



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO NACIONAL DE
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.
ISMAEL COSÍO VILLEGAS**

**“EFECTO DEL FACTOR NEUROTROFICO
DERIVADO DEL CEREBRO SOBRE LA
REGENERACIÓN DEL NERVIIO FACIAL
POSTNEURORRAFIA. ESTUDIO
EXPERIMENTAL”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA
EN:
OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y
CUELLO**

PRESENTA:

DRA. COSETTE DANIELA BRULÉ ALDANA

TUTORES :

**DRA. LISETTE CRISTERNA SÁNCHEZ
M EN C J. RAÚL OLMOS ZUÑIGA
M EN C. MARIANA SILVA MARTÍNEZ**



MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO

SEPTIEMBRE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Introducción	1
Trayecto y funciones del nervio facial	1
Morfología de los nervios periféricos	3
Fascículos	3
Mielina	5
Cubiertas de los nervios periféricos	5
Irrigación nerviosa	6
Lesiones de los nervios periféricos	6
Fisiopatología de la lesión nerviosa y degeneración Walleriana	7
Regeneración	10
Factores neurotróficos en la regeneración de nervios periféricos	11
Lesiones del nervio facial	13
Estrategias quirúrgicas para el manejo del nervio facial	14
Manejo quirúrgico de la lesión aguda del nervio facial	14
<i>Injerto de nervio facial cruzado</i>	15
<i>Transferencias nerviosas y transferencias nerviosas parciales:</i>	16
Justificación	17
Pregunta de investigación	17
Hipótesis	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos	18
Material y Métodos	19
Animales de experimentación	19
Criterios de inclusión y exclusión	20
Grupos de estudio	20
Procedimientos de estudio	21
Anestesia	21
Técnica quirúrgica	21
Tratamiento	22
Evaluación clínica	23
Evaluación macroscópica.....	23

Evaluación histológica	23
Inmunohistoquímica	24
Análisis estadístico.....	25
Resultados.....	25
Discusión	34
Conclusión	38
Referencias	39

Resumen

Efecto del factor neurotrófico derivado del cerebro sobre la regeneración del nervio facial post-neurorrafia. Estudio experimental.

La lesión iatrogénica del nervio facial durante la cirugía otológica provoca parálisis facial (PF). Para la reparación nerviosa se ha utilizado la neurorrafia (NF), colocación de injertos autólogos o sintéticos combinado con la aplicación de fármacos que favorezcan la regeneración, pero no han sido 100% exitosos. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) durante la regeneración nerviosa modula la expresión de la proteína básica de mielina (MBP) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que promueven la generación de una MEC que actúa como andamio para la regeneración y mielinización axonal. **Objetivo.** Evaluar los cambios clínicos, macroscópicos e histológicos y en la expresión de la MBP y GFAP post-NF del facial combinada con la aplicación de BDNF o colocación de un injerto de nervio sural (INS) en cobayos. **Metodología.** Treinta cobayos con sección y NF izquierda se trataron de la siguiente manera: **Grupo I (n=10):** NF sin tratamiento. **Grupo II (n=10):** Colocación de INS sin tratamiento. **Grupo III (n=10):** NF tratada con BDNF. El estudio duró 12 semanas y se evaluó el cierre palpebral y movimientos de los bigotes. Macroscópicamente la presencia de infección, necrosis, adherencias y fibrosis de la anastomosis. Histológicamente la inflamación, fibrosis y regeneración axonal. Inmunohistoquímicamente se determinó la expresión MBP y GFAP en la cicatriz neural. **Resultados.** El grupo III mostró mejor evolución clínica en menor tiempo ($p < 0.05$, Chi cuadrada, Friedman), así como macroscópica y microscópica ($p < 0.05$ Kruskal Wallis). Los 3 grupos mostraron expresión similar de MBP y GFAP. **Conclusión.** La NF del facial en cobayos combinada con la aplicación de BDNF disminuye el grado de PF en menor tiempo y los cambios macroscópicos y microscópicos en comparación con la anastomosis sin tratamiento y la colocación de un INS, pero no produce cambios en la producción de MBP y GFAP.

Palabras clave: Parálisis facial, neurorrafia, injertos, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), proteína básica de mielina (MBP), proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

Introducción

El nervio facial (NF) es el séptimo nervio craneal y es considerado un nervio mixto, debido a que está formado por fibras nerviosas motoras, sensitivas y parasimpáticas, que proporcionan inervación a muchas áreas de la región de la cabeza y el cuello (1).

Trayecto y funciones del nervio facial

EL NF es parte del sistema nervioso periférico y se relaciona con el encéfalo por sus características de inervación aferentes de tipo sensitivo y sensorial; así como por sus fibras eferentes de tipo motoras y parasimpáticas. Las fibras nerviosas eferentes transmiten las señales desde el SNC a los músculos y otros tejidos periféricos. Las fibras nerviosas se clasifican según su tamaño y su velocidad de conducción, la fibra motora (fibra $A\alpha$) es la más grande y las más rápida en conducción teniendo un diámetro promedio de 12-20 μm y una velocidad de 72-120 ms. (2). Cabe mencionar que el 58% de las fibras de este nervio son motoras, 24% parasimpáticas y 18% de tipo sensorial (3).

El recorrido del NF se divide en tres segmentos: intracraneal, intratemporal y extratemporal, la cual se extiende en la región laterofaringea desde el foramen estilomastoideo hasta sus ramas terminales dentro de la parótida (4). El NF se origina del tronco encefálico a través de 3 núcleos diferentes: núcleo motor principal, núcleos parasimpáticos (núcleo salival superior y núcleo espinal) y el núcleo del tracto solitario, siendo el núcleo motor el más grande. Después de salir del tronco encefálico, el nervio facial puede dividirse en 5 segmentos intracraneales (cisternal, canalicular, laberíntico, timpánico y mastoideo). El segmento cisternal consta de la raíz motora y el nervio intermedio (nervio de Wrisberg), estas dos porciones se fusionan y se juntan con el nervio vestibulococlear a nivel del ángulo cerebelopontino para posteriormente ingresar al conducto auditivo interno. El segundo segmento es conocido como la porción meatal o canalicular, va desde el porus acusticus hasta el fundus del conducto auditivo interno y adquiere una

posición anterior al nervio vestibular y superior al nervio coclear; además en este segmento la cresta falciforme separa el nervio facial del nervio coclear y la barra de Bill lo separa del nervio vestibular superior. El tercer segmento es el laberíntico, pasa entre la cóclea y canal semicircular superior, este es el segmento más estrecho del nervio facial; sin embargo, en su porción distal se ensancha y forma el ganglio geniculado, del cual surgen el nervio petroso superficial mayor, que transportan fibras parasimpáticas a las glándulas lagrimales y de la mucosa nasal. El cuarto segmento es el llamado timpánico u horizontal, se dirige hacia atrás desde el ganglio geniculado y pasa superior a la ventana oval e inferior al canal semicircular lateral hasta la segunda rodilla antes de girar hacia abajo para convertirse en el segmento mastoideo; esta es la porción del facial más frecuentemente dehiscente (20%). La porción mastoidea o vertical quinto segmento) se dirige hacia abajo hasta el foramen estilomastoideo. Esta porción emite la rama motora del músculo del estapedio y el nervio de la cuerda del tímpano, que se fusiona con fibras del nervio lingual y da fibras especiales sensitivas a los 2/3 anteriores de la lengua. Finalmente, el nervio emerge del agujero estilomastoideo y se convierte en el segmento extracraneal, de aquí el nervio da la rama auricular posterior y otra rama que discurre hacia adelante a través de la glándula parótida y da origen a las ramas temporofacial y cervicofacial que inervan fibras motoras de músculos de la expresión facial, estas ramas darán origen a las 5 ramas terminales del nervio facial: temporal, cigomática, bucal, mandibular y cervical (1,5,6). Cabe señalar que la rama temporal se encuentra dentro del sistema aponeurótico muscular superficial (SMAS) al nivel del arco cigomático. La rama mandibular generalmente se encuentra profunda a la capa de la platisma y SMAS a lo largo del cuerpo de la mandíbula, de 1 a 2 cm de su borde inferior (7).

Características macroscópicas de los nervios periféricos

Los nervios son cordones o redes que unen al sistema nervioso central (SNC) con los distintos tejidos u órganos periféricos del organismo. Anatómicamente los nervios periféricos se caracterizan porque están constituidos en parejas y se dividen

en nervios cerebrospinales (que están formados por los 12 pares craneales) y los nervios simpáticos (31 pares de nervios raquídeos). Así mismo son estructuras de forma cilíndrica, de superficie externa lisa y regular, que generalmente son satélites y corren paralelos a los vasos sanguíneos extrínsecos interconectados por múltiples anastomosis entre unos y otros. La longitud y diámetro de estos nervios es variable y varían con la distancia a la que se encuentre del centro nervioso órgano diana; así como con la cantidad de fibras nerviosas y de tejido conjuntivo de sostén que contengan (2,8). La vascularización del NF y sus ramas se da por la arteria temporal superficial y la facial (9).

