de reparação e de lípidos e redução na síntese de neurotransmissores (May, 1986; Mackinnon *et al.*, 1988).

O segmento proximal de um axônio seccionado sofre um processo retrógrado de redução de diâmetro e de espessura da bainha de mielina, que ocorrem a uma distância variável, a depender da gravidade da lesão. O segmento distal, por sua vez, é acometido por uma fragmentação catabólica do axônio e da bainha de mielina em decorrência da interrupção do fluxo axoplasmático. Paralelamente, observa-se uma proliferação de células de Schwann, no ambiente perineural, que atuam como macrófagos, fagocitando o material degenerado. Este processo, denominado degeneração walleriana, inicia-se no local da lesão neural e progride em direção distal (Kline *et al.*, 1982).

Nas primeiras 48-72h após a lesão, o segmento neural distal ainda pode manter algum grau de excitabilidade e apresentar condução nervosa caso estimulado diretamente, fenômeno que extingui-se gradativamente com a progressão da degeneração walleriana

(Kline *et al.*, 1982; May *et al.*, 1991). A evolução e intensidade do processo degenerativo neural variam de acordo com a gravidade da lesão. Em casos de secção completa da fibra nervosa, a degeneração é rápida, já nas lesões incompletas, como nas compressões neurais, este processo pode demorar mais de duas semanas para se completar (Ham *et al.*, 1983; Wong *et al.*, 1991).

O corpo celular tem capacidade ilimitada de regenerar fibras lesadas desde que resista à lesão inicial. Os brotos ou “*sprouts*” axonais são prolongamentos protoplasmáticos que começam a aparecer nos cotos proximais dos axônios, a partir do 3º dia após a lesão e atravessam o segmento lesado através de tubos formados pelas células de Schwann, denominados bandas de Bungner, atingindo os tubos de endoneuro do segmento distal e, posteriormente, a fibra muscular. Se os axônios regenerados não alcançarem os canais formados pelas bandas de Bungner pelo período de 3 a 4 meses, estes canais degeneram sendo substituídos por tecido cicatricial. Os axônios em regeneração crescem, aproximadamente, 1mm por dia ou uma polegada por mês e a regeneração axonal é complementada pelo processo de maturação axonal, que consiste na formação da bainha de mielina a partir das células de Schwann. Observa-se que um segmento de nervo regenerado apresenta maior número de axônios, sendo, no entanto, caracteristicamente mais finos e menos mielinizados que no nervo normal (Kline *et al.*, 1982; May *et al.*, 1986; Sunderland, 1978).

A arquitetura estrutural dos nervos é baseada em arranjos fasciculares de tecido conjuntivo formando o endoneuro, o perineuro e o epineuro. As lesões neurais são classificadas de acordo com o comprometimento dessas estruturas. Inicialmente, Seddon, em 1943, dividiu as lesões neurais em três tipos: neuropraxia, axoniotmese e neurottese. Posteriormente, Sunderland, em 1978, classificou-as em cinco classes, subdividindo a neurottese em três subtipos: endoneurottese, perineurottese e epineurottese.

Na neuropraxia ocorre um bloqueio transitório da transmissão do impulso nervoso por aumento da pressão intra-luminal, geralmente consequente a um processo de compressão de curta duração, causando anóxia local e mudança da osmolaridade celular. Uma vez removido o processo compressivo, restabelece-se a condução nervosa com recuperação completa da função em até três semanas (Seddon, 1943; Sunderland, 1978; Sunderland, 1981).

A axoniotmese geralmente é produzida por um processo compressivo mais intenso ou prolongado, comprometendo o fluxo sanguíneo pelas arteríolas e a drenagem venosa neural, causando aumento da pressão intraneural suficiente para formar edema e bloquear a passagem dos nutrientes através do axoplasma. Este fenômeno desencadeia degeneração axonal, denominada axoniotmese, e da bainha de mielina, preservando o endoneuro. Caracteriza-se por degeneração walleriana distal ao local da lesão e, em pequena extensão, proximal com conseqüente adelgaçamento dos axônios. Se o estímulo for removido, observa-se recuperação espontânea e completada da lesão, no período de três semanas a três meses (Seddon, 1943; Sunderland, 1978; Sunderland, 1981).

Já na endoneurotmese, o aumento da pressão intra-neural não regride, causando necrose dos tubos endoneurais. Tanto na perineurotmese quanto na epineurotmese ocorre uma transecção total ou parcial dos nervos com perda de continuidade das fibras nervosas. Nestes últimos três graus de lesão que compõem a neurotmese observa-se a ocorrência de degeneração Walleriana e recuperação incompleta, que ocorre em graus variáveis. (Sunderland, 1978; Sunderland, 1981). Geralmente, a perineurotmese e a epineurotmese são tratadas cirurgicamente com reconstrução do defeito neural (Chhabra *et al.*, 2014; Gaudin *et al.*, 2016).

3.3 Técnicas de reparo neural

A busca por técnicas mais eficientes de reparo neural que proporcionem melhor resultado funcional aos pacientes levou ao desenvolvimento de diversos procedimentos microcirúrgicos (Bento, 1988; Bento e Miniti, 1989; Bento e Miniti, 1993; Costa, 1998; Costa, 2003; Costa *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2013; Salomone *et al.*, 2013; do Nascimento, 2017). O tratamento e prognóstico das lesões traumáticas neurais dependem de fatores como: extensão de perda de tecido do nervo, tempo transcorrido entre a lesão e o tratamento e fatores intrínsecos ao paciente como idade e comorbidades (Johnson *et al.*, 2005).

Segundo Brunelli, a primeira descrição da técnica de sutura neural foi realizada por Saliceto no século XIII. No entanto, os primeiros resultados positivos advindos da neurorafia foram obtidos somente em 1873 por Hueter, após o início da anestesia e do uso de microscópio nas cirurgias para reparo neural. As técnicas de sutura neural descritas na literatura são diversas, incluindo-se a epineural, a interfascicular e a perineural. A sutura

epineural consiste no procedimento clássico para reparo de secções neurais desde Hueter por ser de simples realização e por fornecer o suporte necessário para a regeneração neural (Brunelli, 1978; Bento e Miniti, 1989).

Crumley, em 1980, descreveu melhores resultados para a anastomose da porção extra-petrosa do nervo facial ao utilizar sutura perineural, considerando como vantagens da técnica a menor infiltração de tecido conectivo no local de sutura e o melhor confinamento dos axônios em regeneração em seus respectivos funículos neurais. Entretanto, as dificuldades técnicas do procedimento perineural com o conseqüente aumento substancial do tempo intra-operatório foram apontados, pelo próprio autor, como obstáculos para a difusão da técnica perineural (Bento e Miniti, 1989).

A sutura epineural término-terminal consiste, atualmente, na técnica padrão-ouro para o tratamento das secções neurais, sendo sua indicação reservada aos casos com pequenos defeitos, uma vez que lesões com perda de grandes tecidos neurais podem levar a tensão excessiva nas linhas de sutura e, conseqüentemente, inibir o processo de regeneração neural (Johnson *et al.*, 2005).

A técnica do autoenxerto foi primeiramente descrita por volta de 1870 e, nos últimos 50 anos, tem sido considerada como o procedimento padrão para tratamento de lesões neurais onde não for possível a realização da sutura término-terminal (Daly *et al.*, 2012). Consiste na retirada de um fragmento de nervo de um segundo sítio, sendo o mesmo utilizado para unir os cotos neurais, alinhar as fibras neurais e atuar como uma ponte entre os segmentos proximal e distal, visando orientar o crescimento axonal e diminuir a tensão nas linhas de sutura, facilitando a regeneração neural (Terzis *et al.*, 1975).

Considerando as lesões graves do nervo facial, uma variedade de autoenxertos vem sendo utilizada desde o último século. Em 1879, Drobnik realizou o primeiro caso, com bons resultados, utilizando o nervo acessório (Rosenwasser *et al.*, 1991). Após algumas décadas, o nervo acessório foi substituído pelo cross-over de nervo hipoglosso-facial, como descrito por Körte e Bernhardt em 1903 (Körte *et al.*, 1903; Rosenwasser *et al.*, 1991). Em 1924, Ballance utilizou o nervo laríngeo recorrente para confecção de cross-over com o nervo facial (Ballance, 1924). Posteriormente, iniciou-se a utilização do nervo sural, o qual tornou-se a fonte preferencial de autoenxerto para os reparos do nervo facial. Como fontes alternativas, nos casos onde o nervo sural não estiver disponível ou não for

suficiente, podemos citar os nervos safeno, auricular maior e cutâneo antebraquial medial (Mackinnon *et al.*, 2001; Terzis *et al.*, 2008; Jowett *et al.*, 2015).

Apesar do autoenxerto ser a técnica padrão-ouro para reparo microcirúrgico por proporcionar melhores resultados funcionais, ser de obtenção tecnicamente simples e não apresentar risco de rejeição imunológica, alguns pontos são limitantes a seu uso, como: a necessidade de manipulação cirúrgica em um segundo sitio com o aumento do tempo intra-operatório e a morbidade da área doadora com déficit sensorial subsequente; a disponibilidade limitada de nervos para autoenxertia; o risco de formação de neuroma e infecção na área doadora (Rosen *et al.*, 1989, Ray *et al.*, 2010; Gaudin *et al.*, 2016).

3.4 Neuroconduítes

As desvantagens da técnica de autoenxerto, acima citadas, associadas ao progresso da medicina regenerativa e da engenharia de tecidos, levaram ao desenvolvimento de novos procedimentos microcirúrgicos com potencial benefício na regeneração neural, como a neurotubulização. Esta técnica consiste na interposição de conduítes, de origem biológica ou sintética, que, ao orientar o processo de mielinização e o crescimento axonal, facilitaria a regeneração neural. É empregada em situações onde existe perda significativa de substância do nervo, impedindo a sutura término-terminal ou quando se objetiva associar o transplante de substâncias potencializadoras da regeneração neural como células-tronco ou fatores de crescimento (Costa, 1998; Battiston *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011).

Segundo Arslantunali *et al.*, o conduíte ideal deve apresentar flexibilidade, ser biocompatível e biodegradável, possuir alta porosidade, ser de fácil manipulação e suficientemente resistente. Tecidos autólogos não neurais como osso, artéria, veia ou músculo mostram-se como opções viáveis para essa função. No entanto, a necessidade de retirada tecidual, nestes casos, levou ao desenvolvimento dos conduítes artificiais (Lin *et al.*, 2013).

A estratégia inicial para o desenvolvimento dos conduítes sintéticos baseou-se em uma estrutura de suporte que guiasse o crescimento axonal e formasse uma barreira prevenindo a infiltração de tecido conectivo cicatricial (Quigley *et al.*, 2013; Carriel *et al.*, 2014). A primeira geração de conduítes consistia em tubos não absorvíveis de silicone ou

de politetrafluoroetileno (Konofaos *et al.* 2013). Entretanto, esses conduítes necessitavam de reoperação para remoção cirúrgica por causarem síndrome compressiva neural e encapsulação fibrótica (Lundborg *et al.*, 2004).

Assim, desenvolveu-se a segunda geração de conduítes baseada em materiais absorvíveis e biocompatíveis como colágeno tipo I, ácido poliglicólico, caprolactone e álcool polivinil, evitando a necessidade de um segundo tempo cirúrgico para remoção, além de permitir a troca de substâncias nutritivas com o meio circunjacente por difusão, potencializando o processo de regeneração neural (Konofaos *et al.* 2013).

Estudos experimentais com nervos periféricos utilizando a técnica de tubulização apresentaram resultados comparáveis aos obtidos com autoenxerto na correção de pequenos defeitos, quando a distância entre os cotos não fosse grande o suficiente para atrapalhar a atração quimiotática e quimiotrófica exercida pelo coto distal sobre o cone de crescimento axonal (Hentz *et al.* 1991; Muller *et al.*, 1993; Brunneli *et al.*, 1994). Mackinnon *et al.*, 1990, mostraram que a reconstrução de defeitos neurais de até 3 cm, utilizando tubo de ácido poliglicólico, propiciou resultados funcionais cirúrgicos comparáveis aos obtidos com autoenxerto, sem a morbidade relacionada a disfunções do sítio doador.

Assim, a técnica de tubulização oferece ainda vantagens teóricas adicionais sobre os métodos tradicionais de autoenxertia pois proporciona boa coaptação dos cotos, com menor trauma de manipulação; melhor confinamento das fibras em crescimento dentro do tubo, isolando o local de reparo da reação inflamatória circunjacente e permitindo maior concentração de fatores neurotróficos; permite a veiculação de células ou substâncias potencializadoras da regeneração neural; orienta o crescimento das fibras em direção ao coto distal; reduz a formação de neuromas e o escape de fibras para fora do conduíte (Fields *et al.* 1989; Pham *et al.*, 1991).

Costa *et al.*, em 2013, utilizaram tubo absorvível de ácido poliglicólico para transplante de CTMO. Observou-se que, ao final das seis semanas de experimento, as células mantiveram-se vivas, em contraste com trabalhos que usaram tubos de material inabsorvível como o de silicone (Salomone *et al.*, 2013). Assim, o tubo de ácido poliglicólico mostrou-se particularmente importante por manter a nutrição necessária de

células-tronco mais diferenciadas (*Schwann-like*), que necessitam de nutrição rica e constante para sobreviverem (Costa *et al.*, 2013).

3.5 Células de Schwann

O sucesso do processo de regeneração é, em grande parte, depende das células de Schwann (CS) que participam ativamente tanto do processo de degeneração walleriana quanto da restauração axonal, atuando na formação das bandas de Bürgner e na mielinização das novas fibras axonais. Inicialmente, as CS e os macrófagos removem os segmentos degenerados do axônio distal e os debris residuais de mielina (Bigbee *et al.*, 1987; Bunge, 1994; Fu e Gordon, 1997). Sequencialmente, as CS fornecem suporte aos axônios através da produção de citocinas e fatores neurotróficos (Mackinnon *et al.*, 1986; Brushart, 1988; Lundborgh *et al.*, 1982). Os axônios regenerados liberam citocinas mitogênicas que induzem as células de Schwann a passarem de um fenótipo produtor de mielina para um proliferativo, levando à formação das chamadas bandas de Bungner que atuam como guias para o crescimento axonal (Heumann, 1987; Funakoshi *et al.*, 1993).

Nos nervos periféricos, as CS existem em duas formas, as produtoras de mielina e as não produtoras de mielina, ambas originárias de uma fonte comum de CS imaturas, derivadas de células intermediárias da crista neural. Após a lesão neural, as CS tornam-se ativas, estimulando o crescimento axonal através do estabelecimento de uma matriz de crescimento e fornecendo fatores neurotróficos (Mirsky and Jessen, 1996).

A quantidade de células de Schwann presentes no microambiente perineural, após uma secção axonal, geralmente não é suficiente para satisfazer a demanda local para a regeneração adequada e eficaz (Cai *et al.*, 2017). Assim, o transplante de CS como potencializador da regeneração neural mostra-se com resultados animadores em estudos experimentais (Rodriguez *et al.*, 2000; Bachelin *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007). No entanto, o número limitado de fontes autólogas de células de Schwann, a necessidade de uma segunda abordagem cirúrgica para sua coleta e a potencial rejeição imunológica no caso de células exógenas são fatores limitantes ao seu uso e difusão na prática clínica (Sulaiman *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2017).