Morfología de los nervios periféricos

El NF en el tronco encefálico hasta su llegada al ganglio geniculado no tiene disposición fascicular, perineuro, ni epineuro y sus fibras se encuentran rodeadas por una vaina aracnoidea. En la porción distal del ganglio geniculado aparecen los uno o dos haces fasciculares y, a medida que el nervio va avanzando hacia la parte externa, los fascículos aumentan en número y disminuyen en tamaño.

El NF al igual que la mayoría de los nervios periféricos, de adentro hacia afuera está compuesto por un conjunto de fascículos que agrupan a la totalidad de los axones presentes en ese nervio. Dichos fascículos se encuentran unidos por una capa de tejido conectivo que los rodean en toda su extensión, la cual está constituida por tres estructuras: endoneuro, perineuro y epineuro (10).

Fascículos

Los fascículos están constituidos por neuronas, compuestas por axones, células de Schwann, endoneuro, perineuro y el epineuro.

La neurona es la célula del sistema nervioso (Figura 1), todas ellas contienen un soma, que es su centro metabólico. Del soma se desprende una prolongación llamada axón o cilindroeje, y varias ramas cortas llamadas dendritas, éstas últimas son ramificaciones a través de las cuales la neurona recibe los impulsos de otros nervios, así como recibe mensajes de otras neuronas, recogiendo los potenciales

de acción de los axones. los axones son la prolongación citoplasmática de las neuronas y contienen en su interior axoplasma que está limitado por una membrana denominada axolema y se encuentra rodeado por la célula de Schwann la cual se encarga de la producción de mielina para el axón. Este conjunto, axón y célula de Schwann, está envuelto por una membrana basal denominada neurolema y luego las cubiertas de los nervios periféricos (endoneuro, perineuro y el epineuro) (2,10,11). Cabe mencionar que el axón es la proyección distal primaria del soma de la neurona y transmite señales a las células de los tejidos efectores y a otras neuronas, el cual conduce los potenciales de acción que las estimulan. Por medio del axón una neurona entra en contacto con las dendritas de una o más neuronas colindantes en un punto de unión llamado sinapsis, donde los potenciales de acción del axón se transmiten a las dendritas de las otras neuronas, completando así una cadena de estímulos electrofisiológicos. Los axones miden entre 0,2 y 20 μm de diámetro y surgen de la neurona en una zona llamada como axónico, que es el punto donde se generan los potenciales de acción de las neuronas (2).

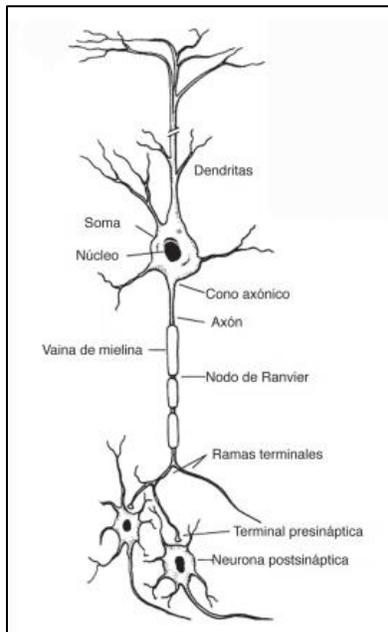


Figura 1. Esquema de una neurona periférica, (Modificado de Dodds 2014 (2))

Mielina

La mielina es una sustancia que envuelve y protege a los axones de las células nerviosas periféricas y cuya función principal es la de aumentar la velocidad de transmisión del impulso nervioso. Está compuesta de elementos lipídicos y proteicos, actúa como vaina aislante alrededor de los axones. Además, la mielina posee, los nodos de Ranvier que son interrupciones o brechas entre los segmentos de la vaina de mielina que permiten la propagación de los potenciales de acción (12).

Cubiertas de los nervios periféricos

El endoneuro, el perineuro y el epineuro son las cubiertas de los nervios periféricos. Entre estas estructuras, se pueden encontrar fibroblastos, mastocitos, macrófagos, fibras de colágeno agrupadas en haces, fibras elásticas y fibras de reticulina. Estas tres cubiertas de tejido conectivo están presentes a lo largo de toda la extensión del nervio y a medida que los nervios se van ramificando, este tejido se va adelgazando.

El endoneuro está formado sobre todo por una matriz de colágeno con fibroblastos, mastocitos y capilares y forma una vaina bilaminar que rodea los axones, las células de Schwann y la mielina de cada fibra nerviosa. Este posee una barrera hematoneural similar a la hematoencefálica, dicha barrera impide la difusión de las diferentes macromoléculas al interior del nervio, preservando la integridad de éste, sin embargo, ésta puede dañarse por infección, irradiación o trastornos metabólicos (2).

El perineuro es una capa delgada y densa de tejido conjuntivo que rodea los fascículos de un nervio, es muy resistente a la rotura y mantiene la presión interfascicular, lo que supone una barrera para la difusión perineural. Esta barrera limita la lesión de las fibras nerviosas al reducir la difusión del edema del epineuro que tiene lugar tras lesiones por estiramiento y compresión; este obstáculo también frena la difusión del líquido edematoso que se crea en el endoneuro tras la compresión de un nervio.

El epineuro es una vaina de soporte que abraza numerosos grupos de fascículos. También contiene una red bien desarrollada de vasos sanguíneos extrínsecos interconectados por múltiples anastomosis entre unos y otros, los cuales discurren paralelamente a los fascículos (Figura 2). El epineuro es el único sitio en el cual no hay ninguna barrera hematoneural (2).

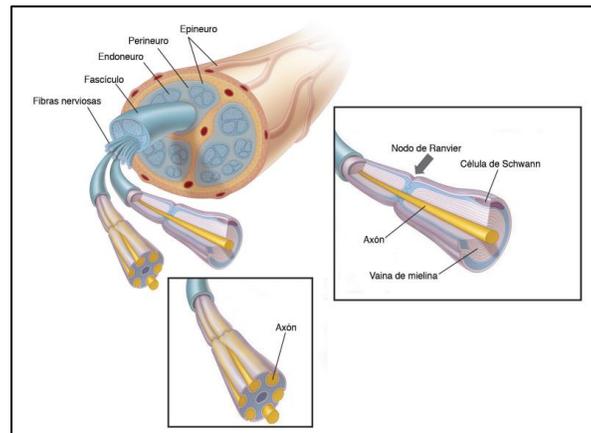


Figura 2. Cubierta de nervio periférico (Tomado de Dodds 2014 (2))

Irrigación nerviosa

En cuanto a su irrigación, los nervios periféricos tienen vasos sanguíneos intrínsecos y extrínsecos, con múltiples anastomosis entre unos y otros a lo largo del recorrido del nervio. El epineuro es el único sitio en el cual no hay ninguna barrera hematoneural. En el endoneuro existe una barrera hematoneural similar a la hematoencefálica, dicha barrera impide la difusión de las diferentes macromoléculas al interior del nervio, preservando la integridad de éste, sin embargo, ésta puede dañarse por infección, irradiación o trastornos metabólicos(2).

Lesiones de los nervios periféricos

De acuerdo con lo descrito por Seddon y Sunderland, el grado de lesión de los nervios periféricos se clasifica en cinco categorías: neuropraxia, axonotmesis y neurotmesis (la cual se subclasifica en 3); estas se basan en el grado de severidad de la lesión nerviosa y así, anticipando el tiempo de recuperación y pronóstico del paciente (2,13).

1. **Neuropraxia:** es un bloqueo inmediato y circunscrito de la conducción nerviosa, que se mantiene por encima y por debajo de la zona de lesión. Suelen ser reversibles y la continuidad del axón no está interrumpida, pero puede haber desmielinización e isquemia locales. mecanismos lesionales que la causan son: compresión, tracción y contusión.

2. **Axonotmesis:** supone la rotura del axón, sin destrucción de las células de Schwann, del perineuro o del epineuro. La zona del axón distal al punto de lesión degenera, dando cabida a la degeneración walleriana. Puede haber cierto grado de recuperación funcional, pues la regeneración de las fibras nerviosas se fundamenta en la integridad del tejido conjuntivo (endoneuro intacto). Los mecanismos lesionales que causan la axonotmesis son el aplastamiento y el estiramiento forzado. Según la revisión de Sunderland, esta clasificación puede subdividirse en tres subcategorías:
 - A) **Tipo 2:** Interrupción de los axones; endoneuro, perineuro y epineuro intactos. Razonable recuperación funcional.
 - B) **Tipo 3:** Interrupción de los axones y del endoneuro; perineuro y epineuro intactos. Recuperación incompleta debido a fibrosis intrafascicular
 - C) **Tipo 4:** Interrupción de los axones, el endoneuro y el perineuro; epineuro intacto. Recuperación insignificante debido a los axones desencaminados

Fisiopatología de la lesión nerviosa y degeneración Walleriana

Inmediatamente después de la lesión del nervio, hay una ruptura de la mielina con una degeneración retrógrada proximal característica del nervio facial llamada degeneración Walleriana (DW).

Posterior a un daño nervioso producido por una lesión traumática o secundaria a lesiones tumorales, los nervios periféricos responden inicialmente a la lesión con

una respuesta inflamatoria, que ocasiona un incremento en la permeabilidad y edema del epineuro, debido a que los vasos que contiene carecen de barrera hematoneural. Sin embargo, en caso de que la lesión dañe al endoneuro, se altera la barrera hematoneural, lo que lleva al aumento de la permeabilidad de los capilares del mismo. Mientras que cuando el daño es originado por isquemia y compresión solo se produce aumento de la presión en el endoneuro y cambios en la permeabilidad que ocasionan edema sin afectar al sistema vascular del perineuro. En estos casos, la presión hidrostática positiva en el interior del endoneuro reduce el flujo sanguíneo, disminuyendo el aporte de nutrientes y oxígeno a las neuronas y la tasa de eliminación de sus productos catabólicos, disminuyendo así la función del nervio (2). Es importante mencionar que ambos procesos producen degeneración Walleriana (DW) que favorece la regeneración nerviosa (14).

La DW es el proceso de degeneración rápida y progresiva que sufre la porción distal de un axón, cuando un nervio es seccionado, padece de alteraciones metabólicas o tóxicas, procesos inflamatorios o síndrome hereditarios. La DW es un proceso rápido y asincrónico que avanza de manera progresiva y que puede transcurrir de forma anterógrada y retrógrada, dependiendo del tipo de lesión. Esta inicia entre las 36 y 44 horas posterior al daño y entra en una fase de latencia, en la que primero se presenta la pérdida de la conexión de la terminal axonal con su órgano blanco y a partir de las 8 a 24 horas comienzan a formarse los llamados “beads” (distensiones localizadas del axolema). Posteriormente esta etapa es seguida por una fase de fragmentación o desintegración granular del citoesqueleto, en la que el citoesqueleto del axón se desorganiza por el desensamble de sus microtúbulos, neurofilamentos y otros de sus componentes, los cuales son degradados por proteasas moduladas por calcio (calpaínas) y otros mecanismos pertenecientes al sistema ubiquitin-proteasoma (UPS). Posteriormente ocurre una desintegración del axón, originando restos de mielina que luego células de la glía (células de Schwann) y macrófagos se encargan de remover (Figura 3) (12,15).

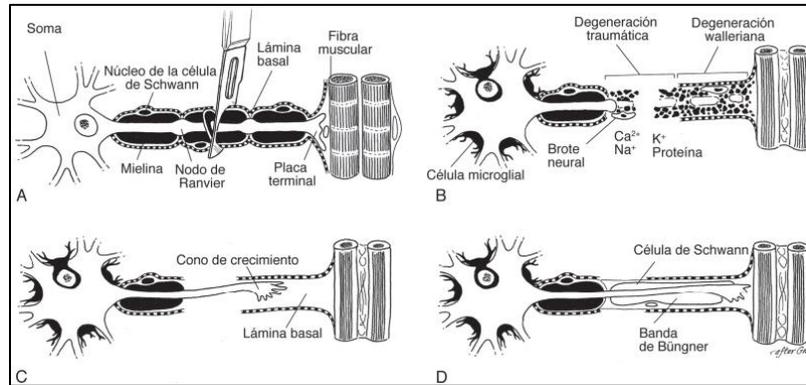


Figura 3. Lesión, degeneración y regeneración de los nervios (Tomado de Dodds 2014 (2))

También durante esta degeneración, se presentan cambios a nivel del soma neuronal y se le denomina reacción cromatolítica (dispersión de los gránulos basófilos de Nissl con eosinofilia relativa del soma), en la que el cuerpo celular se hincha, el núcleo se desplaza a una posición excéntrica y el retículo endoplasmático rugoso se fragmenta. La cromatolisis se acompaña de alteraciones metabólicas como es el aumento de ARN y proteínas, así como un cambio en la expresión génica, dando lugar a la síntesis de las proteínas necesarias para la regeneración de los axones e inhibiendo la liberación de neurotransmisores. Sin embargo, esta cromatolisis puede ser revertida cuando se presenta una regeneración exitosa del axón (Figura 4) (12).

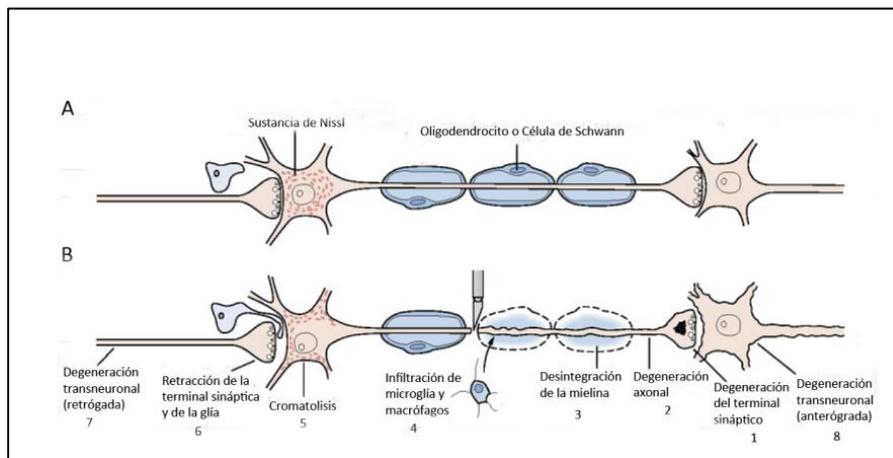


Figura 4. Proceso de degeneración Walleriana y sus efectos transneuronales (Tomado de Bobba, 2013 (12))

Los cambios mencionados pueden producir un efecto transináptico en las neuronas vecinas a la lesionada, provocando un proceso degenerativo que se propagará a lo largo del circuito neuronal tanto en dirección anterógrada como retrógrada, con cambios que no sólo tendrán repercusiones a nivel de las células axonales sino igual con células de la glía (12).

Regeneración

En las lesiones traumáticas, la regeneración se inicia con la elongación de los axones en la zona de la lesión, proliferación de capilares y de las células de Schwann, las cuales emigran desde ambos muñones proximal y distal del axón roto, hacia la zona de la pérdida de la continuidad y forman columnas denominadas bandas de Büngner (12) estas columnas crean un ambiente rico en factores tróficos que aseguran el crecimiento axonal guiado. Posteriormente en el muñón proximal se forma un cono de crecimiento, la cual es una estructura altamente dinámica que recibe las señales del ambiente implicadas en el avance, retroceso, o cambio de dirección del axón y que responde al estímulo de los factores neurotróficos (Figura 5) (16), en particular el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y la laminina, los cuales producirá la elongación axonal hacia sus órganos diana; por lo que, la regeneración exitosa dependerá de la estrecha y secuencial comunicación entre los axones, las células de Schwann, macrófagos, la vascularización y el estímulo producido por los órganos diana (17,18). Además, es importante mencionar que existe una ventana de tiempo limitado en el que las células de Schwann expresan genes asociados a factores de crecimiento que permiten la regeneración neuronal. Aunado a esto en la región distal del nervio lesionado (en donde el axón degenera), las células de Schwann se desdiferencian y dejan de mielinizarse, para posteriormente expresar genes asociados con las características de las células madre y con un cambio llamado transición epitelial mesenquimatosa (EMT), en el que las células se vuelven menos adhesivas y más migratorias. La EMT es aún más pronunciada en las células de Schwann en la región del puente donde se produjo el corte. Aquí, en respuesta

a los niveles elevados de la proteína TGF- β , las células se vuelven cada vez más mesenquimatosas y móviles, y apoyan la reparación de los nervios (19,20). Al mismo tiempo, en el área del daño axonal, empieza a haber un reclutamiento y activación de quinasas las cuáles son transportadas hacia el soma celular en donde modulan y activan factores de transcripción regulados por genes (CREB, ATF-3, c-Jun, factor hélix-loop-hélix, Olig 1 y Sonic hedgehog), los cuales se conocen como “regeneración asociada a genes” (RAG’s) (21,22) . También se debe hacer mención de que la restauración de los nervios lesionados requiere de una respuesta celular y molecular compleja que favorezca la reconstrucción y reconexión de los axones con el fin de recuperar la función sensorial o motora. Dentro de esta respuesta celular y molecular, intervienen muchos factores de crecimiento, los cuales mejoran la velocidad y la precisión de la restauración del nervio lesionado (13).

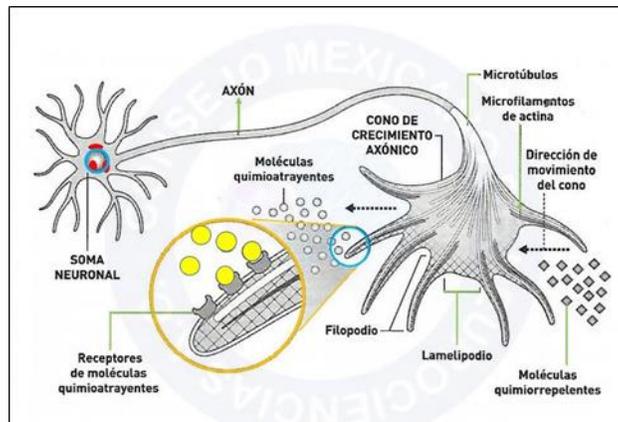


Figura 5. Cono de crecimiento axónico y las múltiples señales, tanto de atracción como de repulsión, que definen su trayectoria. (Tomada del consejo mexicano de Neurociencias <https://www.consejomexicanodeneurociencias.org>)

Factores neurotróficos en la regeneración de nervios periféricos

Los factores neurotróficos son un grupo heterogéneo de moléculas de señalización responsables de mantener el crecimiento y la supervivencia de los axones, neuronas sensoriales y motoras después del daño tisular. El grupo incluye a tres familias: las neurotrofinas (NGF, BDNF, NT y NT-4/5), citocinas neuropoiéticas (IL-6, IL-11 y factor inhibidor de leucemia (LIF), oncostatina (OSM)) y los ligandos del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF, neurturina, artemina y persefina) (21,22).