3.6 Células-tronco

Segundo Caplan (1991), as células-tronco são aquelas que apresentam três características: auto-renovação, habilidade de diferenciar-se em outros tipos celulares e capacidade *in vivo* de reconstruir um novo tecido. De acordo com seu estágio de desenvolvimento, as células-tronco podem ser divididas em embrionárias ou adultas, sendo caracterizadas a depender de seu potencial de diferenciação. As células-tronco totipotentes podem formar um embrião completo incluindo os tecidos extra-embriônicos. As células-tronco pluripotentes podem diferenciar-se em células das três linhagens embrionárias (mesoderma, endoderma e ectoderma). As células-tronco adultas multipotentes são capazes de diferenciação em diversos tecidos e as células-tronco unipotentes ou progenitoras diferenciam-se em um único tipo celular (Jiang *et al.*, 2017). Já as células-tronco pluripotentes induzidas são derivadas diretamente de células somáticas adultas e com potencial de diferenciação nas três linhagens embrionárias (Takahashi *et al.*, 2006).

O papel das células-tronco no processo de regeneração neural baseia-se na capacidade de diferenciação em células semelhantes a Schwann, no aumento da produção de fatores neurotróficos e na formação de bainha de mielina (Jiang *et al.*, 2017)

3.6.1 Células-tronco de polpa dentária

As CTPD foram primeiramente descritas em 2000 por Gronthos *et al.* onde se isolaram células-tronco do terceiro molar de humanos adultos com diferenciação destas em células semelhantes a odontoblastos.

Diferentes populações de CTPD vêm sendo isoladas e estudadas desde sua descoberta inicial na última década, com progresso significativo principalmente para as CTPD extraídas de dentes decíduos (Kerkis *et al.*, 2009; Lizier *et al.*, 2012). Após o isolamento inicial das CTPD de dentes humanos adultos, Miura *et al.* (2003) observaram a presença de células-tronco, também, em dentes decíduos humanos, denominadas de SHEDs (do inglês, *stem cell from human exfoliated deciduous teeth*). Posteriormente, Kerkis *et al.* (2006) isolaram e caracterizaram outra população de células-tronco de dentes decíduos, denominadas IDPSCs (do inglês, *immature dental pulp stem cells*). Observa-se que as SHEDs e as IDPSCs expressam marcadores de células-tronco embrionárias como *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG* (Kerkis *et al.*, 2006). Tanto as SHEDs quanto as IDPSCs possuem potencial *in vitro* de diferenciação induzida em células neurais (Miura *et al.*,

2003), musculares, (Lizier *et al.*, 2012) osteogênicas (Chadipiralla *et al.*, 2010), condrogênicas (Lizier *et al.*, 2012) e adipogênicas (Gronthos *et al.*, 2000). Estudos *in vivo* evidenciaram a diferenciação em tecidos ectópicos semelhantes a dentina e odontoblastos (Sakai *et al.*, 2010), tecidos ósseos (Zheng *et al.*, 2010), epitélio corneano (Gomes *et al.*, 2010) e células neurais (Almeida *et al.*, 2011).

Além das CTPD, células-tronco podem ser de diferentes partes da cavidade oral incluindo células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de alvéolos dentários, da papila apical, do ligamento periodontal, da gengiva, células progenitoras do germen e folículo dentário, sendo todas estas envolvidas no desenvolvimento dos dentes decíduos e permanentes (Junco *et al.*, 2017).

As CTPD podem ser isoladas de dentes decíduos, permanentes ou supranumerários (Gronthos *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008) sendo originadas da porção cranial da crista neural durante o período embrionário.

Todas as populações de CTPD apresentam algumas características em comum: morfologia semelhante a fibroblastos, alta eficiência de formação de colônias aderentes e alto potencial de proliferação *in vitro* (Miura *et al.*, 2003; Sell, 2003, Kerkis *et al.*, 2006, Jo *et al.*, 2007; Gandia *et al.*, 2007; Stevens *et al.*, 2008; Kerkis *et al.*, 2012; Didilescu *et al.*, 2013). Entretanto, observa-se que CT isoladas de dentes permanentes, decíduos ou supranumerários diferem na expressão de marcadores celulares e possuem particularidades em seu potencial de diferenciação (Miura *et al.*, 2003; Kerkis *et al.*, 2006, Jo *et al.*, 2007; Stevens *et al.*, 2008; Kerkis *et al.*, 2012).

Nakamura *et al.* (2010) e Govindasamy *et al.* (2010) evidenciaram expressão gênica superior no grupo de CTPD derivadas de dentes decíduos comparativamente a de dentes permanentes nos genes relacionados a pluripotencialidade (OCT4, SOX2, NANOG, e REX-1), a proliferação celular e a produção de matrix extracelular incluindo diversas citocinas como fator de crescimento de fibroblastos, fator β de crescimento tumoral, colágenos (I, III, VII e XIII) e proteoglicanos (glican e versican).

Wu *et al.* (2015) conduziram estudo analisando linhagens de CTPD extraídas de crianças, adolescentes, adultos e idosos. Observou-se que as CTPD de doadores com maior idade evidenciaram aumento do tempo de duplicação, maior número de células apoptóticas e menor potencial de diferenciação.

As CTPD compõem uma população de células-tronco heterogêneas multipotentes, autorenováveis, com alta taxa de proliferação, alto potencial clonogênico e que secretam ativamente um amplo espectro de fatores tróficos e imunomoduladores (Miura *et al.*, 2003; Sell, 2003, Pierdomenico *et al.*, 2005; Kerkiset *et al.*, 2006, Jo *et al.*, 2007; Gandia *et al.*, 2007; Stevens *et al.*, 2008; Didilescu *et al.*, 2013).

A maioria das CTPD expressa marcadores de células-tronco do estroma de medula óssea como CD29, CD73, CD90, CD105; marcadores embrionários OCT4, NANOG e KLF4 (Kerkis *et al.*, 2006; Rodas-Junco, 2018); marcadores de progenitores neurais como Doublecortin, GFAP e Nestina; marcadores de oligodendrócitos e de células neurais imaturas, β III-tubulina, A2B5 e CNPase, mas não de oligodendrócitos maduros como MPB e APC (Kerkis *et al.*, 2012; Didilescu *et al.*, 2013).

Estudos mostram que as CTPD apresentam maior taxa de proliferação *in vitro* quando comparadas com as CTMO (Shi *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2007; Caplan, 2008; Caplan, 2009; Huang *et al.*, 2009). Localmente, induzem a neoangiogênese e, pela presença de células de suporte como as células de Schwann dentre as células de polpa dentária, facilitariam a regeneração axonal (Kerkis *et al.*, 2006). Observa-se, também, que a cultura destas células produz fatores neurotróficos como fator de crescimento neural, fator neurotrófico cerebral e fator neurotrófico derivado de células da glia. Esta produção de fatores tróficos determina benefícios terapêuticos em modelos animais de infarto miocárdico, lupus eritematoso sistêmico, colite e lesão isquêmica cerebral (Gronthos *et al.*, 2000; Gronthos *et al.*, 2002. Miura *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2008; Kerkis *et al.*, 2012; Aghajani *et al.*, 2016; Isobe *et al.*, 2016).

Sasaki *et al.*, (2008) avaliaram a regeneração do ramo bucal do nervo facial de ratos *Lewis* após secção neural seguida de confecção de gap de 7mm, interposição de condúite de silicone e transplante ou não de células de polpa dentária. Após 12 dias, observou-se regeneração neural mais efetiva com maior índice de reconecção neural no grupo tratado com células de polpa dentária (89,5%) comparativamente ao controle (47,4%, $p=0,005$). A avaliação por imunofluorescência evidenciou a presença de células exógenas diferenciadas em células de Schwann e em células endoteliais vasculares, sugerindo regeneração axonal e vascular promovidas pelas células de polpa dentária.

Um segundo estudo publicado em 2011 por Sasaki *et al.*, foi realizado com neurotubo absorvível de ácido poli-DL-láctico-co-glicólico pelas potenciais reações adversas causadas pelo neurotubo inabsorvível de silicone, incluindo processo inflamatório crônico, fibrose, trombose e infecção com conseqüente necessidade de reoperação para retirada. Assim, realizou-se gap de 7mm no ramo bucal do nervo facial de ratos *Lewis* com posicionamento de neurotubo de ácido poli-DL-lacto-co-glicólico e transplante, ou não, de células de polpa dentária. Após cinco dias do procedimento cirúrgico, observou-se taxa de reconecção neural de 100% no grupo submetido ao transplante celular e de 50% ($p<0,01$) no grupo controle com evidência de tecido neural positivo para o anticorpo anti-Tuj1, à imunofluorescência, na porção mediana do neurotubo, confirmando, assim, a presença de axônios viáveis. Nove semanas após o procedimento cirúrgico, observou-se maior quantidade de células de Schwann no grupo tratado com células de polpa, reconecção neural nos nervos operados e reabsorção dos neuroubos, sugerindo eficácia dos mesmos para regeneração neural e absorção após finalização do processo regenerativo.

A fim de confirmar que a melhora histológica, observada previamente nos estudos acima citados, estaria relacionada a melhora funcional, Sasaki *et al.*, em 2014, publicaram estudo com avaliação clínica e funcional em três grupos de estudo submetidos a secção neural, confecção de gap de 7mm e tratados cirurgicamente com neurotubo de silicone preenchido com gel de colágeno tipo 1 ($n=6$), neurotubo de silicone preenchido com células de polpa dentária ($n=4$) e autoenxerto ($n=6$). A avaliação clínica semanal do grau de paralisia facial através de escala definida evidenciou melhores resultados funcionais no grupo do autoenxerto entre 3-10 semanas comparativamente aos outros grupos e equivalência estatística entre o grupo tratado com células de polpa dentária e autoenxerto após 11 semanas de experimento. O grupo tratado com células apresentou melhores resultados que o grupo tratado com neurotubo de silicone em todos os momentos de avaliação. A análise funcional por meio do potencial de ação muscular composto (PAMC), realizada em 13 semanas, não evidenciou diferença estatística entre o grupo de tratado com células de polpa dentária comparativamente ao grupo de autoenxerto nos quesitos amplitude, duração e latência do PAMC. Comparativamente ao PAMC de nervos normais, o grupo submetido a transplante celular apresentou aumento de latência estatisticamente significativo, sem diferenças significativas ao comparar-se amplitude e duração.

Dai *et al.*, em 2013, comparou o transplante de CS, células-tronco adiposas (CTA), CTPD, CS+CTA e CS+CTPD no reparo de lesão neural por secção com gap de 15mm e interposição de neuroconduíte no nervo ciático de ratos. Observou-se melhor resultado funcional na combinação CS+CTA, sendo que todos os grupos tratados com conduítes preenchidos com células apresentaram resultado funcional superior ao grupo tratado apenas com conduíte. Assim, observa-se que a presença de células-tronco ou de CS mostra-se benéfica na regeneração neural, sendo a combinação CS+CTA associada aos melhores resultados neste estudo.

3.6.2 Células-tronco de medula óssea

O patologista alemão Cohnheim, em 1867, foi o primeiro a sugerir a presença de células-tronco não hematopoiéticas na medula óssea e, em 1924, o russo Maximow identificou uma célula, no mesênquima da medula óssea, que se diferenciava em diversos tipos de células sanguíneas. Entretanto, somente em 1997, Prockop conseguiu isolar e demonstrar a diferenciação das células da medula óssea em osteoblastos, condroblastos, adipócitos e mioblastos.

Na categoria de células-tronco mesenquimais, agrupam-se as não-hematopoiéticas multipotentes, originárias de vários tecidos humanos, como medula óssea, tecido adiposo e polpa dentária. Estas células são capazes de diferenciarem-se em diversos tecidos mesenquimais e, primordialmente, fornecerem suporte estrutural e funcional para hematopoiese (Dezawa *et al.* 2004).

Apesar das células-tronco de medula óssea (CTMO) possuírem linhagem embrionária distinta da neural, estudos relatam potencial *in vivo* (Eglitis e Mezey, 1997; Kopen, 1999) e *in vitro* (Sanchez-Ramos *et al.*, 2000; Woodbury *et al.*, 2000; Dezawa 2002) de diferenciação em células neurais como neurônios e astrócitos e células de Schwann através de indução de fatores neurotróficos ou agentes indutores.

As CTMO são sabidamente células multipotentes e satisfazem os requisitos para um transplante ideal de células: fácil acesso, rápida expansão *in vitro* e baixa imunogenicidade (Cuevas *et. al.*, 2002; Salomone *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2011). Estas células são capazes de interagir e sobreviver em diferentes tecidos hospedeiros, apresentando técnicas de coleta e expansão simples e de fácil reprodutibilidade (Haynesworth *et al.*, 1992).

A baixa imunogenicidade aliada a capacidade de secreção de fatores neurotróficos e citocinas, como a IL-6, proporcionam um microambiente favorável para a sobrevivência de células neurais e fornece suporte para o crescimento, a maturação e a diferenciação das células de Schwann (Cuevas *et al.*, 2002).

Dezawa (2002) demonstrou que transplante de CTMO diferenciadas em *Schwann-like* (CTMOd) estimulou o crescimento neural, através da medida do alongamento axonal, e a mielinização de axônios, pelo diâmetro axonal, em estudo experimental com ratos *Wistar* submetidos a lesão do nervo ciático e do nervo óptico comparativamente ao controle, apresentado, também, resultados superiores aos obtidos no grupo tratado com CTMO indiferenciadas. Assim, demonstrou o potencial das CTMO no processo de regeneração neural tanto no sistema nervoso periférico, representado pelo nervo ciático, quando no central, representando pelo nervo óptico.

Wang *et al.* (2009), ao estudar a regeneração de nervos periféricos em ratos utilizando culturas *in vitro* de CTMO, demonstraram que as CTMO não só promoviam a sobrevivência celular e a proliferação das células de Schwann, como também estimulavam a expressão de receptores e/ou fatores neurotróficos (BDNF, NGF, TrkA, LNGFR).

Ladak *et al.* (2011) observaram que CTMOd forneciam suporte ao crescimento neural e regeneração axonal semelhantes aos obtidos com CS *in vitro* e *in vivo* e superiores aos obtidos com CTMOi.

Ao *et al.* (2011) em estudo após confecção de gap de 12mm e interposição de neuroconduíte de citosan em nervo ciático de ratos com transplante de CTMOd humanas ou de células de Schwann isoladas do nervo ciático comparativamente ao grupo controle sem transplante celular evidenciou, após 12 semanas, valores de velocidade de condução neural, de área total do músculo tibial anterior e de grau de mielinização axonal similares entre os dois grupos submetidos a transplante celular e superiores ao grupo controle. Assim, as CTMOd mostraram-se como opção ao uso de células de Schwann autólogas na potencialização da regeneração neural.

Cai *et al.* (2017) utilizando CTMOd humanas evidenciou, *in vitro*, o suporte ao crescimento neural através da secreção de fatores neurotróficos com níveis elevados de fator neurotrófico derivado cerebral (BDNF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento neural (NGF)

comparativamente ao controle e na formação da bainha de mielina em neurônios do gânglio dorsal de ratos.