Los ligandos del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) aumentan la supervivencia de las neuronas motoras y simpáticas, asimismo el GDNF es un factor que protege a las neuronas motoras mediante el crecimiento axonal y mielinización, además de promover la proliferación de neuronas sensoriales y motoras (23,24).

Las citocinas neuropoiéticas son proteínas secretoras que tienen funciones con diferentes respuestas neuronales, como la supervivencia y la diferenciación neuronal (24).

Por otro lado, las neurotrofinas poseen la capacidad de guiar a los axones en cono de crecimiento durante la regeneración ya que inducen quimiotaxis de las neuronas sensoriales y estabilizan el citoesqueleto para la reorganización de los componentes estructurales (24).

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una neurotrofina que ayuda a la reparación y recuperación funcional de los nervios lesionados al favorecer la proliferación y diferenciación de las neuronas. Otra neurotrofina involucrada en el proceso de regeneración nervioso es el factor neurotrófico endógeno derivado del cerebro (BDNF), el cual se expresa rápidamente en las neuronas sanas después del daño axonal con la finalidad de promover la supervivencia, el crecimiento y diferenciación celular, así como la funcionalidad de la neurona. También, interviene en la conservación de la integridad neuronal y el mantenimiento de la plasticidad sináptica de una célula nerviosa (23,25). Además en diferentes estudios experimentales se ha observado que el BDNF aumenta la cantidad de axones mielinizantes, la densidad y los diámetros de las fibras mielinizadas (26). Sin embargo, la base celular y molecular de cómo las neurotrofinas regulan la mielinización sigue sin comprenderse. En el sistema nervioso central (SNC) el BDNF induce la expresión de proteínas de mielina como la proteína básica de mielina (MBP) (27), la cual es una de las proteínas más abundante en la mielina del SNC y es responsable de la adhesión de las superficies citosólicas de la mielina compacta (28).

Lesiones del nervio facial

La lesión de los nervios en la región de la cabeza y el cuello (dentro de los que se encuentra el nervio craneal VII o nervio facial), puede ser secundaria a etiologías congénitas, infecciosas, idiopáticas, iatrogénicas, traumáticas, neurológicas, oncológicas o sistémicas (29).

La lesión iatrogénica del nervio facial es uno de los principales temores de los otorrinolaringólogos durante las cirugías y a pesar de los avances tecnológicos, el riesgo de parálisis iatrogénica del nervio facial sigue siendo alto (30). Esto se debe a que el cirujano de oído trabaja en una de las regiones más difíciles del cuerpo, debido a que las estructuras a intervenir son diminutas, se encuentran dentro del hueso, temporal (31) o presenta variaciones anatómicas y porque su estrecha relación topográfica que tiene con otras estructuras en las que se establecen las diferentes patologías puede hacer que se confunda y dificulte su identificación, así como la experiencia inadecuada del cirujano (29,30,32-34).

Se ha descrito que la incidencia de disfunción del nervio facial puede ser significativa, ya que afecta de 20 a 30 por cada 100.000 personas cada año y de acuerdo a la rama del nervio que afecte (temporal, cigomática, bucal, mandibular marginal y cervical); puede ocasionar incompetencia oral o babeo, sequedad corneal, obstrucción del campo visual secundaria a ptosis o parálisis facial (29).

La parálisis facial (PF), es un trastorno neuromuscular ocasionado por la lesión de las vías motora y sensorial del mismo que ocasiona una alteración del movimiento en los músculos del rostro, en la secreción de salival, lacrimal y en el sentido del gusto, generando una pérdida o disminución de la motricidad o contractilidad de la musculatura facial (35). Esta parálisis facial ocasiona un problema estético, que también afecta la vida social, económica y psicológica del paciente (30).

La parálisis facial se produce por la exposición simple del nervio, la manipulación al movilizarlo durante un procedimiento quirúrgico, alteraciones de la vascularización e incluso por la sección de este (32) y de acuerdo al grado de lesión que sufra el nervio va a ser la severidad de la parálisis facial (13). Cabe mencionar que durante las intervenciones quirúrgicas de cabeza y cuello la compresión y estiramiento de

los nervios faciales ocasiona neuropraxia y axonotmesis, lo que resulta en una disfunción del nervio facial, que tiene un carácter reversible y si hubo una sección del nervio, entonces el daño es permanente debido a que se produce neurotmesis (36).

Estrategias quirúrgicas para el manejo del nervio facial

El daño del nervio facial conduce a déficits tanto funcionales como estéticos. Los objetivos de la rehabilitación facial son restaurar la simetría facial y el control voluntario de la musculatura facial, permitiendo así que el paciente exprese emociones a través de dicha musculatura, al igual que proteger el ojo y proporcionar continencia oral (37).

Las técnicas actuales de reparación de los nervios periféricos se basan en conceptos propuestos desde el año 1821, cuando Sir Charles Bell intentó reparar el nervio facial por primera vez. Durante los últimos 30 años, los avances en óptica, técnicas microquirúrgicas y la comprensión de la anatomía y fisiología neuromuscular han llevado a una mejora significativa en las opciones de tratamiento para lesiones extensas y lesiones del nervio facial de larga evolución. Los estudios caninos en 1970 describieron colgajos neuromusculares libres y en 1971 estas transferencias de tejido se habían descrito en el entorno clínico. A medida que se va obteniendo una mejor comprensión de la anatomía fascicular del nervio facial y el territorio muscular correspondiente, así como la tonicidad de varios músculos faciales y las propiedades únicas de la distribución de la placa terminal motora del músculo facial, continuamos refinando las técnicas quirúrgicas para producir mejores resultados funcionales, simétricos y de apariencia natural (37).

Manejo quirúrgico de la lesión aguda del nervio facial

Neurorrafia primaria:

Cuando los extremos cortados, proximal y distal, del nervio facial están disponibles para la reparación, las lesiones agudas del nervio facial deben repararse lo antes posible. Después de 72 horas, las reservas de neurotransmisores necesarias para la despolarización de la placa terminal motora se agotan de manera irreversible y

los músculos diana ya no responden a la estimulación del nervio distal. Una reparación de extremo a extremo sin tensión es la técnica "estándar de oro". Los injertos de nervio están indicados cuando los muñones cortados proximal y distal del nervio facial son claramente identificables pero el espacio intermedio es demasiado grande para efectuar una reparación sin tensión. Una vez que los extremos del nervio facial han sido disecados y recortados al nivel de los fascículos sanos, el nervio puede repararse de un extremo a otro con un injerto de nervio libre interpuesto. El nervio sural, auricular mayor y el nervio cutáneo antebraquial medial (NCAM) o el nervio cutáneo antebraquial lateral (NCAL) son todos donantes aceptables (37).

Injerto de nervio facial cruzado:

Cuando el extremo proximal del nervio facial no está disponible para la reparación primaria, se puede emplear un injerto de nervio facial contralateral. Los axones del nervio facial opuesto se desvían hacia el muñón del nervio facial distal lesionado a través de un injerto de nervio libre. La selección de un nervio donante con una función similar y sincronizada con la del nervio lesionado, como el nervio facial contralateral, conduce a un resultado funcional natural y minimiza la sincinesia. Las ramas del nervio facial contralateral se exponen a través de una incisión preauricular estándar y la estimulación nerviosa identifica las ramas del nervio que pueden sacrificarse sin incurrir en déficits funcionales en el lado donante. Por lo general, se eligen una o dos ramas nerviosas que causan la elevación de la comisura oral y el labio superior mientras se protegen las ramas que preservarán la función del párpado. A continuación, las ramas cortadas del nervio donante se coaptan de un extremo a otro con el injerto de nervio libre, que suele ser el nervio sural en función de su calibre, longitud y disponibilidad.

Transferencias nerviosas y transferencias nerviosas parciales:

Los defectos del nervio facial que no se pueden reparar con el nervio facial ipsilateral o contralateral deben depender de la inervación de una fuente alternativa. Las técnicas anteriores sacrificaban un nervio adyacente, como el hipogloso, para proporcionar axones regeneradores para el muñón del nervio facial distal. Sin embargo, la morbilidad del donante es alta y viene aunada problemas de deglución, habla y hemiatrofia lingual. La morbilidad adicional surge de la activación de los músculos diana originales del nervio donante para estimular los músculos faciales reinervados. Debido a la alta tasa de sincinesia que se desarrolla con el uso de esta técnica, se ha descrito la transferencia parcial del nervio hipogloso utilizando hasta el 25% del nervio con una reinervación adecuada de los músculos faciales y sin una pérdida apreciable de la función de la lengua o déficits en el habla (37).