Não obstante, estudos, também, demonstram efeitos positivos das CTMO na regeneração do nervo facial. Wang *et al.* (2011) comparou o transplante de CTMOi e CTMOD na regeneração do nervo facial de coelhos submetido a neurotmesa e confecção de Gap de 1cm e interposição de conduíte de veia. Observou-se melhor recuperação funcional no grupo tratado com CTMOD assim como maior número de axônios mielinizados e maior expressão de proteínas de mielina no RNAm das CTMOD comparativamente a CTMOi.

Costa *et al.* (2013), em trabalho experimental com ratos *Wistar*, observaram que a terapia com CTMOi e CTMOD melhoraram a regeneração do nervo facial comparativamente ao grupo controle, sendo as células diferenciadas em *Schwann-like* aquelas que se associaram aos melhores resultados histológicos e funcionais. Ao final do experimento, observaram-se células exógenas viáveis e ativas após seis semanas de experimento, mantendo seu papel na regeneração neural.

Salomone *et al.* (2013) em estudo utilizando, também, ratos *Wistar* submetidos a neurotmesa do ramo mandibular do nervo facial, seguida de autoenxerto e neurotubo de silicone com transplante de CTMOi e CTMOD evidenciaram melhores resultados funcionais e histológicos nos grupos tratados com células-tronco de forma semelhante ao observado por Costa *et al.*, mas com os melhores valores no grupo submetido a transplante de CTMOi. Porém, após seis semanas do experimento não se evidenciou a presença de células exógenas viáveis, supondo-se, assim, que as CTMO não exerceram seu papel neurogênico até o final do experimento, mas, basicamente, um papel imunogênico, mais intenso nas células CTMOi.

Aggarwal *et al.* (2012) avaliou oito pacientes com paralisia facial pós-traumática sem melhora após tratamento clínico e submetidos a descompressão do nervo facial e transplante de CTMO. Ao final de seis meses de seguimento observou-se melhora funcional e clínica superior à obtida em paciente com PFP traumática tratados cirurgicamente sem evidências de efeitos adversos do uso de CTMO.

3.8 Modelo animal

Os diversos modelos animais utilizados para o estudo da regeneração do nervo facial apresentam vantagens e desvantagens. Observa-se que animais grandes como porcos, ou médios como gatos e coelhos apesar de apresentarem uma anatomia do nervo facial adequada para procedimentos cirúrgicos, apresentam alto custo, dificuldade de manutenção, predisposição a infecções (Bento, 1988; Barrs, 1991; Costa *et al.*, 2003) e a complicações anestésicas (Mattox e Felix, 1987) quando comparados a animais menores, como ratos que estão associados a menor custo e facilidade de manuseio e manutenção durante o experimento (Mattox e Felix, 1987). O rato, como animal do modelo experimental para estudo do nervo facial, é frequentemente utilizado na literatura (Rosen *et al.*, 1983; Seckel *et al.*, 1984; Pham *et al.*, 1991; Salomone *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2013; Bento *et al.*, 2014), sendo, assim, considerado adequado para este fim.

Borin *et al.* (2006) em seu estudo funcional e histológico da regeneração do nervo facial em ratos, referiu-se aos ratos *Wistar* como “animais amplamente utilizados no estudo do nervo facial” pois são de fácil aquisição e manejo, toleram bem a paralisia facial, mesmo que nos casos bilaterais, permitem alojamento em gaiolas coletivas, bem como apresentam facilidade anestésica e resistência a infecções.

3.9 Anatomia e histologia do nervo facial de ratos

O ramo mandibular do nervo facial de ratos mostra-se excelente para o estudo de lesões traumáticas seguidas de reparo do nervo facial por apresentar um longo trajeto sem ramificações, viabilizando técnicas de autoenxerto e tubulização. Além disso, apresenta facilidade no estudo funcional eletroneuromiográfico e padrões histológicos bem estabelecidos na literatura (Costa *et al.*, 2012, Salomone *et al.*, 2012; Bento *et al.*, 2014).

Histologicamente, o tronco do nervo facial de ratos *Wistar* apresenta, em média, 4650 (± 256) axônios e o ramo mandibular, 1862 axônios, com pequena variação entre indivíduos (± 359), permitindo, assim, a utilização de poucos animais por experimento. A quantidade total de axônios em cada feixe neural não varia mais que 5%, e a média da diferença de axônios entre os lados é de cerca de 15%, não ultrapassando 33%. Seus fascículos são de 3 a 5, sendo envoltos por tecido conectivo perineural (Costa *et al.*, 2012).

Em estudo sobre a histologia do ramo mandibular do nervo facial de ratos observou-se que a densidade parcial média dos axônios dos segmentos distais e proximais foram, respectivamente, $0,18 \pm 0,02$ e $0,19 \pm 0,02$ axônios/ μm^2 (Costa *et al.*, 2012). Os autores não observaram diferenças estatisticamente significantes entre os lados ($p=0,248$; $p=0,533$) e nem entre os segmentos proximais e distais ($p=0,859$; $p=0,182$). Além disso, Liu *et al.* 2007 observaram que uma área analisada de $90.000 \mu\text{m}^2$ corresponderia a mais de 90% da área total do nervo.

3.10 Avaliação funcional objetiva da regeneração neural

A eletroneuromiografia consiste no estudo da neurocondução motora, sendo considerada método objetivo de avaliação de prognóstico em pacientes com PFP aguda (Salomone *et al.*, 2012).

O estudo eletroneurofisiológico tem como objetivo determinar e quantificar a função e os distúrbios do sistema nervoso periférico, especificamente dos nervos sensitivos e motores, junção neuromuscular e da unidade motora, tornando-se parte fundamental dos modelos experimentais que visam à avaliação da regeneração neural. Os métodos existentes de avaliação funcional por meio da eletroneuromiografia (EMG) em animais derivam de modelos usados em humanos e são aplicados de acordo com o animal e o nervo a ser estudado (Costa *et al.*, 2003).

Salomone *et al.* (2012) propuseram modelo de avaliação funcional objetiva da regeneração de nervo facial em ratos Wistar, mostrando-se como método preciso, não invasivo, fácil, rápido e de alta reprodutibilidade. Os autores descrevem que não houve diferença significativa entre os lados estudados e os valores médios da amplitude, latência, duração e intensidade de estímulo foram $4,63 \pm 1,80$ mV; $1,30 \pm 0,24$ ms; $3,83 \pm 0,60$ ms; e, $2,26 \pm 0,38$ mA respectivamente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo experimental foi realizado em concordância com o Manual NRC (National *Research Council*, 2003) sobre cuidados de animais de laboratório após aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Respeitaram-se as questões éticas relacionadas ao uso de animais em estudos experimentais (Brasil. Lei no 9.605 de 12 de fevereiro de 1998).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigações Médicas (Lim-32) do Departamento de Otorrinolaringologia da FMUSP e no Laboratório de Habilidades de Otorrinolaringologia da FMUSP, em parceria com os Institutos de Biologia e de Ciências Biomédicas da USP e com o Laboratório de Vetores Virais do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto de Câncer de São Paulo.

4.1 Materiais

4.1.1 Seleção de animais

Neste estudo experimental foram utilizados 20 ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* saudáveis, machos, com peso entre 250g e 300g, adultos, adquiridos e mantidos no Centro de Bioterismo da FMUSP.

Os animais ficaram alojados em gaiolas contendo, no máximo, três indivíduos em condições apropriadas de temperatura (24°C) e umidade do ar (60-70%), com ciclo claro-escuro de 12h e recebendo água à vontade. A ração específica para a espécie foi oferecida uma vez ao dia, após a limpeza das gaiolas.

Excluíram-se os animais que apresentassem variações anatômicas do nervo facial, visíveis por transparência após tricotomia que pudessem interferir nos resultados, como ramos do nervo mandibular para a musculatura do lábio superior, ramos do nervo bucal para a musculatura do lábio inferior e/ou interligações desses dois ramos, assim como os animais que apresentassem sinais de infecção e/ou malformações congênitas.

Houve perda de 3 animais apenas no grupo controle com óbitos no 1°, 23° e 40° dia de pós-operatório, sem causas evidentes definidas.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção das células multipotentes de polpa dentária

As células foram extraídas de dentes decíduos humanos, sendo inicialmente lavados com PBS acrescido a 2% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) seguido de extração da polpa com lima estéril e lavagem da mesma com a solução discriminada acima. A polpa foi transferida para um tubo onde adicionou-se tripsina diluída a 0.025%, seguido de incubação por 20 a 40 min a 37°C. Depois foram adicionados dois volumes do meio de cultura para inativar a tripsina, centrifugado a 1500 rpm por 5min e descartado o sobrenadante. A polpa foi transferida para uma placa de 6 poços, adicionado meio de cultura apropriado, sendo o mesmo trocado após 24h e depois trocado uma vez por semana até a polpa liberar células.

Os procedimentos acima descritos foram realizados pela pós-graduanda Dayane Cruz, no Instituto de Biologia da USP, sob supervisão da Profa. Dra. Regina Mingroni. As células foram então enviadas para o LIM-32 criopreservadas na passagem 4 para 5. O frasco criopreservado em nitrogênio líquido foi descongelado por agitação suave a 37°C e descontaminado através de imersão em etanol 70%.

Em fluxo laminar (ambiente estéril), o frasco foi aberto e o conteúdo (de aproximadamente 2ml), contendo as células tronco de polpa dentária, foi transferido para um tubo Falcon de 15 ml. Ao tubo Falcon, foi adicionado meio de cultura (junto com as células de polpa dentária), a fim de se remover o agente crioprotetor (DMSO) que é usado no meio de congelamento. O tubo Falcon foi centrifugado por cerca de 5 min a uma velocidade de 100xg, em temperatura entre 22 a 25°C.

Novamente, em fluxo laminar, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi novamente suspenso em 4 ml de meio de cultivo. Esse material foi transferido para um frasco (garrafa de cultura) T25 e incubado em estufa de CO₂ à 37°C. Em um prazo de 24 horas as células se aderiram à garrafa de cultura. A cada 48 horas o meio de cultura foi trocado após lavagem da garrafa T25 com PBS estéril. Quando as células atingiram 90% de confluência, a garrafa T25 foi tripsinizada. Assim que as células se desprendiam da garrafa T25 de cultura foi adicionado 4ml de meio de cultura. Esse material foi transferido para um tubo de 15 ml e centrifugado a 100xg por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e, ao *pellet*, adicionado 8 ml de meio de cultura. Esse material foi, agora transferido para uma

garrafa de cultura T75 e novamente incubado em estufa de CO₂ a 37°C, trocando-se o meio de cultura a cada 48 horas e nova tripsinização foi realizada quando as células atingiram 90% de confluência. Agora, a cada tripsinização (de 7 em 7 dias aproximadamente), o material obtido foi transferido para 2 garrafas, na próxima semana para 4 garrafas e na outra semana 8 garrafas e assim por diante. Até que atingíssemos o número de células necessárias para o experimento.

No dia do experimento, as garrafas T75 foram lavadas com PBS estéril, tripsinizadas, centrifugadas, e o pellet foi ressuspensão em aproximadamente 200 microlitros de matrix gel. Neste momento as células-tronco estavam em número de 2×10^6 por Eppendorf e em passagem de 8 para 9.

Os procedimentos acima descritos foram realizados no Laboratório de Investigações Médicas (LIM 32) do Departamento de Otorrinolaringologia da Universidade de São Paulo, pela bióloga Claudia Marchi, sob supervisão da Dra. Jeanne Oiticica.

4.2.2 Vetor lentiviral

A cultura de células primárias de CTPD, originárias de banco de células, foi marcada pela expressão do gene LacZ, através de modificação por transdução com vetor lentiviral pLV-Lacz

A manipulação do vetor lentiviral e transdução de suas células foi realizada no Laboratório de Vetores Virais, Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto de Câncer de São Paulo, LIM 24, em colaboração com os Drs. Bryan Eric Strauss e Daniela Bertolini Zanatta.

4.2.3 Grupos de estudo

Dividiu-se a amostra de 20 ratos *Wistar*, aleatoriamente, em dois grupos com 10 animais cada, denominados de acordo com o procedimento cirúrgico realizado, a seguir:

- *Grupo A (Grupo controle), autoenxerto*: indivíduos submetidos à dissecação do ramo mandibular do nervo facial esquerdo sob técnica microcirúrgica, 2 neurotmeses sequenciais com defeito de 5mm entre elas, reposicionamento do fragmento retirado (autoenxerto), mantendo-se a orientação original, suturados

com 6 pontos epineurais separados de fio monofilamentar nylon 10-0 (Ethicon®, Johnson and Johnson, USA) com agulha BV-7.

- *Grupo B, tubo de ácido poliglicólico preenchido com gel acelular de lâmina basal purificada (Matrigel®) + células-tronco de polpa dentária indiferenciadas (CTPD):* indivíduos submetidos às neurotmeses com defeito de 5mm, autoenxerto segundo técnica mencionada acima, seguido por interposição de conduíte de ácido poliglicólico (GEM neurotube, Synovis Micro, Birmingham, AL, USA) preenchido com Matrigel® + CTPD na concentração $1-2 \times 10^5$.

4.2.4 Protocolo anestésico e preparação dos animais

Para a identificação individual, cada animal recebeu uma marca amarela realizada com ácido pícrico em uma determinada região anatômica.

Antes de cada eletromiografia os animais foram anestesiados intra-peritonealmente no quadrante abdominal inferior direito com Tiopental (40mg/kg), permitindo níveis anestésicos por período de 30 min sem ação relaxante muscular, ponto fundamental para a execução deste exame, e sem interferência com as respostas eletrofisiológicas. Para os procedimentos cirúrgicos, utilizamos a associação de Xilazina (10mg/kg) e Ketamina (90mg/kg), intraperitonealmente no quadrante abdominal inferior direito permitindo assim níveis anestésicos satisfatórios e relaxamento muscular adequado por um período de 60 min, sem depressão respiratória. Quando necessárias, doses complementares foram administradas da mesma forma.

No pré-operatório todos os animais receberam antibioticoterapia profilática com penicilina cristalina (50.000U/kg) intramuscular (dose única) e dipirona para analgesia pós-operatória.

Realizou-se tricotomia das metades inferiores das faces de cada animal, com lâminas de bisturi n°23, individuais e descartáveis, após anestesia e anteriormente à avaliação funcional.

4.2.5 Protocolo cirúrgico

Uma vez anestesiados, identificados, tricotomizados e medicados de acordo com o descrito, os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e submetidos à

antisepsia. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ambiente e com materiais estéreis, de acordo com as normas de assepsia cirúrgica.