Si bien las técnicas quirúrgicas de reinervación del nervio facial han sido y siguen hasta el día de hoy siendo el procedimiento estándar para las lesiones del nervio facial, éstas no están exentas de secuelas; la reparación del nervio facial se complica con frecuencia por sincinesia o discinesia. La primera se define como la contracción anormal y simultánea de un grupo de músculos con expresión facial voluntaria o involuntaria, este fenómeno ocurre cuando los axones en regeneración inervan objetivos no deseados. Por otra parte, la discinesia se refiere a las contracciones musculares faciales no deseadas que ocurren cuando los axones inervan inapropiadamente el objetivo deseado. Es más probable que estos fenómenos ocurran con lesiones más proximales del nervio facial, especialmente lesiones intratemporales.

Igualmente es importante comentar que la cirugía reparadora nerviosa para nervios seccionados, tiene la desventaja de que la regulación de los factores neurotróficos endógenos es tardía posterior al daño y podría ser insuficiente para una consolidación adecuada, por lo que la administración exógena de dichos factores y con una liberación prolongada y en cantidades suficientes, podría traer un beneficio en la regeneración neuronal.

Hoy en día la terapia con administración local exógena de factores neurotróficos se encuentra limitada por la gran complejidad de esta, los pocos estudios que se han hecho al respecto, así como el costo efectividad de esta.

Justificación

Las lesiones del nervio facial durante los procedimientos quirúrgicos varían del 2-40% de acuerdo al tipo de abordaje, en las cirugías de oído con la realización de mastoidectomías se presenta del 3.7-17% con la característica de que éstas últimas por lo general van seguidas de cirugías de revisión, por lo que la regeneración de la integridad del nervio facial es de vital importancia, no sólo por una cuestión estética sino también para mantener una función fisiológica relacionadas con las fibras motoras. Para la reparación de este, se ha utilizado la resección y anastomosis termino-terminal del nervio dañado, así como la colocación de un injerto autólogo nervioso, pero no siempre tiene los resultados esperados o la recuperación total de la función nerviosa, además de que provoca daño adyacente por la toma del injerto. En la literatura se ha descrito que la aplicación de factores de crecimiento neurotróficos favorecen la regeneración de los nervios periféricos; por lo que, en este estudio se propone seccionar y reanastomosar el nervio facial (neurorrafia) de cobayos combinado con la aplicación del BDNF para favorecer la restauración nerviosa lo más cercana posible a una regeneración fisiológica y lograr una recuperación total o casi total de la función.

Pregunta de investigación

¿La aplicación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) favorecerá la regeneración nerviosa de nervios faciales seccionados de modo iatrogénico?

Hipótesis

El BDNF es un factor de crecimiento que modula la expresión la proteína básica de mielina (MBP) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) las cuales promueven la generación de una matriz extracelular adhesiva que permite la regeneración axonal, por lo que su aplicación tópica sobre el nervio facial después de una neurorrafía y la colocación de un injerto de nervio sural en el facial, favorecerá su regeneración.

Objetivo general

Evaluar los cambios clínicos, macroscópicos, microscópicos y en la expresión de la proteína básica de mielina (MBP) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP) post-neurorrafía del facial combinada con la aplicación de BDNF o colocación de un injerto de nervio sural en cobayos.

Objetivos específicos

- Evaluar los cambios clínicos producidos después de realizar neurorrafía del facial combinada con la aplicación de BDNF con respecto a la presencia de parálisis facial, función del cierre de los ojos, reflejo de palpebral y movimientos de los bigotes.
- Valorar electromiográficamente los cambios en los potenciales de acción musculares compuestos, velocidad de conducción, amplitud de respuesta, dispersión temporal y latencias del nerviosas, después de realizar neurorrafía y la colocación de un injerto de nervio sural en el facial en combinación con la aplicación de BDNF en cobayos
- Evaluar macroscópicamente en los nervios operados y tratados con BDNF, la presencia de adherencias al tejido circundante, inflamación, fibrosis o dehiscencia.

- Evaluar microscópicamente en el nervio sometido a neurorrafia y a la colocación del injerto de sural tratados con BDNF, la presencia de inflamación, fibrosis y regeneración axonal.

- Cuantificar la expresión de la proteína básica de mielina (MBP) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para valorar regeneración de las vainas de mielina, en la anastomosis del nervio facial reanastomosado y del injerto de sural, tratados con BDNF.

Material y Métodos

Se realizó un estudio experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo, en la Unidad de trasplante pulmonar experimental del Departamento de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INERICV).

Animales de experimentación

En este estudio se utilizaron 30 cobayos de raza Dunkin Harley libres de patógenos específicos producidos en el bioterio del INER-ICV, sin importar sexo, ni edad, con peso entre 300-500 gr, sin alteraciones neurológicas, los cuales se manejaron de acuerdo a las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (38) y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos (39).

La muestra se calculó para una población infinita con un intervalo de confianza del 95% (100 individuos por grupo), pero como eran muchos animales, el cálculo se llevó a cabo bajo los criterios de las tres Rs (Reemplazo, Refinamiento y Reducción), obteniéndose un número de 10 animales por grupo (40).

Los animales no requirieron de condición o característica particular de alojamiento, mantenimiento, alimentación o cuidados veterinarios.

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

Se incluyeron cobayos de raza Dunkin Harley libres de patógenos específicos producidos en el bioterio del INER-ICV, sin alteraciones neurológicas.

Criterios de exclusión

Los animales con antecedentes de algún procedimiento o enfermedad neurológica fueron excluidos del estudio.

Criterios de eliminación

Todo animal que mostró signos clínicos de cualquier patología que no haya sido provocada por la sección del nervio facial, fue eliminado del estudio. También se eliminaron los cobayos que fallecieron durante el tiempo de estudio.

Criterios de terminación

Aquellos animales que presentaron signos de dolor agudo o crónico, de acuerdo a lo descrito por The Rat Grimace Scale (41) y que no disminuyó con la aplicación de medicamentos, fueron sometidos a eutanasia con sobredosis anestésica utilizando pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer S.A. de C.V. Guadalajara, México).

Grupos de estudio

En veinte animales se realizó sección y neurografía del facial izquierdo y a los 10 restantes se seccionó y colocó un injerto de nervio sural en el nervio facial izquierdo y fueron tratados de la siguiente manera:

Grupo I (n=10): Neurografía del facial sin tratamiento (NFSTx).

Grupo II (n=10): Injerto del nervio sural en el nervio facial izquierdo sin tratamiento (ISSTx).

Grupo III (n=10): Neurografía del facial tratada con BDNF (NFTx-BDNF).

Procedimientos de estudio

Anestesia

La anestesia en todos los grupos de estudio se llevó a cabo utilizando 0.05 mg de sulfato de atropina vía subcutánea y una mezcla de clorhidrato de xilacina (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Germany) (5 mg/kg) y clorhidrato de ketamina (Ketavet, Fort Dodge, Iowa, USA) (40 mg/kg) IM. Acto seguido se rasuró y lavó con jabón quirúrgico la región a intervenir y se realizó la antisepsia de la zona con yodopovidona (Dermodine Solución, Dermodex S.A. de C.V.), posterior a esto cada animal fue colocado sobre la mesa de cirugía en posición decúbito lateral izquierdo y se procedió a la realización de la cirugía.

Técnica quirúrgica

En todos los animales, se incidió el surco posteroauricular debajo de la base de la oreja izquierda y se expuso el nervio facial. Posteriormente se disecó toda la circunferencia del nervio facial y se colocaron dos suturas de nylon 9-0 (Ethilon, Ethicon, Sao Paulo, Brasil) a través del mismo debajo del epineuro para evitar su contracción posterior a la sección del mismo. Se identificó el tronco principal del nervio facial el cual se seccionó entre las suturas, distal al foramen estilomastoideo. Posteriormente, las partes proximal y distal del tronco principal se anastomosaron utilizando nylon 8-0 (Ethilon, Ethicon, Sao Paulo, Brasil), y se colocó una esponja de colágena (GELFOAM®, Pfzier, Michigan, USA) para envolver el nervio y sobre esta se agregó el BDNF. Finalmente se realizó el cierre convencional de la herida utilizando material de sutura absorbible de 4-0 (Vicryl, Ethicon, New jersey US).

En todos los animales del grupo II se realizó una incisión sobre la unión miotendinosa de los músculos gastrocnemios (tercio medio de la pierna derecha), se disecó por planos hasta llegar al nervio sural medial el cual se disecó en toda su circunferencia para seccionar 3mm del mismo, posteriormente el injerto se colocó en solución salina fisiológica hasta el momento de su inserción con el nervio facial del mismo animal.

Concluido el procedimiento quirúrgico, todos los animales recibieron tramadol y meloxicam SC a dosis de 1 mg/kg como analgésicos postquirúrgicos por 3 días y enrofloxacin (Baytril, Bayer, Leverkusen, Alemania) a dosis de 5 mg/kg IM cada 24 h por cinco días como antibiótico. (Figura 6)

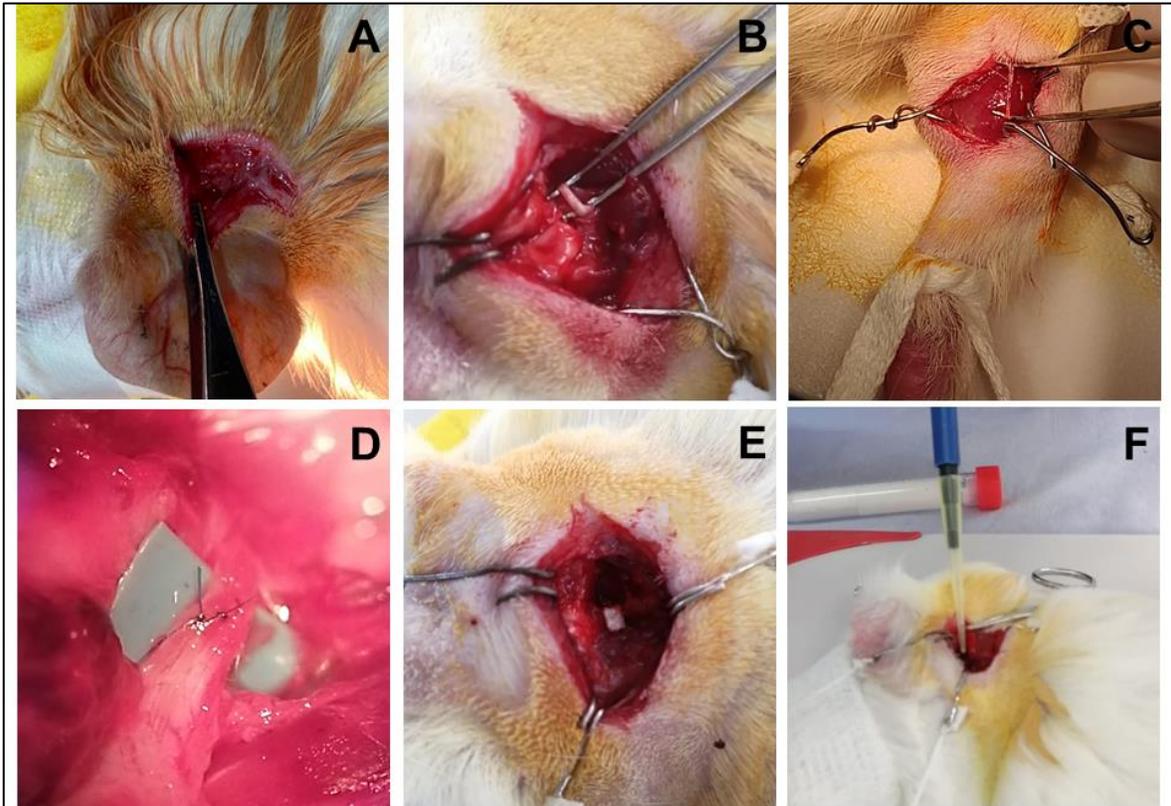


Figura 6. Muestra la técnica quirúrgica. A) Incisión sobre el surco posteroauricular, B) disección del tronco principal del nervio facial, C) disección del nervio sural en los animales del grupo II, D) anastomosis del nervio facial, E) colocación de la esponja de colágena sobre el sitio de la anastomosis, F) aplicación del BDNF sobre la esponja de colágena.

Tratamiento

En el grupo III el BDNF se administró como dosis única al concluir la anastomosis del nervio, tanto sobre la cama de esponja y directamente sobre el nervio, respectivamente. La dosis a utilizar fue de 6 μ l de una solución de 1 μ g/ μ l para que embebiera por completo la neurorrafia.

Evaluación clínica

Todos los animales fueron evaluados clínicamente antes del procedimiento quirúrgico, así como durante la primera semana postquirúrgica y posteriormente cada semana durante el tiempo restante del estudio. Durante 12 semanas se evaluó la presencia de parálisis facial, mediante observación directa y toma de video, la función del reflejo palpebral y los movimientos de los bigotes. Estos parámetros fueron evaluados mediante una escala subjetiva basada en el grado y calidad del movimiento ocasionado por la lesión nerviosa, reflejo palpebral: 1 Ausencia completa de cierre palpebral, 2 Ausencia de cierre palpebral con contracción orbicular, 3 Cierre del 50% del párpado, 4 Cierre del 75% del párpado y 5 Cierre completo del párpado (42). Movimiento de bigotes: 1 Ausencia total de movimiento, 2 Tremor leve, 3 Tremor mayor, 4 Movimiento NL, 5 Movimiento NL con posición anterior.

Evaluación macroscópica

Al finalizar el estudio los animales fueron sometidos a eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico (100mg/kg) (Anestosal, Pfizer, Estado de México, México), se realizó un abordaje retroauricular del lado izquierdo y se disecó hasta exponer el nervio facial ipsilateral en el que se evaluó datos de infección, necrosis, adherencias, fibrosis o dehiscencia del mismo. Finalmente se tomó el segmento del nervio que abarcaba la anastomosis cicatrizada, el cual se seccionó en dos porciones proximal y distal a la anastomosis para su evaluación histológica.

Evaluación histológica

Para la evaluación microscópica, las muestras tomadas de la zona de anastomosis del nervio facial, se fijaron en formaldehído al 10% y a las 24 horas se realizó la inclusión en parafina, posteriormente se hicieron cortes seriados de 4µm, tiñeron con hematoxilina-eosina, Tricromica de Masson, Azul de Toluidina para observar. Se evaluó el grado de inflamación, fibrosis y regeneración axonal en toda la circunferencia de la muestra mediante una escala subjetiva de acuerdo a la

intensidad de los cambios histopatológicos (grado 1: ausente 0-10%, grado 2: leve 11-25%, grado 3: moderado 26-50% y grado 4: severo 51-100%) (43).

Inmunohistoquímica

La determinación de la expresión *in situ* de la proteína básica de mielina (MBP) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en las muestras de nervio facial se llevó a cabo por inmunohistoquímica. A las muestras incluidas en parafina se les realizaron cortes de tres micras y se montaron en laminillas silanizadas. Para desparafinarlas se colocaron en una estufa (Fisher Scientific) a 60 °C durante 30 minutos, se deshidrataron mediante transferencia en xilol por 5 minutos y posteriormente un minuto hasta Alcohol 96%, después se trataron con buffer de citratos pH 6, el antígeno se recuperó con calor en baño húmedo (Stable Temp®, Cole Parmer®) a 60°C por 30 minutos, se dejaron enfriar y se lavaron con Tris-Buffered Saline with Tween (TBST) tres veces por cinco minutos. La peroxidasa endógena se bloqueó utilizando peróxido de hidrógeno al 30% (J.T. Baker, Méx.) diluido (1:9 en H₂O desionizada) durante 15 minutos y se lavó nuevamente en tres tiempos de cinco minutos con TBST. Posteriormente se agregó suero bloqueador (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame, CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente para el bloqueo del pegado inespecífico y se lavó nuevamente. Una vez que se llevaron a cabo los pasos anteriores, las secciones de tejido fueron incubadas con el anticuerpo primario para MBP (ab216590, Abcam, Cambridge, UK), y GFAP (PA5-16291, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), diluidos en buffer (suero bloqueador) durante 24 horas a 4°C. Pasado este tiempo se lavaron nuevamente en tres ocasiones con TBST por cinco minutos cada uno y se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo biotilado universal (Vectastain Universal Quick Kit, Burlingame, CA) 10 minutos, se lavaron al final en tres tiempos de cinco minutos, posteriormente se utilizó el sistema Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame, CA) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se lavaron como ya se describió, se utilizó 3,3´Diaminobencidina (DAB) (BioCare Medical, USA) como revelador durante cinco minutos, se tiñeron con Hematoxilina y para virar el contraste se utilizó una solución

saturada de Carbonato de Litio (Fisher Chemical, USA). La cuantificación de la expresión de cada proteína se realizó empleando el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), desarrollado por el National Institute of Health (NIH) y el plugin IHC Profiler (44). Se tomaron imágenes de microscopía en formato digital de diez campos aleatorios por laminilla, a través de un microscopio, una cámara fotográfica digital (Hitachi digital), una computadora y el software necesario para capturar las imágenes. Todas las fotografías se tomaron a la vez utilizando el mismo objetivo y la misma intensidad de luz.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS Versión 21 para Windows. La evaluación de los valores no paramétricos se realizó con la prueba de Friedman y Q de Cochran y Kruskal Wallis. Mientras que los datos paramétricos se realizaron la prueba de ANDEVA. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

Resultados

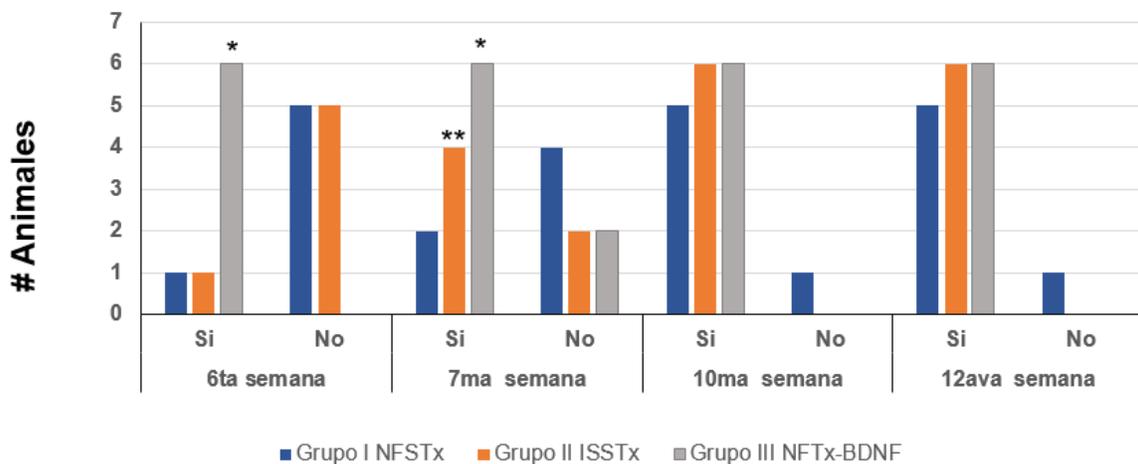
Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico y al tiempo de estudio establecido.