Protocolo cirúrgico do grupo A

Para cada animal os tempos cirúrgicos foram efetuados, na sequência seguinte:

- a) Incisão horizontal reta na derme da região de transição entre o terço médio e o terço inferior da face, do lado esquerdo, com extensão de aproximadamente 30mm;
- b) Hemostasia com gaze estéril e soro fisiológico (NaCl 0,9%);
- c) Dissecção por planos com exposição dos ramos mandibular e bucal do nervo facial esquerdo e glândula parótida;
- d) Colocação do afastador de pálpebras com visualização através do microscópio óptico (Carl Zeiss Surgical GmbH®, Oberkochen, Germany) (lente de 250mm, aumento de 16x) dos ramos mandibular e bucal do nervo facial esquerdo;
- e) Dissecção e individualização do ramo mandibular do nervo facial até a glândula parótida (Figura 1);



Figura 1. Dissecção e individualização dos ramos mandibular e bucal do nervo facial

- f) Incisões transversais nas regiões proximal e distal do ramo mandibular do nervo facial esquerdo com exérese de 5mm deste ramo, após medição com compasso de Castroviejo curvo (abertura máxima de 100mm);

- g) Reposicionamento do fragmento de nervo retirado (autoenxerto), mantendo-se a orientação original, suturados com 6 pontos epineurais separados de fio monofilamentar nylon 10-0 (Ethicon®, Johnson and Johnson, USA) com agulha BV-7.;
- h) Incisões transversais nas regiões proximal e distal do ramo bucal do nervo facial esquerdo com exérese de 5mm deste ramo a fim de não interferir na análise da regeneração do ramo mandibular (Figura 2).



Figura 2. Isolamento do ramo bucal do nervo facial para posterior secção

- i) Fechamento da incisão cirúrgica por planos, com fio categute 5-0 (subcutâneo) e mononylon 4-0 (pele).

Protocolo cirúrgico do grupo B

Para cada animal os tempos cirúrgicos foram efetuados de forma semelhante que os itens (a) a (g) do grupo A citados acima, seguindo-se na sequência seguinte:

- h) Posicionamento de tubo de ácido poliglicólico (neurotubo, GEM neurotube, Synovis Micro, Birmingham, AL, USA) de \pm 1,5cm de comprimento por 1,5mm de diâmetro, suturado no tecido paraneural com fio de nylon 10.0;
- i) Preenchimento do tubo de ácido poliglicólico, com 0,2mL de Matrigel® contendo CTPD
- j) Obliteração das extremidades do tubo de ácido poliglicólico com cola biológica (Evicel®, Ethicon 360, Johnson&Johnson);

- k) Incisões transversais nas regiões proximal e distal do ramo bucal do nervo facial esquerdo com exérese de 5mm deste ramo (Figura 3)
- l) Fechamento da incisão cirúrgica por planos, com fio catagute 5-0 (subcutâneo) e mononylon 4-0 (pele).



Figura 3. Aspecto final pós-operatório do Grupo B

4.2.6 Sacrifício dos animais

Seis semanas após o procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados com a administração intracardíaca de KCl a 19,1%, após serem submetidos, sequencialmente, à anestesia (protocolo 4.2.5), avaliação funcional objetiva (protocolo 4.2.8) e retirada do nervo operado (protocolo 4.2.9.1).

4.2.7 Protocolo da avaliação funcional objetiva

Todos os animais foram submetidos à eletroneuromiografia (teste de neurocondução motora) do ramo mandibular do nervo facial para a obtenção do potencial de ação muscular composto (PAMC) e posterior análise dos valores da amplitude em três momentos: pré-operatório imediato, terceira e sexta semanas de pós-operatório.

Antes da realização destes exames os animais foram anestesiados, identificados e tricotomizados de acordo com o protocolo 4.2.4.

Técnica para obtenção dos PAMCs

A técnica para a obtenção dos PAMCs foi modificada de Salomone et al., inicialmente descrita em 2012, onde utilizou-se eletromiógrafo portátil Neurosoft® (Ivanovo, Rússia), modelo Neuro-MEP-Micro® (Neurosoft®; Ivanovo, Russia), conectado a um computador portátil HP (HP®, Hewlett-Packard®, Palo Alto, CA, EUA) Modelo Pavilion dv5® por uma entrada *Universal Serial Bus* (USB) dispensando, assim, o uso de fonte externa de energia.

A configuração do eletromiógrafo (filtro passa alta 10Hz; filtro passa baixa 10kHz; filtro *notch* desligado; margem de entrada do sinal de 60mV; taxa de amostragem de 10kHz), a visualização e a análise dos PAMCs foram realizados com o software Neuro-MEP. NET® versão 2.4.23.0® (Neurosoft®; Ivanovo, Russia).

Para a captação foram utilizados dois eletrodos de agulha subdérmica, sem revestimento de *teflon*, medindo 12mm de comprimento e 0,35mm de diâmetro, da marca Spes Medica® (Spes Medica Srl®, Battipaglia, Itália) dispostos em paralelo a uma distância fixa de 5mm entre si. Estes eletrodos receberam um revestimento isolante de 9mm de extensão, permanecendo os 3mm distais sem revestimento. A parte distal do eletrodo não revestida foi inserida totalmente no músculo do lábio inferior do rato, a uma distância de 2mm da comissura labial e do lábio inferior, no sentido longitudinal, paralelo às suas fibras, e ipsilateral ao lado estimulado, com o polo de captação voltado proximal e o polo de referência voltado distal em relação ao estimulador.

A varredura utilizada foi de 1,0ms/divisão, com uma janela total de 10ms e ganho de 2,5mV/divisão.

A estimulação elétrica foi realizada por meio de um eletrodo igual ao descrito acima, porém posicionado sobre a pele, em cima do ramo mandibular do nervo facial, após a identificação deste por transparência, a uma distância de 20mm do eletrodo de captação e com o anodo (+) posicionado proximal e o catodo (-) distal em relação à captação. Cada estímulo elétrico utilizado foi único, sem promediação, com duração de 0,2ms e intensidade inicial de 0,1mA. Aumentou-se a intensidade de estímulo em 0,1mA gradativamente até alcançar a intensidade supramáxima em cada lado do animal. Para a aquisição dos PAMCs nas terceiras e sextas semanas do pós-operatório, utilizou-se o mesmo valor do estímulo supramáximo de cada animal obtido no pré-operatório.

Como fio neutro (terra), foi utilizado um eletrodo monopolar da mesma marca e revestido de forma semelhante aos eletrodos descritos anteriormente, porém posicionado no ponto médio entre a estimulação e a captação. Caso a impedância ultrapassasse 5 Ω , os eletrodos eram recolocados e/ou substituídos. A amplitude pico-a-pico foi medida em 'mV'.

4.2.8 Protocolo de avaliação histológica

4.2.8.1 Retirada do nervo facial

Retirou-se o nervo facial com o animal, ainda vivo, anestesiado (protocolo 4.2.4), após a identificação e individualização do ramo mandibular do nervo facial operado no grupo A e da posterior remoção do tubo de ácido poliglicólico do nervo no grupo B.

Para a realização deste procedimento, seccionou-se o nervo transversalmente em suas extremidades (proximal e distal) com uma lâmina de barbear individual, removendo-o para uma superfície metálica lisa, previamente esterilizada com álcool a 70%. Após a retirada dos nervos, os animais foram sacrificados de acordo com o protocolo 4.2.6.

4.2.8.2 Tratamento do nervo retirado

Sob visualização em microscópio óptico (Carl Zeiss Surgical GmbH®, Zeiss®, Oberkochen, Germany) (lente de 250mm e aumento 16x) a 1mm da sutura distal do nervo, este foi seccionado transversalmente sendo retirados dois fragmentos: proximal (P) e distal (D). Os segmentos foram biselados em suas extremidades opostas e condicionados em recipientes estéreis individuais, sendo que os distais foram embebidos em glutaraldeído 2% e paraformaldeído a 1% tamponado com fosfato de sódio 0,1M (pH = 7,3), para posterior estudo histológico, e os proximais em paraformaldeído 4% tamponado em fosfato-salino (pH=7,2), para posterior estudo imunohistoquímico.

A. Preparação histológica

Após a fixação dos segmentos distais com tetróxido de ósmio a 2% tamponado com cacodilato de sódio 0,1M (pH = 7,4), foi realizada a desidratação em banhos de imersão gradativos em concentrações crescentes de etanol (70% por 30min; 90% por 30min; e 100% por 20min por duas vezes), infiltração com óxido de propileno em concentrações de 1:3, 1:2 e 1:1 por 60min cada, impregnação com resina pura por 5h em vácuo e a inclusão dos segmentos com resina Epóxi® até sua polimerização em estufa a 60°C por 72h.

Finalizadas estas etapas, foram realizados cortes transversais de 1µm de espessura com micrótomo 820- II® (Reichert-Jung®, Austria) e posterior coloração com azul de toluidina a 1%.

B. Preparação para imunofluorescência indireta

Os segmentos proximais e distais de cada animal, depois de fixados em paraformaldeído a 4% e tampão fosfato-salina (pH=7,2) por 24h, foram emblocados em parafina e preparados para microscopia com cortes em lâminas de 8µm realizados com micrótomo 820-II® (Reichert-Jung®, Austria). Após remoção da parafina foram imersos em xilol a 65°C, por 5 minutos, o tecido foi reidratado em banhos de etanol com concentrações decrescentes, por 15 minutos cada (dois banhos a 100%, um banho a 95%, um banho a 70%) e o processo foi bloqueado para diminuir a auto-fluorescência, em três banhos de 10 minutos cada, em peróxido de hidrogênio a 3%. Uma vez transferidas para a solução tampão fosfato-salina (pH=7,2), as lâminas foram incubadas a 20°C, por 16 horas, com anticorpo anti-S100 (identificação das células de Schwann) gerado em coelho (Abcam, Cambridge MA, EUA) ou anticorpo anti-lamina A/C (detecção de células humanas transplantadas) gerado em camundongo (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz CA, EUA), diluídos 50 vezes. Após duas lavagens por dez minutos cada, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários dirigidos à porção Fc de anticorpos de coelho e camundongo, conjugados respectivamente a Alexa 488 e Alexa 596 (Jackson Immunoresearch, West Grove PA, EUA). Após lavagens, as lâminas foram montadas em meio de montagem com 4',6-diamidino 2-phenilindol-dihydrochloride (DAPI) da empresa Abcam (Cambridge, MA, EUA).

4.2.8.3 Estudo histopatológico

Sob visualização em microscópio óptico (Nikon® modelo Eclipse E 600®) as lâminas dos segmentos distais foram fotografadas com máquina fotográfica Nikon® (modelo Coolpix E 955®) com aumentos de 50x (1 campo - nervo inteiro) e 400x (3 campos de 30.000µm² totalizando uma área de 90.000µm²). Posteriormente as imagens foram transportadas para o computador portátil (Hewlett-Packard® Modelo Pavilion dv5®) e analisadas por meio do software SigmaScan Pro 5.0® (SPSS Science®, Chicago, USA).

Antes das sessões fotográficas sob maior aumento (400x), o microscópio foi colimado e calibrado com uma lâmina-escala específica para que cada campo de 400x representasse exatamente uma área de $30.000\mu\text{m}^2$. Todas as fotos foram digitalizadas e analisadas aleatoriamente.

4.2.8.4 Análise histológica qualitativa

Na análise qualitativa, foram observados os seguintes parâmetros: arquitetura geral do nervo (reorganização axonal em fascículos, a presença de escape de fibras axonais para fora dos limites do epineuro) e grau de reação tecidual e remielinização (com ênfase na avaliação da espessura do epineuro, característica do estroma, do grau de neoangiogênese, da quantidade de axônios mielinizados, do aspecto da bainha de mielina e do diâmetro axonal)

4.2.8.5 Análise quantitativa

A análise quantitativa foi realizada com as três imagens fotografadas sob aumento de 400x dos seguimentos distais de cada nervo, e avaliou-se:

- a) A quantidade total de axônios mielinizados em uma área parcial do nervo ($90.000\mu\text{m}^2$);
- b) Densidade parcial da quantidade de axônios mielinizados [quantidade parcial de axônios mielinizados / área parcial ($90.000\mu\text{m}^2$)];
- c) Maturação da mielina por meio da medida do menor valor do diâmetro externo (incluindo a bainha de mielina) contido em uma área de $90.000\mu\text{m}^2$.

Excluíram-se as fibras que não apresentaram seu centro dentro do campo fotografado.

4.2.8.6 Análise por imunofluorescência indireta

As imagens da imunofluorescência indireta dos segmentos proximais foram obtidas com microscópio Zeiss® (Laser Scanning Microscope LSM880, Alemanha), software ZEN (Zeiss Efficient Navigation, Germany) no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sob supervisão da Profa. Dra. Luciana A. Haddad. Foi estimada a intensidade do sinal das imagens de cortes de nervo não tratados com o anticorpo primário, mas com o secundário conjugado a fluorocromo. Esse valor foi subtraído da intensidade do sinal de

imagens de cortes de nervos que haviam sido incubados com anticorpo primário seguido pelo secundário, reduzindo assim o excesso de sinal de fundo. Foram obtidas seções z de 1 μm e as imagens foram agrupadas.

4.2.9 Análise estatística

O cálculo da amostra foi baseado em estudos anteriores, semelhantes, assumindo poder estatístico de 80% e valor α de 5%.

Os resultados dos valores das variáveis ordinais (quantitativas) da avaliação funcional (amplitude do potencial de ação muscular composto) e da avaliação histológica (densidade e diâmetro axonal em uma área parcial de $90.000\mu\text{m}^2$) foram comparados utilizando o software *Statistical Package for Social Sciences*® (SPSS, SPSS Inc.®, Chicago, IL, EUA), em sua versão 20.0®. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

Para comparação da amplitude entre os grupos e os momentos de avaliação, foram utilizadas equações de estimação generalizadas com matriz de correlações autoregressivas de ordem 1 entre os momentos, com distribuição marginal normal e função de ligação identidade (McCullagh e Nelder, 1989), seguida de comparações múltiplas de Bonferroni (Neter, *et. al.*, 1996) para saber entre quais grupos e momentos ocorreram diferenças na amplitude.

A densidade axonal distal e o diâmetro axonal foram descritos segundo grupos com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) (Kirkwood e Sterne, 2006) e comparados entre os grupos com uso de testes Kruskal-Wallis seguidos de comparações múltiplas de Dunn (Neter, *et. al.*, 1996).

5 RESULTADOS

Avaliação funcional

Pela Tabela 1, a amplitude do potencial de ação muscular composto (PAMC) apresentou valores, em 3 e 6 semanas, de, respectivamente, $0,39 \pm 0,22$ mV e $0,75 \pm 0,46$ mV no grupo autoenxerto e $1,95 \pm 1,9$ mV e $3,79 \pm 1,74$ mV no grupo CTPD. Assim, a amplitude do PAMC mostrou-se superior nos grupo tratado com CTPD comparativamente ao controle.

Tabela 1. Descrição da amplitude do PAMC (mV), densidade axonal distal (axônios/ μm^2) e diâmetro axonal (μm) segundo grupos (autoenxerto e CTPD) e momentos de avaliação.

Variável	Grupo		<i>p</i>
	Autoenxerto (N = 7)	CTPD (N = 10)	
Distal (densidade)			0,001
média \pm DP	$0,021 \pm 0,003$	$0,014 \pm 0,004$	
mediana (mín.; máx.)	0,022 (0,015; 0,023)	0,014 (0,006; 0,02)	
Diâmetro axonal (micrometros)			<0,001
média \pm DP	$2,13 \pm 0,07$	$3,04 \pm 0,49$	
mediana (mín.; máx.)	2,15 (2,04; 2,21)	3,01 (2,34; 3,92)	
Amplitude (6 semanas)			<0,001
média \pm DP	$0,75 \pm 0,46$	$3,79 \pm 1,74$	
mediana (mín.; máx.)	0,7 (0,23; 1,53)	2,9 (2,1; 7,36)	

Teste Mann-Whitney

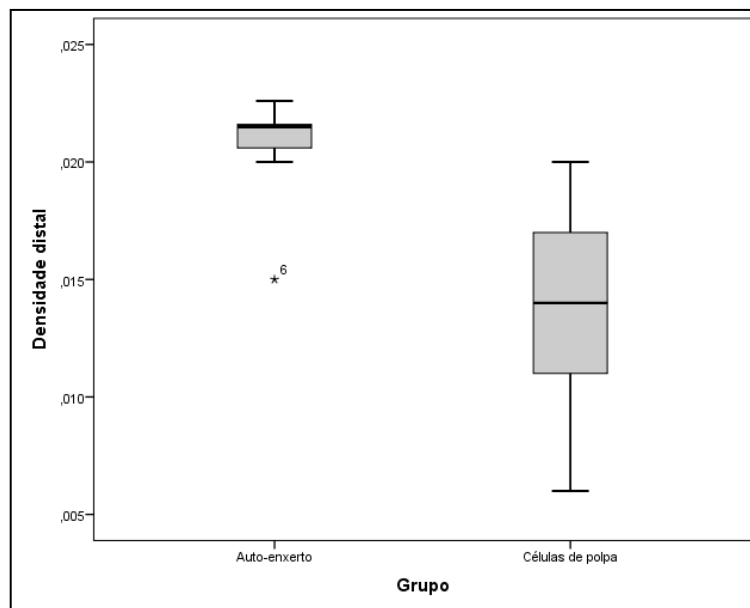


Figura 4. Densidade axonal distal

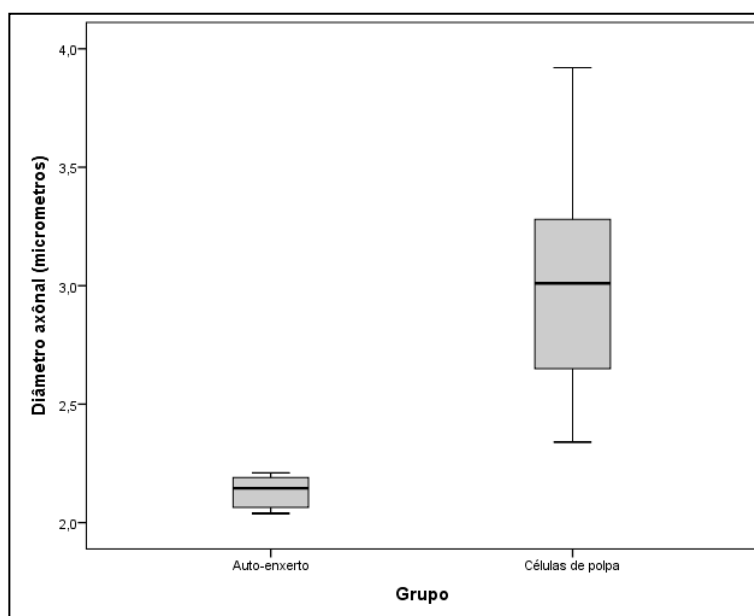


Figura 5. Diâmetro axonal

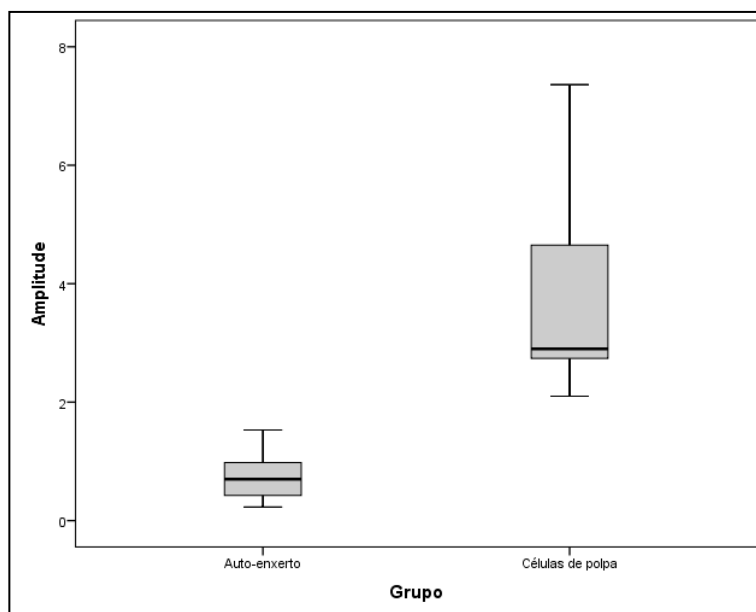


Figura 6. Amplitude do PAMC

A Tabela 2 mostra que no grupo controle houve redução da amplitude do PAMC quando comparado o momento pré-operatório com 3 e 6 semanas ($p < 0,001$ para ambos), mas não se observou aumento da amplitude do PAMC estatisticamente significativo entre 3 e 6 semanas ($p > 0,999$).

Tabela 2. Descrição da amplitude do PAMC (mV) segundo grupos e momentos de avaliação.

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	P	IC(95%)	
						Inferior	Superior
Autoenxerto	Normal – 3 semanas	5,47	0,89	1	<0,001	2,46	8,47
	Normal – 6 semanas	5,11	0,84	1	<0,001	2,28	7,93
	3 semanas – 6 semanas	-0,36	0,89	1	>0,999	-3,37	2,64
CTPD	Normal – 3 semanas	3,66	0,75	1	<0,001	1,15	6,18
	Normal – 6 semanas	1,82	0,70	1	0,612	-0,54	4,19
	3 semanas – 6 semanas	-1,84	0,75	1	0,912	-4,35	0,68
Pre-op	Autoenxerto – CTPD	0,25	0,78	1	>0,999	-2,37	2,87
3 semanas	Autoenxerto – CTPD	-1,56	0,78	1	>0,999	-4,18	1,06
6 semanas	Autoenxerto – CTPD	-3,04	0,78	1	0,006	-5,66	-0,42

No grupo tratado com CTPD houve redução média estatisticamente significativa da amplitude do PAMC do momento pré-operatório para 3 semanas ($p < 0,001$), seguido de

aumento médio de suas amplitudes, apesar dos valores obtidos em 3 e 6 semanas não terem distinguido entre si de forma estatisticamente significativa.

Ao compararmos os valores médios da amplitude do PAMC do pré-operatório ao final do experimento, observou-se redução estatisticamente significativa no grupo controle. No grupo tratado com CTPD não se observou redução estatisticamente significativa entre estes dois momentos.

Nas análises comparativas da amplitude do PAMC, ao final do experimento, observou-se diferença estatisticamente significativa da amplitude do PAMC entre o grupo controle e o tratado com CTPD ($p=0,006$), sendo os maiores valores obtidos pelo grupo de CTPD.

Avaliação histológica

Análise histológica qualitativa

Observamos que nos dois grupos houve uma reorganização em 1 a 3 fascículos. Os fascículos eram envoltos por epineuro com células de perfil fusiforme, com escape de fibras regeneradas para fora dos limites do epineuro (Figura 7).

Na análise microscópica das lâminas do grupo autoenxerto, evidenciou-se a presença de axônios mielinizados com grau variável de mielinização, de forma irregular, diâmetros variados e bainha de mielina fina. As células de Schwann, em grande quantidade, tinham núcleos pequenos e densos e tamanhos inconsistentes. Observou-se grande quantidade de fibroblastos, intensa neoangiogênese, epineuro e perineuro espessos.

Nos nervos do grupo tratado com CTPD, verificou-se que os axônios apresentavam formatos mais regulares, diâmetro maior e bainha de mielina mais espessa do que nos do grupo controle.

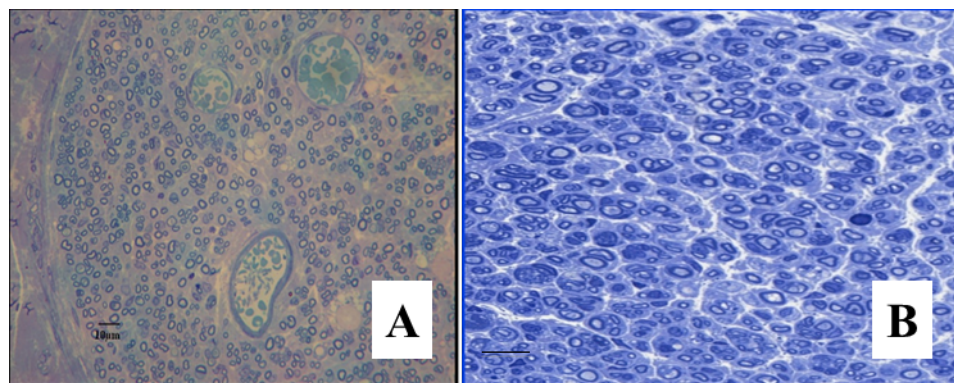


Figura 7. Corte histológico do nervo facial de rato corado com azul de toluidina a 1% (Microscopia óptica). A=grupo autoenxerto. B=grupo tratado com CTPD. Escala correspondente a 10 µm

Análise histológica quantitativa

A Tabela 1 mostra que tanto a densidade axonal distal como o diâmetro axonal diferiram estatisticamente entre os grupos ($p=0,001$ e $p<0,001$, respectivamente). A densidade axonal distal mostrou-se superior no grupo do autoenxerto ($0,021\pm 0,003$ axônios/ μm^2) comparativamente ao grupo tratado com CTPD ($0,014\pm 0,004$ axônios/ μm^2). Já o diâmetro axonal distal, apresentou maiores valores no grupo tratado com CTPD ($3,04\pm 0,49\mu\text{m}$) e menores valores no grupo controle ($2,13\pm 0,07\mu\text{m}$).

Imunofluorescência

Ao ensaio de imunofluorescência, utilizou-se lâmina de língua humana como controle positivo para marcação com anticorpo específico para a proteína humana lamina A/C, compatível com sua localização na lâmina nuclear, subjacente ao envelope nuclear (Figura 8). Em cortes de nervo facial dos animais submetidos ao procedimento cirúrgico, observaram-se células positivas para lamina-A/C humana no segmento distal do nervo. Parte dessas células apresentou marcação dupla para a proteína S100, própria de células de Schwann (Figura 8, setas), no segmento distal do nervo analisado. Ambos os segmentos, proximal e distal, do ramo mandibular do nervo facial com neurotubo mostraram-se positivos para S100. Os dados indicam a presença de células humanas viáveis e com expressão de um marcador de células de Schwann.

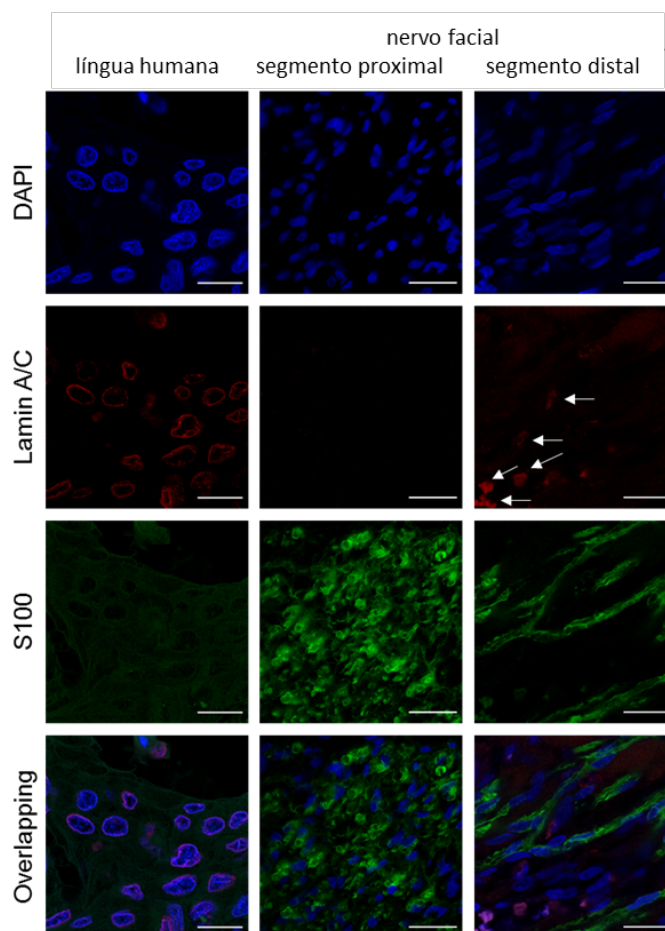


Figura 8. Imunofluorescência evidenciando marcação em lamina A/C nos segmentos distais dos nervos faciais.

Língua humana foi utilizada como controle positivo para lamina A/C e como controle negativo para o marcador de células de Schwann S100. Segmentos proximais e distais do ramo mandibular do nervo facial mostraram-se positivos para S100. Algumas células (setas) no segmento distal do nervo apresentaram co-marcação para o anticorpo anti-lamina A/C, específico para células humanas, na região perinuclear. DNA foi reconhecido pelo marcador DAPI (4',6-diamidino 2-phenilindol-dihydrochloride).

6 DISCUSSÃO

As células-tronco mesenquimais de polpa dentária são células-tronco heterogêneas multipotentes, de origem mesenquimal. Da-Cruz (2016) obteve as células utilizadas neste trabalho e demonstrou sua natureza mesenquimal por citometria de fluxo, revelando essa linhagem positiva para a expressão dos marcadores característicos de células de origem mesenquimal (CD73-PE, CD90-Alexa700, CD105-PE e CD166-PE) e de adesão (CD29-PerCP) e negativa para a expressão dos marcadores característicos de células de origem hematopoiética (CD34-PerCP-Cy5 e CD45-FITC) e endotelial (CD31-PE). Para confirmar suas propriedades de CT, Da-Cruz (2016) testou a capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares, como bem aceito na literatura (Shekar e Ranganathan, 2012). A diferenciação adipogênica foi confirmada após 21 dias de cultivo em meio adipogênico, pela marcação com o corante Oil Red em depósitos de gordura e pela expressão do RNAm do gene que codifica *FABP4*, proteína específica de adipócitos. A diferenciação condrogênica foi confirmada por meio do corante Alcian Blue em cortes de *pellets* celulares que haviam sido cultivados por 21 dias em meio condrogênico. Utilizando-se o corante Alizarin Red em células cultivadas por 21 dias em meio osteogênico, Da-Cruz (2016) demonstrou que a linhagem usada neste estudo tem capacidade de diferenciação em osteócitos. Desta forma, em trabalho de mestrado, Da-Cruz (2016) concluiu que a linhagem celular fornecida a este estudo tinha origem mesenquimal e capacidade de diferenciação em três tipos celulares derivados do mesoderma.