Hallazgos clínicos

Clínicamente en ningún caso se observaron complicaciones no asociadas al procedimiento quirúrgico. En todos los grupos, inmediatamente después de que los animales se recuperaron de la anestesia mostraron parálisis facial izquierda caracterizada por ausencia total de cierre palpebral y ausencia total del movimiento de bigotes. Sin embargo, todos los animales mostraron contractura orbicular, la cual se observó durante todo el tiempo de estudio.

En el grupo III, 4 (p = 0.006 Chi-cuadrado) de los animales operados, a partir de la cuarta semana postquirúrgica presentaron cierre palpebral, 5 animales en la quinta semana (p = 0.005 Chi-cuadrado), y en la sexta semana del estudio todos los cobayos lo presentaron (p = 0.004 Chi-cuadrado). En el grupo II, en la 6 semana un animal mostró cierre palpebral y a la séptima semana 4 animales (p = 0.05 Chi-cuadrado) y a partir de la décima semana postcirugía todos lo mostraron, pero esto ya no fue significativo en comparación con los otros grupos de estudio. Mientras que en el grupo I, en la quinta semana del estudio un animal mostró cierre palpebral (Chi cuadrado = NS) y en la séptima 2 animales, 4 en la octava y 5 en la décima y así se mantuvieron hasta el final del estudio.

Cierre palpebral por semana en cobayos con parálisis facial postneurografía con y sin tratamiento con BDNF



*p < 0.004, Chi-cuadrado

**p = 0.05 Chi-cuadrado

Grafica 1. Muestra la presencia de cierre palpebral de la 6ta a la 12va semana postcirugía en los tres grupos de estudio.

Por otro lado, los animales del grupo tratado con BDNF presentaron mayor porcentaje de cierre palpebral desde la tercera semana postcirugía y el tiempo restante del estudio. Este porcentaje de cierre fue significativamente mayor hasta la semana 9 en comparación con los otros 2 grupos de estudio (p < 0.01, ANDEVA,

Tukey, Dunnett). Sin embargo, de la semana 10 al 12 solo fue diferente con el grupo I en la semana ($p < 0.05$, ANDEVA, Dunnett) (Cuadro 1).

Porcentaje cierre palpebral										
Grupo de estudio	Semana									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grupo I NFSTx	0	0	8.3 ± 8.33	8.3 ± 8.3	16.67 ± 10.54	33.33 ± 10.54	41.67 ± 8.33	41.67 ± 8.33	45.83 ± 10.03	45.83 ± 10.03
Grupo II ISSTx	0	0	0	8.3 ± 8.3	33.33 ± 10.54	37.50 ± 12.50	37.50 ± 12.50	66.67 ± 5.27	66.67 ± 5.27	66.67 ± 5.27
Grupo III NFTx-BDNF	8.33 ± 8.33	*37.5 ± 12.5	*54.17 ± 4.16	*54.17 ± 4.16	**54.17 ± 4.16	*66.67 ± 5.27	*70.83 ± 4.16	*70.83 ± 4.16	**70.83 ± 4.16	**70.83 ± 4.16
ANDEVA	p = 0.391	p = 0.003	p = 0.001	p = 0.000	p = 0.031	p = 0.063	p = 0.039	p = 0.009	p = 0.05	p = 0.05
Dunnett		p = 0.006	p = p = 0.006	p = 0.001	p = 0.025	p = 0.075	p = 0.048	p = 0.022	p = 0.05	p = 0.05
Tukey		p = 0.006	p = 0.002	p = 0.001	p = 0.025	p = 0.075	p = 0.048	p = 0.03	p = 0.05	p = 0.05
Diferencia estadística		* Grupo III vs I y II	* Grupo III vs I y II	* Grupo III vs I y II	** Grupo III vs I		* Grupo III vs II	* Grupo III vs I	* Grupo III vs I	* Grupo III vs I

Promedio ± Error estándar

Cuadro 1. Muestra el porcentaje de cierre palpebral postcirugía en todos los grupos de estudio.

En todos los grupos se observó cierre palpebral grado 2 a partir de la tercera semana postcirugía, el cual continuo en la mayoría de los animales del grupo I y II hasta la séptima semana. Este cierre palpebral en los animales del grupo I evoluciono a grado 3 en la octava semana postcirugía y así se mantuvo hasta el final del estudio. Solo un animal de este grupo mostro cierre grado 4 en la semana 11 y 12. Cuatro animales del grupo II mostraron grado 4 de cierre palpebral en la semana 10 y así se mantuvo hasta el final del estudio, los 2 animales restantes presentaron grado 3 en la misma semana. En el grupo III, la mayoría de los cobayos presentaron cierre palpebral grado 3 en la tercera semana post-tratamiento, el cual evoluciono a grado 4 en 5 animales (83%) en la octava semana postquirúrgica y así se mantuvo hasta concluir el estudio. Al comparar el tiempo y presencia de mayor grado de cierre palpebral, el mostrado por el grupo III fue superior al de los otros dos grupos de estudio ($p < 0.05$, Chi cuadrada, $p = 0.005$, Friedman) (Cuadro 2).

	Grado de cierre palpebral									
Grupo Estudio	Semana									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grupo I NFSTx	6 grado 1	6 grado 2	5 grado 2 1 grado 3	5 grado 2 1 grado 3	4 grado 2 2 grado 3	2 grado 2 4 grado 3	1 grado 2 5 grado 3	1 grado 2 5 grado 3	1 grado 2 4 grado 3 1 grado 4	1 grado 2 4 grado 3 1 grado 4
Grupo II ISSTx	6 grado 1	6 grado 2	6 grado 2	5 grado 2 1 grado 3	5 grado 2 1 grado 3	5 grado 3 1 grado 4	5 grado 3 1 grado 4	2 grado 3 4 grado 4	2 grado 3 4 grado 4	2 grado 3 4 grado 4
Grupo III NFTx-BDNF	5 grado 2 1 grado 3	2 grado 2 3 grado 3 1 grado 4	1 grado 2 3 grado 3 1 grado 4	5 grado 3 1 grado 4	5 grado 3 1 grado 4	1 grado 3 5 grado 4	1 grado 3 5 grado 4			
Chi cuadrada	p = 0.347	p = 0.036	p = 0.030	p = 0.024	p = 0.308	p = 0.020	p = 0.020	p = 0.042	p = 0.159	p = 0.159
Prueba de Friedman	p > 0.05	p = 0.005	p = 0.005	p = 0.005	p > 0.05	p = 0.005	p = 0.005	p = 0.005	p > 0.05	p > 0.05

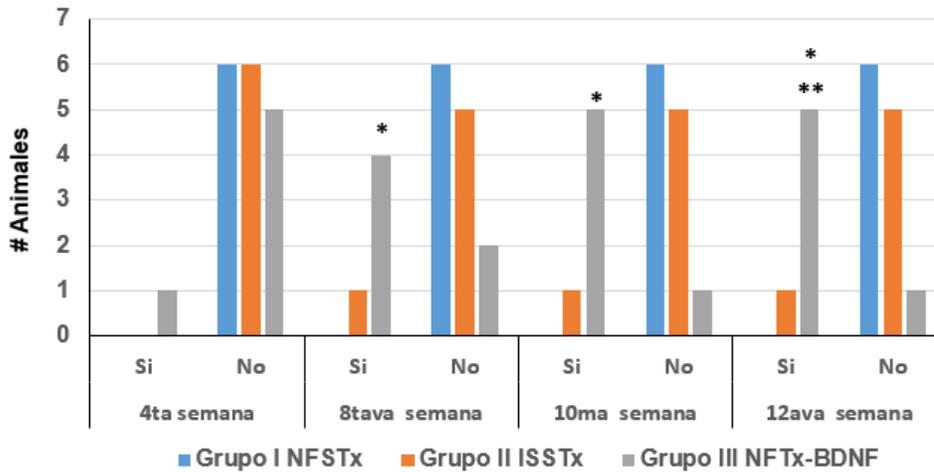
Numero de animales por grupo y grado de cierre palpebral.

Grado 1: Sin Cierre, **Grado 2:** Sin cierre con contracción orbicular, **Grado 3:** 50% cierre, **Grado 4:** 75% cierre, **Grado 5:** 100% cierre.

Cuadro 2. Muestra el número de cobayos por grupo de estudio que presentaron cierre palpebral, tiempo en el que se presentó el cierre palpebral y grado del mismo.