As CTPD possuem vantagens clínicas quando comparadas a outras CT mesenquimais, como as derivadas da medula óssea, do tecido adiposo ou do sangue periférico, tanto pela facilidade e baixa morbidade na sua obtenção quanto pela maior taxa de proliferação *in vitro*.

Localmente, as CTPD induzem a neoangiogênese e, pela sua diferenciação em células de suporte como as células de Schwann, facilitam a regeneração axonal. Observa-se, também, que a cultura dessas células produz fatores neurotróficos como fator de crescimento neural, fator neurotrófico cerebral e fator neurotrófico derivado de células da glia. Essa produção de fatores neurotróficos determinou benefícios terapêuticos em modelos animais de infarto miocárdico, lúpus eritematoso sistêmico, colite e lesão

isquêmica cerebral. Além disso, as CTPD apresentam potencial ação imunomoduladora, pela supressão da proliferação de células T (Kerkis *et al.*, 2012).

Para as CTPD a criação de um banco de células é factível e uma realidade em países como Japão, Noruega e Índia tanto pelas características citadas acima como pela facilidade de obtenção, baixo potencial de imunogenicidade, potencial de imunomodulação com imunossupressão de células T alorreativas superior à observadas em células de medula óssea e capacidade de multidiferenciação mesmo após criopreservação (Kerkis *et al.*, 2012).

No presente estudo, a avaliação funcional demonstrou melhor recuperação da amplitude do PAMC no grupo tratado com CTPD ($1,95 \pm 1,9\text{mV}$ e $3,79 \pm 1,74\text{mV}$) comparativamente ao grupo controle ($0,39 \pm 0,22\text{mV}$ e $0,75 \pm 0,46\text{mV}$, $p=0,006$). Em estudo anterior, seguindo a mesma metodologia deste, publicado em 2013 por Costa *et. al* onde comparou-se a regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos após autoenxerto, interposição de neurotubo de ácido poliglicólico e transplante de células tronco de medula óssea indiferenciadas (CTMOi) ou diferenciadas em células de Schwann (CTMOd) observamos valores de amplitude do PAMC em 3 e 6 semanas de $1,01 \pm 0,63\text{mV}$ e $1,81 \pm 0,77\text{mV}$ no grupo CTMOi e de $0,86 \pm 0,39\text{mV}$ e $2,7 \pm 0,53\text{mV}$ no grupo de CTMOd, mostrando-se inferiores aos obtidos no grupo tratado com CTPD, apesar da análise comparativa não ter demonstrado diferença estatisticamente significativa. Conforme esperado, as amplitudes do PAMC reduziram em 3 semanas, em todos os grupos, em decorrência do processo regenerativo inicial neste momento do estudo com diferença estatisticamente significativa em relação ao pré-operatório em todos os grupos. Ao final do estudo, todos os grupos apresentaram melhora da resposta funcional comparativamente a 3 semanas. Entretanto, no grupo controle (autoenxerto), não houve recuperação suficiente, em 6 semanas, a ponto de eliminar a diferença estatística em relação ao pré-operatório, fato que ocorreu em todos os grupos tratados com CT. Ou seja, observamos melhora funcional nos grupos tratados com CT, de forma superior ao observado no grupo controle, porém o grupo tratado com CTPD foi o que revelou os maiores valores de amplitude do PAMC com seis semanas do experimento, sendo o único a apresentar diferença significativa estatisticamente em relação ao grupo controle ($p=0,006$).

Assim, observa-se que os grupos tratados com CT apresentaram resultados funcionais superiores, sendo o grupo tratado com CTPD o com melhores resultados.

Segundo a tabela 5, na análise histológica quantitativa, a densidade axonal mostrou-se superior no grupo do autoenxerto ($0,021 \pm 0,003$ axônios/ μm^2), seguido do grupo tratado com CTMOd ($0,017 \pm 0,003$ axônios/ μm^2), CTMOi ($0,015 \pm 0,002$ axônios/ μm^2) e CTPD ($0,014 \pm 0,004$ axônios/ μm^2), nesta ordem. Observou-se diferença estatisticamente significativa ao comparar-se o grupo de autoenxerto com o de CTMOi ($p=0,003$) e CTPD ($p<0,001$), não mostrando diferença estatisticamente significativa com o grupo tratado com CTMOd ($p=0,086$). Já o diâmetro axonal distal, apresentou maiores valores no grupo tratado com CTMOd ($3,5 \pm 0,16 \mu\text{m}$), seguido do grupo com CTMOi ($3,15 \pm 0,32 \mu\text{m}$), CTPD ($3,04 \pm 0,49 \mu\text{m}$) e com menores valores no grupo controle ($2,13 \pm 0,07 \mu\text{m}$), sendo os valores observados no grupo controle estatisticamente inferiores aos demais grupos e não se observando diferença estatisticamente significativa entre os grupos do tratamento.

Com relação à análise histológica qualitativa, amplamente utilizadas na literatura, observou-se que os grupo tratado com CTPD, CTMOd e CTMOi apresentaram menos reação tecidual inflamatória e menor densidade axonal quando comparados ao outro grupo autoenxerto.

O achado de maior densidade axonal no grupo do autoenxerto, provavelmente, corresponde a inervações múltiplas e não-efetivas, denominadas *sprouting* axonal. Costa *et al.* (2012) descreveu modelo para análise histológica quantitativa do ramo mandibular do nervo facial de ratos *Wistar*, onde encontrou densidade parcial média de $0,018 \pm 0,002$ axônios/ μm^2 nas amostras de axônios distais em uma área de $90.000 \mu\text{m}^2$. Assim, os valores observados no grupo controle deste estudo, $0,021 \pm 0,003$ axônios/ μm^2 , mostram-se superiores aos descritos para nervos normais. Todos os demais grupos tratados com CT apresentaram valores de densidade axonal inferiores ao descrito para a normalidade e sendo, assim, compatíveis com a histologia de um nervo lesado e em processo regenerativo. Assim, observa-se que os maiores valores de densidade axonal não se correlacionam com a efetividade da regeneração neural, estando, provavelmente, relacionados ao processo de *sprouting* axonal, fato que explica a maior densidade observada no grupo controle que nos grupos tratados com CT.

Segundo Schmalbruch (1986), o diâmetro axonal mostrou-se como o melhor critério para avaliação da regeneração neural por relacionar-se com fibras com maior bainha de mielina e, conseqüentemente, mais eficazes e maduras. Adicionalmente, Titmus e Faber (1990) demonstraram que o diâmetro axonal consistiu em variável confiável para avaliação da regeneração neural e do prognóstico funcional por sua relação direta com a velocidade de condução neural e a probabilidade de inervação do órgão alvo.

À imunofluorescência, detectou-se o marcador lamina humana em células do segmento distal, e S100, expresso por células de Schwann, nas porções proximais e distais nos ramos mandibulares retirados do grupo tratado com CTPD. A região perinuclear de algumas células do segmento distal do nervo marcadas pelo anticorpo que reconhece especificamente a proteína lamina A/C humana em células também positivas para o marcador S100, indicam a presença de células humanas viáveis e com fenótipo de células de Schwann ao final do experimento. Com isso, demonstramos a presença de CTPD viáveis na regeneração neural mesmo ao final do experimento. Provavelmente, a viabilidade das CTPD fez-se possível pelo microambiente mais favorável à sobrevivência celular propiciado pelo neurotubo absorvível de ácido poliglicólico.

Costa *et al.* (2013) obtiveram resultado similar, ao utilizar o mesmo tipo de neuroconduíte de ácido poliglicólico e ao demonstrar a presença de células exógenas viáveis e integradas ao tecido neural ao final de seis semanas de experimento. No entanto, neste estudo utilizando CTMO, não se observou mudança do fenótipo *in vivo*, ou seja, as células transplantadas indiferenciadas continuaram indiferenciadas até o final do experimento (6 semanas), e as transplantadas diferenciadas em Schwann (cuja diferenciação havia sido realizada *in vitro*) mantiveram seu fenótipo diferenciado após 6 semanas; diferente do que ocorreu em nosso experimento. Observou-se que no grupo tratado com CTMOi, após seis semanas, houve marcação em β -galactosidase, mas não em S100 e no grupo tratado com CTMOd demonstrou-se a comarcação por β -galactosidase e S100. Isso poderia ser interpretado como uma vantagem das CTPD em relação às de medula, já que as primeiras se diferenciaram *in vivo*. É interessante observar que no trabalho de Costa *et al.* (2013), o marcador proteico para identificar as CT no animal era produto da expressão de um gene de bactéria usado em vetor lentiviral e integrado no genoma da célula-tronco. No presente estudo, utilizamos uma proteína humana, isto é, expressa pelo próprio genoma da célula humana, que embora tenha o gene ortólogo no

genoma de rato, pôde ser identificada devido à alta especificidade do anticorpo para a sequência proteica de lamina A/C humana.

Salomone *et al.* (2013) utilizaram metodologia semelhante mas com neurotubo de silicone e não visualizaram células viáveis à imunofluorescência indireta ao final do experimento.

Sasaki *et al.* em 2008, 2011 e 2014 apresentaram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo ao evidenciar melhora histológica e funcional na regeneração neural do ramo bucal do nervo facial ao associar transplante de *mix* celular contendo CS e CTPD. Adicionalmente, observou-se, ao comparar os resultados obtidos em 2008 e 2011, melhor regeneração neural no grupo tratado com neuroconduíte absorvível de ácido poli-DL-láctico-co-glicólico comparativamente ao grupo tratado com neurotubo inabsorvível de silicone, assim como descrito na literatura. No entanto, questiona-se se os resultados alcançados foram advindos da presença das CTPD ou das CS uma vez que as CS são células que, sabidamente, participam ativa e amplamente na regeneração neural.

Nossos resultados, também, mostraram-se em concordância com o obtido por Dai *et al.* (2013) onde a terapia com transplante de CTPD mostrou-se superior ao controle no reparo do nervo ciático de ratos, apesar da associação CS + CTA ter obtido os melhores resultados.

O modelo experimental utilizando o ramo mandibular do nervo facial de ratos *Wistar* foi escolhido por tratar-se de animal de fácil manuseio, com parâmetros anatômicos e histológicos bem descritos na literatura e com genoma 99% similar ao humano. O autoenxerto é, atualmente, o procedimento padrão-ouro utilizado no dia-a-dia do otorrinolaringologista. Trabalho prévio de Costa *et al.* 2013, utilizando mesma metodologia do presente estudo, mostrou não haver diferença estatisticamente significativa quanto a avaliações funcionais ou histológicas ao comparar-se a técnica de autoenxerto e a que adiciona a utilização de neurotubo de ácido poliglicólico. Assim, por ser a técnica utilizada como padrão-ouro na clínica diária, com equivalência funcional, histológica e menos onerosa que a envolvendo neurotubo, optou-se pelo uso apenas do autoenxerto no grupo controle deste estudo.

As CTMO já se mostraram com efeito potencializador da regeneração do nervo facial em ratos *Wistar* (Costa *et al.*, 2013; Salomone *et al.*, 2013). No entanto, as CTPD

mostram-se atraentes por apresentarem obtenção mais simples, com maiores taxas de proliferação celular *in vitro* e, teoricamente, com melhor potencial para regeneração neural por serem diretamente derivadas da crista neural.

Importante observar que, no presente estudo, usou-se transplante de células-tronco humanas em ratos, caracterizando, assim, como um transplante celular heterólogo. Análise histológica qualitativa evidenciou menor reação inflamatória no grupo tratado com transplante de CTPD comparativamente ao controle, confirmando a não-imunogenicidade das CTPD já descritas em estudos anteriores, assim como a não-indução de teratoma (Kerkis *et al.* 2008, Yamaza *et al.* 2010; Kerkis *et al.*, 2012), potenciais complicações do uso clínico de CT. Assim, a utilização de CTPD humanas no presente estudo facilitaria a transposição para futuros ensaios clínicos envolvendo humanos quanto à baixa imunogenicidade deste tipo celular.

Assim, este estudo demonstrou a superioridade funcional e histológica da presença de CTPD comparativamente ao autoenxerto. Nossos achados estão de acordo com outros estudos que demonstraram efeitos benéficos das CTPD na regeneração neural.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a análise funcional da regeneração do ramo mandibular do nervo facial de ratos *Wistar*, através da amplitude do potencial de ação muscular composto à eletroneuromiografia, foi superior no grupo tratado com células-tronco de polpa dentária associada a neurotubo de ácido poliglicólico comparativamente ao grupo controle.

Com relação à análise histológica qualitativa, observou-se que o grupo tratado com células-tronco de polpa dentária apresentou menos reação tecidual inflamatória e menor densidade axonal comparativamente ao outro grupo autoenxerto.

Na análise histológica quantitativa, o grupo tratado com células-tronco de polpa dentária mostrou-se com menores valores de densidade axonal e maiores diâmetros axonais distais, evidenciando melhor perfil histológico comparativamente ao grupo controle.

As células-tronco derivadas de polpa dentária foram observadas, após seis semanas, viáveis e integradas ao tecido neural com expressão de marcadores de células de Schwann, diferente da observada *in vitro*.

Comparativamente às células-tronco de medula óssea indiferenciadas e diferenciadas em células *Schwann-like*, observamos melhores resultados funcionais no grupo tratado com células-tronco de polpa dentária e perfil histológico similar. À imunofluorescência, as células-tronco derivadas de medula óssea, também, foram observadas viáveis e integradas ao tecido neural, mas com expressão do marcador semelhante ao observado *in vitro*.

8 ANEXOS

Tabela 3. Descrição da amplitude do PAMC (mV) segundo grupos e momentos de avaliação.

Momento	Grupo				p Grupo	p Momento	p Interação
	Autoenxerto (N = 7)	CTMOi (N = 7)	CTMOd (N = 6)	CTPD (N = 10)			
Normal							
média ± DP	5,86 ± 2,48	4,05 ± 2,37	3,92 ± 1,24	5,61 ± 2,28			
mediana (mín.; máx.)	6,25 (1,76; 9,35)	4,27 (1,36; 7,78)	4,5 (2,18; 5,02)	5,05 (2,23; 9,72)			
3 semanas							
média ± DP	0,39 ± 0,22	1,01 ± 0,63	0,86 ± 0,39	1,95 ± 1,9	<0,001	<0,001	0,034
mediana (mín.; máx.)	0,34 (0,14; 0,83)	0,98 (0,22; 2,15)	0,83 (0,44; 1,56)	1,54 (0,59; 7,02)			
6 semanas							
média ± DP	0,75 ± 0,46	1,81 ± 0,77	2,7 ± 0,53	3,79 ± 1,74			
mediana (mín.; máx.)	0,7 (0,23; 1,53)	1,83 (0,92; 3,18)	2,51 (2,36; 3,76)	2,9 (2,1; 7,36)			

Equações de estimação generalizadas com distribuição normal e função de ligação identidade

Tabela 4. Resultado das comparações múltiplas da amplitude do PAMC.

Pairwise Comparisons							
Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
Autoenxerto	Normal - 3 semanas	5,47	0,89	1	<0,001	2,46	8,47
	Normal - 6 semanas	5,11	0,84	1	<0,001	2,28	7,93
	3 semanas - 6 semanas	-0,36	0,89	1	>0,999	-3,37	2,64
CTMOi	Normal - 3 semanas	3,04	0,89	1	0,043	0,04	6,05
	Normal - 6 semanas	2,24	0,84	1	0,489	-0,58	5,07
	3 semanas - 6 semanas	-0,80	0,89	1	>0,999	-3,81	2,21
CTMOd	Normal - 3 semanas	3,06	0,96	1	0,098	-0,18	6,31
	Normal - 6 semanas	1,22	0,91	1	>0,999	-1,83	4,27
	3 semanas - 6 semanas	-1,84	0,96	1	>0,999	-5,09	1,41
CTPD	Normal - 3 semanas	3,66	0,75	1	<0,001	1,15	6,18
	Normal - 6 semanas	1,82	0,70	1	0,612	-0,54	4,19
	3 semanas - 6 semanas	-1,84	0,75	1	0,912	-4,35	0,68
Pré-op	Autoenxerto - CTMOi	1,81	0,84	1	>0,999	-1,04	4,65
	Autoenxerto - CTMOd	1,94	0,88	1	>0,999	-1,02	4,90
	Autoenxerto - CTPD	0,25	0,78	1	>0,999	-2,37	2,87
	CTMOi - CTMOd	0,13	0,88	1	>0,999	-2,82	3,09
	CTMOi - CTPD	-1,56	0,78	1	>0,999	-4,18	1,06
	CTMOd - CTPD	-1,69	0,82	1	>0,999	-4,44	1,05
3 semanas	Autoenxerto - CTMOi	-0,62	0,84	1	>0,999	-3,46	2,22
	Autoenxerto - CTMOd	-0,47	0,88	1	>0,999	-3,42	2,49
	Autoenxerto - CTPD	-1,56	0,78	1	>0,999	-4,18	1,06
	CTMOi - CTMOd	0,15	0,88	1	>0,999	-2,81	3,11
	CTMOi - CTPD	-0,94	0,78	1	>0,999	-3,56	1,68
	CTMOd - CTPD	-1,09	0,82	1	>0,999	-3,84	1,65
6 semanas	Autoenxerto - CTMOi	-1,06	0,84	1	>0,999	-3,90	1,79
	Autoenxerto - CTMOd	-1,94	0,88	1	>0,999	-4,90	1,01
	Autoenxerto - CTPD	-3,04	0,78	1	0,006	-5,66	-0,42
	CTMOi - CTMOd	-0,89	0,88	1	>0,999	-3,84	2,07

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
	CTMOi - CTPD	-1,98	0,78	1	0,724	-4,60	0,64
	CTMOd - CTPD	-1,09	0,82	1	>0,999	-3,84	1,65

Comparações múltiplas de Bonferroni

Tabela 5. Descrição da densidade axonal distal (axônios/ μm^2) e diâmetro axonal (μm) segundo grupos e momentos de avaliação.

Momento	Grupo				p
	Autoenxerto (N = 7)	CTMOi (N = 7)	CTMOd (N = 6)	CTPD (N = 10)	
Distal (densidade)					0,004
média \pm DP	0,021 \pm 0,003	0,015 \pm 0,002	0,017 \pm 0,003	0,014 \pm 0,004	
mediana (mín.; máx.)	0,022 (0,015; 0,023)	0,015 (0,013; 0,019)	0,018 (0,014; 0,02)	0,014 (0,006; 0,02)	
Diâmetro axonal (micrometros)					<0,001
média \pm DP	2,13 \pm 0,07	3,15 \pm 0,32	3,5 \pm 0,16	3,04 \pm 0,49	
mediana (mín.; máx.)	2,15 (2,04; 2,21)	3,11 (2,78; 3,58)	3,48 (3,3; 3,72)	3,01 (2,34; 3,92)	

Teste Kruskal Wallis

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal SK, Gupta AK, Modi M, Gupta R, Marwaha N. Safety profile of bone marrow stem cells in the rehabilitation of patients with posttraumatic facial nerve paralysis-a novel modality (phase one trial). *J Neurol Surg B Skull Base*. 2012;73(4):245-52.
- Aghajani F, Hoosshmand T, Khanmohammadi M, Khanjani S, Edalatkhah H, Zarnani AH, Kazemnejad S. Comparative immunophenotypic characteristics, proliferative features, and osteogenic differentiation of stem cells isolated from human permanent and deciduous teeth with bone marrow. *Mol Biotechnol*. 2016 Jun;58(6):415-27.
- Almeida FM, Marques SA, Ramalho BD, Rodrigues RF, Cadilhe DF, Furtado DR, Kerkis I, Pereira LV, Rehen SK e Martinez AM. Human dental pulp cells: a new source of cell therapy in a mouse model of compressive spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2011;28:1939.
- Ao Q, Fung CK, Tsui Ay, Cai S, Zuo HC, Chan YS, Shum DK. The regeneration of transected sciatic nerves of adult rats using chitosan nerve conduits seeded with bone marrow stromal cell-derived Schwann cells. *Biomaterials*. 2011;32:787-96.
- Arslantunali D, Dursun T, Yucel D, Hasirci N, Hasirci V. Peripheral nerve conduits: technology update. *Medical Devices: Evidence and Research*. 2014;7:405-24.
- Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats – similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1998; 3908-3913.
- Ballance C. An address on the results obtained in some experiments in which the facial and recurrent laryngeal nerves were anastomosed with other nerves. *British Med J*. 1924;2:349-54.
- Barcelos AC, Rodrigues MD, Silva CR, Padovani. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. *Microsurgery*. 2003;23:66- 71.
- Battiston B, Geuna S, Ferrero M, Tos P. Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurg*. 2005;25:258-67.
- Bento RF, Miniti A, Ruocco JR. Traumatic peripheral facial palsy. In: Portmann M. *Facial Nerve*. Paris, 1985. p.299-303.
- Bento RF, Miniti A. Anastomosis of the intratemporal facial nerve using fibrin tissue adhesive. *ENT Journal*. 1993;72(10):663-72.
- Bento RF, Miniti A. Comparison between fibrin tissue adhesive, epineural suture and natural union in the intratemporal facial nerve of cats. *Acta Otolaryngol*. 1989;465 Supplement 1:1-36.

- Bento RF, Salomone R, Brito Neto R, Tsuji RK, Hausen M. Partial Lesions of the Intratemporal segment of the facial nerve. Graft or Partial Reconstruction? *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2008;117(9):665-9.
- Bento RF, Salomone R, Nascimento SB, Ferreira RJR, da Silva CF, Costa HJZR. Mandibular branch of the facial nerve in wistar rats: new experimental model to assess facial nerve regeneration. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2014;18:277-82.
- Bento RF. Contribuição para o estudo da anastomose do nervo facial. Comparação entre o adesivo tecidual fibrínico e a sutura epineural. Estudo em gatos. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1988.
- Borin A, Toledo RN, Faria SD, Testa JR, Cruz OL. Behavioral and histologic experimental model of facial nerve regeneration in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006;72:775-84.
- Bozkurt A, Lassner F, O'Dey. The role of microstructured and interconnected pore channels in a collagen-based nerve guided on axonal regeneration in peripheral nerves. *Biomaterials*. 2012;33(5):1363-75.
- Brunelli GA, Vigasio A, Brunelli GR. Different conduits in peripheral nerve surgery. *Microsurg*. 1994;15:176-8.
- Bunge MB. Transplantation of purified populations of Schwann cells into lesioned adult rat spinal cord. *J Neurol*. 1994;242:36-9.
- Caddick J, Kingham PJ, Gardiner NJ, Wiberg M, Terenghi G. Phenotypic and functional characteristics of mesenchymal stem cells differentiated along Schwann cell lineage. *Glia*. 2006;54:840-9.
- Cai S, Tsui YP, Tam KW, Shea GKH, Chang RSK, Ao Q, Shum DKY, Chan YS. Directed differentiation of human bone marrow stromal cells to fate-committed Schwann cells. *Stem Cells Reports*. 2017;9:1097-108.
- Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):229-30.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9:641-50.
- Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009;217:318-24.
- Carriel V, Alaminos M, Garzón I, Campos A, Cornellisen M. Tissue engineering of the peripheral nervous system. *Exp Rev Neurother*. 2014;14(3):301-18.
- Cawthorne T. Idiopathic facial palsy. *Arch Otolaryngol*. 1965;4:107.
- Chadipiralla K, Yochim JM, Bahuleyan B, Huang CY, Garcia-Godoy F, et al. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Cell Tissue Res*. 2010;340:323.
- Chen S, Velardez MO, Warot X, Yu ZX, Miller SJ, Cros D, Corfas G. Neuregulin 1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function. *J Neurosci*.

2006a;26:3079–86.

Chen X, Wang XD, Chen G, Lin WW, Yao J, Gu XS. Study of in vivo differentiation of rat bone marrow stromal cells into Schwann cell-Like cells. *Microsurgery*. 2006b;26:111-5.

Chhabra A, Ahlawat S, Belzberg A, Andreseik G. Peripheral nerve injury grading simplified on MR neurography: as referenced to Seddon and Sunderland classifications. *Indian J Radiol Imaging*. 2014 Jul-Sep;24(3):217-24

Costa HJZR, Bento RF, Salomone R, Azzi-Nogueira D, Zanatta DB, Costa MP, Silva CF, Strauss BE, Haddad LA. Mesenchymal bone marrow stem cells within polyglycolic acid tube observed in vivo after six weeks enhance facial nerve regeneration. *Brain Res*. 2013 May;13;1510:10-21.

Costa HJZR, da Silva CF, Korn GP, Lazarini PR. Posttraumatic facial nerve regeneration in rabbits. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2006;72(6):786-93.

Costa HJZR, Salomone S, Silva CF, Costa MP, Ramos MBLR, Bento RF. Quantitative histological analysis of the mandibular branch of the facial nerve in rats. *Acta Cirurgica Bras*. 2012 (nov); 11.

Costa MP, Cunha AS, Silva CF, Barros Filho TEP, Costa HJZR, Ferreira MC. Polyglycolic acid tube associated with GM1 in regeneration of peripheral nerves. *Acta Ortopédica Brasileira* 2009; 17(5): 286-290.

Costa MP. Emprego do tubo de ácido poliglicólico como substituto de enxerto de nervo: estudo experimental em ratos.[Tese de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;1998.

Costa, HJZR. Estudo experimental sobre a regeneração pós-traumática do nervo facial em coelhos. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2003.

Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, Garcia-Gomez I, Cuevas B, Gonzalez- Corrochano R, Diaz-Gonzalez D, Reimers D. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res*. 2002;24:634-8.

Da-Cruz, Dayane Bernardino (2016) Expressão de conexinas em células-tronco da polpa dentária. Dissertação de mestrado.

Dai LG, Huang GS, Hsu SH. Sciatic nerve regeneration by cocultured schwann cells and stem cells on microporous nerve conduits. *Cell Transplant*. 2013;22(11):2029-39.

Daly W, Yao L, Zeugolis D, Windebank A, Pandit A. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *J R Soc Interface*. 2012;9:202-21.

Darrouzet V, Duclos JY, Liguoro D, Truilhe Y, Bonfils C, Bebear JP. Management of facial paralysis resulting from temporal bone fractures: our experience in 115 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001 Jul;125(1):77-84.

- Dezawa M, Ishikawa H, Hoshino M, Itokazu Y, Nabeshima Y. Potential of bone marrow stromal cells in applications for neuro-degenerative, neuro- traumatic and muscle degenerative diseases. *Curr Neuropharmacol*. 2005 Oct;3(4):257-66.
- Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N, Yamada H, Sawada H, Ishikawa H, Mimura T, Kitada M, Suzuki Y, Ide C. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*. 2004;12:1701-10.
- Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur. J. Neurosci*. 2001;14:1771-6.
- Dezawa M. Central and peripheral nerve regeneration by transplantation of Schwann cells and transdifferentiated bone marrow stromal cells. *Anatomical Science International*. 2002;77:12-25.
- Diamond C. Anatomy and physiology. In: *The facial nerve*. USA, Hardcover.1979.p3-21.
- Didilescu AC, Rusu MC, Nini G. Dental pulp as a stem cell reservoir. *Rom J Morphol Embryol*. 2013;54(3):473-8.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
- Dong M, Yi T. Stem Cell and Peripheral Nerve Injury and Repair. *Facial Plastic Surgery*. 2010;26(5):421-7.
- Doolabh VB, Hertl MC, Mackinnon SE. The role of conduits in nerve repair: a review. *Rev. Neurosci*. 1996;7:47-84.
- Ducker TB, Hayes GJ. Experimental improvement as in the use of silastic cuff for peripheral nerve repair. *J. Neurosurg*. 1968;28(6):582-7.
- Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:4080-5.
- Esslen, E. Eletromyography and eletroneurography. In :Fisch U. *Facial nerve surgery*. Birmingh: Aesculapius Publishing;1977. P.93-100.
- Fields RD, Beau JML, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Progress in Neurobiology*. 1989;33:87-134.
- Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD, Sanchez-Torrijos J, Payá R, Mirabet V, Carbonell-Uberos F, Llop M, Montero JA, Sepúlveda P. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells*. 2007;26:638-45.

- Ghoreishian M, Rezaei M, Beni BH, Javanmard SH, Attar BM et al. Facial nerve repair with gore-tex tube and adipose-derived stem cells: an animal study in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71:577-87.
- Gnecchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol. Biol.* 2009;482:281-94.
- Gomes JA, Geraldles Monteiro B, Melo GB, Smith RL, Cavenaghi Pereira da Silva M, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature DP stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:1408.
- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human DP stem cells. *J Dent Res.* 2002;81:531-5.
- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:13625-30.
- Grosheva M, Guntinas-Lichius O, Angelova SK, Kuerten S, Alvanou A, Streppel M, Skouras E, Sinis N, Pavlov S, Angelov DN. Local stabilization of microtubule assembly improves recovery of facial nerve function after repair. *Exp Neurol.* 2008b;209:131-44.
- Guntinas-Lichius O, Hundeshagen G, Paling T, Angelov DN. Impact of different types of facial nerve reconstruction on the recovery of motor function: an experimental study in adult rats. *Neurosurgery.* 2007;61:1276- 83.
- Ham A, Cormack D. *Histologia.* Guanabara Koogan; 1983. p 453-507.
- Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurotaphy. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(1):129-37.
- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone.* 1992;13:69-80.
- Hentz VR, Rosen JM, Xiao SJ, McGill KC, Abraham G. A comparison of suture and tubulization nerve repair technique in a primate. *J Hand Surg.* 1991;16:251-61.
- Hess A, Rosner S. The satellite cell bud and myoblast in denervated mammalian muscle fibers. *Am J Anat.* 1970;129(1):21-39.
- Hirasawa Y, Marmor L. The protective effect of irradiation combined with sheathing methods on experimental nerve heterografts: Silastic, autogenous veins and heterogenous arteries. *J Neurosurg.* 1967;27:401- 14.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.
- Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of DP

- stem cells from supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med.*2008;37:571-4.
- Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.*2009;88:792-806.
- Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S, Okubo Y, Fujimura K, Bessho K. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016 Jan;45(1):124-31.
- Jackson CG, von Doersten PG. The facial nerve. Current trends in diagnosis, treatment and rehabilitation. *Med Clin North Am.* 1999;83 (1):179.
- James DG. All that palsies is not Bell's. *J R Soc Med.* 1996;89(4):184.
- Jiang L, Jones S, Jia X. Stem cell transplantation for peripheral nerve regeneration:current options and opportunities. *Int J Mol Sci.* 2017;18(94):1-17.
- Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng.* 2007;13:767-73.
- Johnson EO, Charchanti A, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury.* 2005;36(4):S24-9.
- Jowett N, Hadlock TA. A contemporary approach to facial reanimations. *JAMA Facial Plast Surg.* 2015;17(4):293-300.
- Keilhoff G, Fansa H. Mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration - A real hope or just an empty promise? *Exp Neurol.* 2011;232:110-3.
- Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, Martins DS, Zucconi E, et al. Early transplantation of human immature DP stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRDM) dogs: Local or systemic? *J Transl Med.*2008;6:35.
- Kerkis I, Caplan AI. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng.* 2012;18(2):129-38.
- Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GG, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. Isolation and characterization of a population of immature DP stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.*2006;184:105-16.
- Kerkis I, Lobo SE, and Kerkis A. Dental pulp stem cells and perspectives of future application in cell therapy. In: Deb, K.D., and Totel, S.M., eds. *Stem Cells. Basic and Applications.* New Delhi: Tata McGraw Hill, 2009, pp. 426–438.
- Kim S, Shin SJ, Song Y, Kim E. *In vivo experiments with dental pulp stem cells for pulp-dentin complex regeneration.* *Mediators of Inflamm.* 2015;2015:409347.

- Kirkwood BR and Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2006. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA. p.502.
- Kline DG, Nulsen FE. Acute injuries of peripheral nerve. In: Youmans Jr. *Neurological surgery*. 2° ed. Philadelphia, WB Saunders;1982. P2363-2429.
- Konofaos P, Ver Halen JP. Nerve repair by means of tubulization: past, present and future. *J Reconstr Microsurg*. 2013;29(3):146-64.
- Körte W and Bernhardt M. Ein fall von nervenpfropfung: des nervus facialis auf den nervus hypoglossus. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 1903;29(17):293-5.
- Kreutzberg GW. Reaction of the neuronal cell body to axonal damage. In: Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK. *The axon*. Oxford University Press; 1995. p 355-74.
- Ladak A, Olson J, Tredget EE, Gordon T. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. *Exp Neurol*. 2011;228(2):242-52.
- Lazarini PR, Vianna MF, Alcantara MPA, Scalia RA, Caiaffa-Filho HH. Herpes simplex virus in the saliva of peripheral Bell`s palsy patients. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2006;72(1):7-11.
- Le Beau JM, Powell HC, Ellisman MH. Ultrastructural and morphometric analysis of long-ter peripheral nerve regeneration through silicone tubes. *J Neurocytol*. 1988;17:161-72.
- Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*.2003;5:485.
- Lin MY, Manzano G, Gupta R. Nerve allografts and conduits in peripheral nerve repair. *Hand Clinics*. 2013;29(3):331-48.
- Lin W, Chen X, Wang X, Liu J, Gu X. Adult rat bone marrow stromal cells differentiate into Schwann cell-like cells *in vitro*. *In vitro Cell.Dev.Biol. Animal*. 2008a;44:31-40.
- Liu J, Yu K, Sun Y, Jiang B et al. Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 2014.
- Liu L, Yang S, Han D, Huang D, Yang W. Primary tumours of the facial nerve: diagnostic and surgical treatment experience in Chinese PLA General Hospital. *Acta Otolaryngol*. 2007;127:993-9.
- Lizier NF, Kerkis A, Cicera MG, Gomes CM, Hebling J, Oliveira CF, Caplan AI, Kerkis I. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *Plos One*.2012;7(6):1-12.
- Lundborg G, Longo FM, Varon S. Nerve regeneration model and trophic factors in vitro. *Brain Res*. 1982;232:157-161.
- Lundborg G, Rosén B, Dahlin L, Homberg J, Rosén I. Tubular repair of the median or

- ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow up. *J Hand Surg.* 2004;29(2):100-7.
- Mackinnon SE, Dellon AL. Anatomy and physiology of the peripheral nerve. In: *Surgery of the peripheral nerve.* New York. Thieme.1988;p1-33.
- Mackinnon SE, Dellon AL. Clinical nerve reconstruction with bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Plast Reconst Surg.* 1990;85:419-424.
- Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconst Surg.* 2001;107(6):1419-29.
- Martini R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *Neurocytol.* 1994;23:1-28.
- Mattox DE, Felix H. Surgical anatomy of the rat facial nerve. *Am J Otol.* 1987;8(1):43-7.
- May M, Schaitkin BM. *The facial nerve.* 2nd ed New York: Thieme; 2000.
- May M, Shaumbagh GE. Facial nerve paralysis. In: Papparella MM, Shumrick DA, Gluckman JL, Meyerhoff WL. *Otolaryngology.* Saunders. 1991. P 1097-1136.
- May M. Microanatomy and pathophysiology of the facial nerve. In: May M. *The facial nerve.* Thieme. 1986. P 63-74.
- Mccullagh P and Nelder JA. *Generalized linear models.* 1989. 2nd ed. Chapman and Hall: New York, USA. p.511.
- McGovern FH. The return of function after damage to the facial nerve. *Eye Ear Nose Throat Mon.* 1970;49:451-4.
- Millesi H. Facial nerve suture. In: Fisch U- *Facial nerve surgery.* Birmingham:Aesculapius; 1977. p. 209-15.
- Millesi H. Techniques for nerve grafting. *Hand Clin.* 2000;16(1):73-91, viii.
- Miura M, Gronthos S, Zao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(10):5807-12.
- Miyamoto H. Introduction of axon packing density for histological quantitative assessment of peripheral nerve regeneration. *Hiroshima J Anesthesia.* 1985;21(1):3-17.
- Monkhouse WS. The anatomy of the facial nerve. *Ear Nose Throat J.* 1990;69(10):677.
- Muller H, Dombert T, Terzis J, Arnol H. Axonal growth on laminin containing substrats. *Microsurg.*1993;14:33.
- Mushcler GF, Midura RJ. Connectivetissue progenitors: pratical concept for a clinical application. *Clin Orthp Relat Res.* 2002;395:66-80.
- Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K e Ueda M. Stem cell proliferation

- pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by geneexpression profile from promising dental pulp. *J Endod.*2009;35:1536.
- Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, And Wasserman W. *Applied Linear Statistical Models.* 1996;4. ed. Illinois: Richard D. Irwing. 1408p.
- Nishiura JB, Nilsson B, Kanje M, Dahlin LB. Addition of cultured Schwann cells to tendon autografts and freeze-thawed muscle grafts improves peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng.* 2004;10:157-64.
- Nissl F. Uber die veränderung der ganglienzellen am facialiskern des kaminchens nach ausreissung des nerven. *Allg Z Psychiatr.* 1892;48:197- 8.
- Ontell M. Muscle satellite cells: calidated technique for light microscopic identification and a quantitative study of changes in their population following degeneration. *Anat Rec.* 1974;178(2):211-27.
- Pham HN, Padilla JA, Nguyen KD, Rosen JM. Comparison of nerve repair techniques: suture vs. avitene-polyglycoic acid tube. *J Reconstr Microsurg.* 1991;7:31-6.
- Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from DP. *Transplantation.* 2005;80:836-42.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Mar-shak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;247:71-4.
- Quigley AF, Bulluss KJ, Kyratzis ILB. Engineering a multimodal nerve conduit for repair of injured peripheral nerve. *J Neural Eng.* 2013;10(1).
- Ray WZ and Mackinnon SE. Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers and end-to-side neurography. *Exp Neurol.* 2010;223(1):77-85.
- Rodriguez FJ, Verdu E, Ceballos D, Navarro X. Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol.* 2000; 161:571-84.
- Rosen JM, Hentz VR, Kaplan EN. Fascicullar tubulization: a cellular approach to peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg* 1983; 11: 397.
- Rosen JM, Pham HN, Abraham G, Harold L, Hentz VR. Artificial nerve graft compared to autograft in a rat model. *J Rehabil Res Dev.* 1989;26(1):1-14.
- Rosenwasser RH, Liebman E, Jimenez DF, Buchheit WA, Andrews DW. Facial reanimation after facial nerve injury. *Neurosurgery.* 1991;29(4)568-74.
- Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA ,et al. SHED differentiate into

- functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res*. 2010;89:791.
- Salomone R, Bento RF, Costa HJZR, Azzi-Nogueira D, Ovando PC, Da-Silva CS, Zanatta DB, Strauss BE, Haddad LA. Bone marrow stem cells in facial nerve regeneration from isolated stumps. *Muscle Nerve*. 2013;48:423-9.
- Salomone R. Paralisia facial periférica. In: Bento RF, Voegels RL, Sennes LU, Pinna FR, Jotz GP, editores. *Otorrinolaringologia baseada em sinais e sintomas*. São Paulo: Fundação Otorrinolaringologia; 2011:55-67.
- Salomone RHJ, Rodrigues JR, Reis e Silva SM, Orando PC, Bento RF. Assessment of a neurophysiological model of the mandibular branch of the facial nerve in rats by electromyography. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2012;121(3):179-84.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000;164:247056.
- Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K et al. PLGA artificial nerve conduits with dental pulp cells promote facial nerve regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011;Nov5(10):823-30.
- Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K, Okano T, Ogiuchi H. Tubulation with dental pulp cells promotes facial nerve regeneration in rats. *Tissue Eng*. 2008;14(7):1141-7.
- Sasaki R, Matusmine H, Watanabe Y, Takeuchi Y, Yamato M, Okano T, Miyata M, Ando T. Electrophysiological and functional evaluations of regenerated facial nerve defects with tube containing dental pulp cells in rats. *Plast Reconstr Surg*. 2014;134:970-8.
- Satar B, Karahatay S, Kurt B, Ural AU, Safali M, Avcu F, Oztas E, Kucuktag Z. Repair of Transected Facial Nerve With Mesenchymal Stromal Cells: Histopathologic Evidence of Superior Outcome. *Laryngoscope*. 2009;119:2221-5.
- Satar B, Karahatay S, Kurt B, Ural AU, Safali M, Avcu F, Oztas E, Kucuktag Z. Repair of Transected Facial Nerve With Mesenchymal Stromal Cells: Histopathologic Evidence of Superior Outcome. *Laryngoscope*. 2009;119:2221-5.
- Schmalbruch H. Fiber composition of the sciatic rat nerve. *Anat Rec*. 1986; 215:71-81.
- Seckel BR, Chiu TH, Nyilas E, Sidman RL. Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides: regulation by the organ. *Plast Reconstr. Surg*. 1984;74:173-81.
- Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain*. 1943; 66:237-88
- Sell S. Stem cell handbook. New York: Humana Press; 2003. P143.

- Shekar R, Ranganathan K. Phenotypic and growth characterization of human mesenchymal stem cells cultured from permanent and deciduous teeth. *Indian J Dent Res.* 2012. Nov-Dec;23(6):838-9. doi: 10.4103/0970-9290.111281.
- Shi, S., Robey, P.G., and Gronthos, S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone.* 2001;29:532-9.
- Singh AK, Bathla G, Altmeyer W, Tiwari R, Valencia MP, Bazan C, Tantiwongkosi B. Imaging spectrum of facial nerve lesions. *Curr Probl Diagn Radiol.* 2015;44(1):60-75.
- Spector JG, Lee P, Derby A. Rabbit facial nerve regeneration in autologous nerve grafts after antecedent injury. *Laryngoscope.* 2000;110:660-7.
- Stevens A, Zuliani T, and Olejnik C. Human DP stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev.* 2008;17:1175-84.
- Sulaiman OA, Gordon T. Effects of short- and long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination, and size. *Glia.* 2000;32:234-46.
- Sunderland S. Cranial nerve injury. Structural and pathophysiological considerations and a classification of nerve injuries. In: Samii M, Janetta PJ. *The cranial nerves.* Springer-Verlag; 1981. p 16-23.
- Sunderland S. *Nerve and nerve injuries.* 2a ed. London: Churchill-Livingston; 1978.
- Sweet CR, Castilho AM, Sanchez TG, Bento RF, Neto RVB. O Papel do acesso via fossa média no tratamento da paralisia facial traumática. *Rev Bras Otorrinol.* 1994; 54:1-10.
- Szal G, Miller T. Surgical repair of facial nerve branches. An analysis of different sheathing and suturing techniques. *Arch Otolaryngol.* 1975;101:160-5.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126:663-76.
- Terzis J, Faibisoff B, Williams HB. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg.* 1975;56:166-70.
- Terzis JK, Konofaos P. Nerve transfers in facial palsy. *Facial Plast Surg.* 2008;24(2):177-93.
- Titmus MJ, Faber DS. Axotomy-induced alterations in the electrophysiological characteristics of neurons. *Prog Neurobiol.* 1990; 35:1-51.
- Toulqoat F, Sarrazin JL, Benoudiba F, Pereon Y, Auffray-Calvier E, Daumas-Duport B, Lintia-Gaultier A, Desal HA. Facial nerve: from anatomy to pathology. *Diagn Interv Imaging.* 2013 Oct;94(10):1033-42.
- Turner JW. A facial palsy in head injuries. *Lancet.* 1944; 246:756-7.

- Wang X, Luo E, Li Y, Hu J. Schwann-like mesenchymal stem cells within vein graft facilitate facial nerve regeneration and remyelination. *Brain Resarch*. 2011;1383:71-80.
- Weber RA, Breindenbach WC, Brown RE, Jabaley ME, Mass DP. A randomized prospective study of polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Oct;106(5):1036-44.
- Wong B, Mattox D. Experimental nerve regeneration. *Otolaryngol Clin North Am*. 1991;24:739-52.
- Woodburg D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci*. 2000;61:364- 370.
- Yamamoto A, Sakai K, Matsubara K, Kano F, Ueda Minoru. Multifaceted neuro-regenerative activities of human dental pulp stem cells for functional recovery after spinal cord injury. *Neurosc Res*. 2014;78:16-20.
- Yamamoto A, Sakai K, Matsubara K, Kano F, Ueda Minoru. Multifaceted neuro-regenerative activities of human dental pulp stem cells for functional recovery after spinal cord injury. *Neurosc Res*. 2014;78:16-20.
- Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem CellsRes Ther*.2010;1:5.
- Yanagihara N. Transmastoid decompression of the facial nerve in temporal bone fracture. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1982;90:616–21.
- Yu J, Wang U, Deng Z, Tang L, Li Y, Shi J, Jin Y et al. Odontogenic capacity: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell*.2007;99(8):465-74.
- Zhang H, Wei YT, Tsang KS, Sun CR, Li J, Huang H, Cui FZ, An YH. Implantation of neural stem cells embedded in hyaluronic acid and collagen composite conduit promotes regeneration in a rabbit facial nerve injury model. *J Transl Med*. 2008;5,6:67.
- Zheng Y, Liu Y, Zhang CM, Zhang HY, Li WH, et al. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. *J Dent Res*.2009;88:249.