Al comparar el movimiento de los bigotes, durante las primeras 3 semanas postcirugía, ningún animal lo presentó. En la cuarta y hasta la séptima semana postcirugía solo un cobayo del grupo III mostro movimiento ($p > 0.05$, Chi-cuadrado). En la octava 1 animal del grupo II y 4 animales del grupo III presentaron movimiento, pero solo el número de animales con movimiento del grupo III fue significativa ($p = 0.027$, Chi-cuadrado). En la semana 10 y hasta el final del estudio 5 animales del grupo III ($p = 0.005$, Chi-cuadrado) presentaron movimiento en comparación con los otros grupos de estudio. Al comparar el grado de movimiento mostrado por los animales del grupo III desde que mostraron movimiento, este fue de tremor leve ($p = 0.001$ Friedman) (Grafica 2).

Movimiento de los bigotes por semana en cobayos con parálisis facial postneurrografía con y sin tratamiento con BDNF



*p < 0.05, Chi-cuadrado

**p= 0.001 Friedman

Grafica 2. Muestra la presencia del movimiento de los bigotes postcirugía en todos los grupos de estudio.

Hallazgos macroscópicos.

En ningún caso se observó presencia de dehiscencia, necrosis, infección.

Macroscópicamente todos los animales tratados con injerto de nervio sural (Grupo II) desarrollaron fibrosis moderada a diferencia de los cobayos de los grupos I y III (p =0.001 Chi-cuadrado, p = 0.002 Kruskal Wallis) (Cuadro 3).

	Grupo		
	Neurorrafia del facial sin tratamiento (NFST)	Injerto del nervio sural en el nervio facial izquierdo sin tratamiento (ISSTx)	Neurorrafia del facial tratada con BDNF (NFTx-BDNF).
Ausente	0	0	0
Leve	6	0	2
Moderado	0	6	0
Severo	0	0	0

Cuadro 3. Muestra el grado de fibrosis en cada grupo al final del estudio.

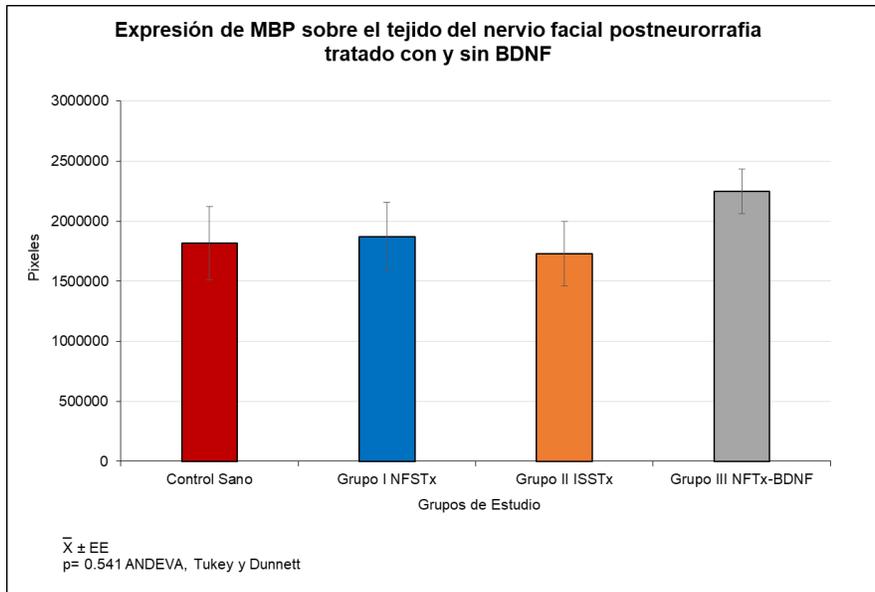
Con respecto al grado de adherencias macroscópicas se observó que todos los animales del Grupo II desarrollaron fibrosis moderada a diferencia de los cobayos de los grupos I y III ($p = 0.001$ Chi-cuadrado, $p = 0.002$ Kruskal Wallis). (Cuadro 4)

		Grupo		
		Neurorrafia del facial sin tratamiento (NFST)	Injerto del nervio sural en el nervio facial izquierdo sin tratamiento (ISSTx)	Neurorrafia del facial tratada con BDNF (NFTx-BDNF).
Adherencias	Ausente			
	Leve	6	0	2
	Moderado	0	0	0
	Severo	0	6	0

Cuadro 4. Grado de adherencias en cada grupo al final del estudio.

Expresión de MBP y GFAP

Al determinar la expresión de MBP observamos que el grupo I y grupo II mostraron una expresión similar al tejido del nervio facial sano, en comparación con el grupo III en el que se observó un aumento en la expresión de esta proteína. Sin embargo, estos cambios no presentaron diferencias significativas ($p = 0.541$ ANDEVA, Tukey y Duennett) (Gráfica 3) (Figura 7).



Gráfica 3. Muestra la expresión de la Proteína Básica de Mielina (MBP) en el tejido nervioso postneurorrafia tratado con diferentes tratamientos.

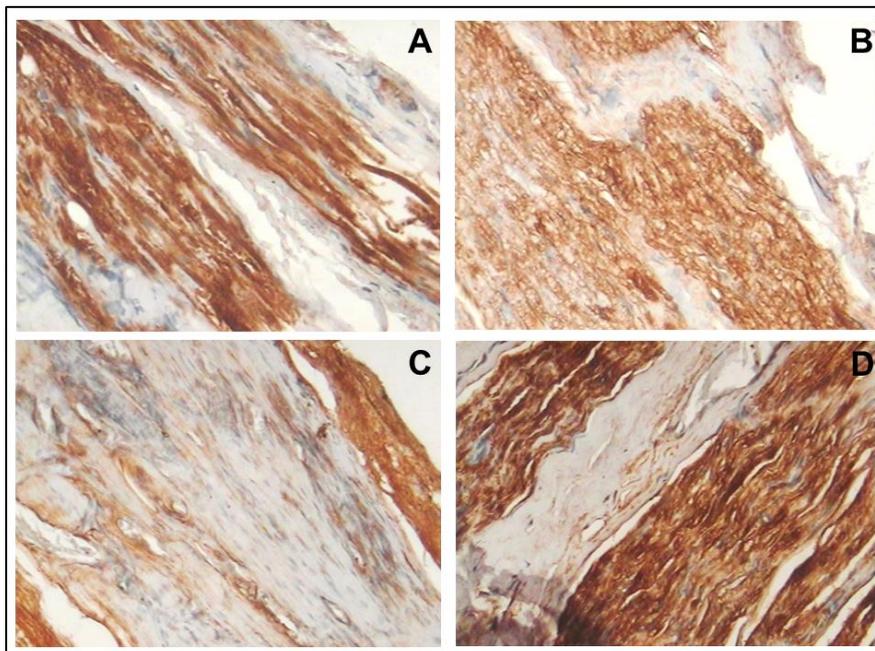
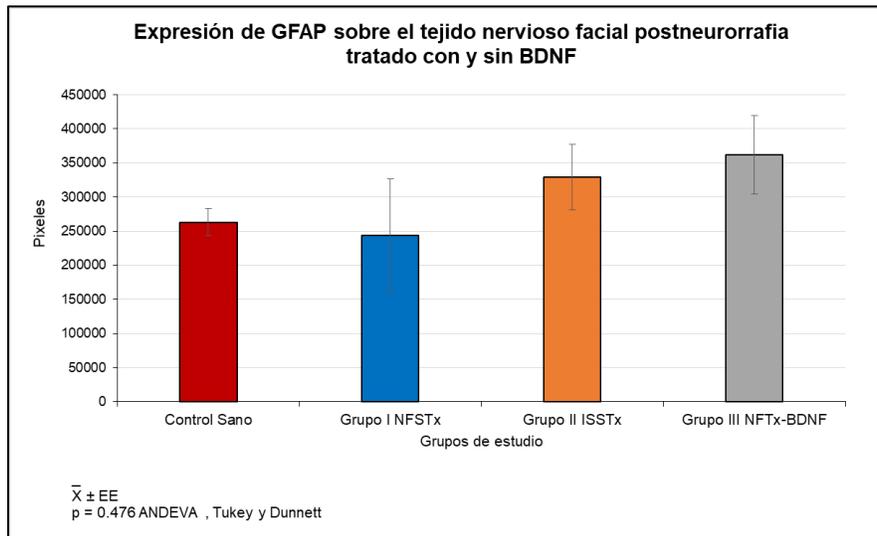


Figura 7. Se observa la expresión severa de MBP (color marrón intenso) sobre el tejido del nervio facial sano (A), tejido nervioso postneurorrafia sin tratamiento (B) y tejido nervioso postneurorrafia tratado con BDNF (D). Además, se observa un expresión moderada sobre el tejido nervioso postneurorrafia tratado con injerto de nervio sural. 20X

Por otro lado, la expresión de GFAP se presentó de forma similar tanto en el tejido sano como en el tejido del grupo I, en contraste con los grupos II y III en los que se observó una mayor expresión de GFAP, pero este incremento no fue estadísticamente significativo ($p=0.476$ ANDEVA, Tukey y Dunnett) (Gráfica 4, Figura 8).



Gráfica 4. Muestra la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) sobre el tejido nervioso postneurorrafia tratado con diferentes tratamientos.

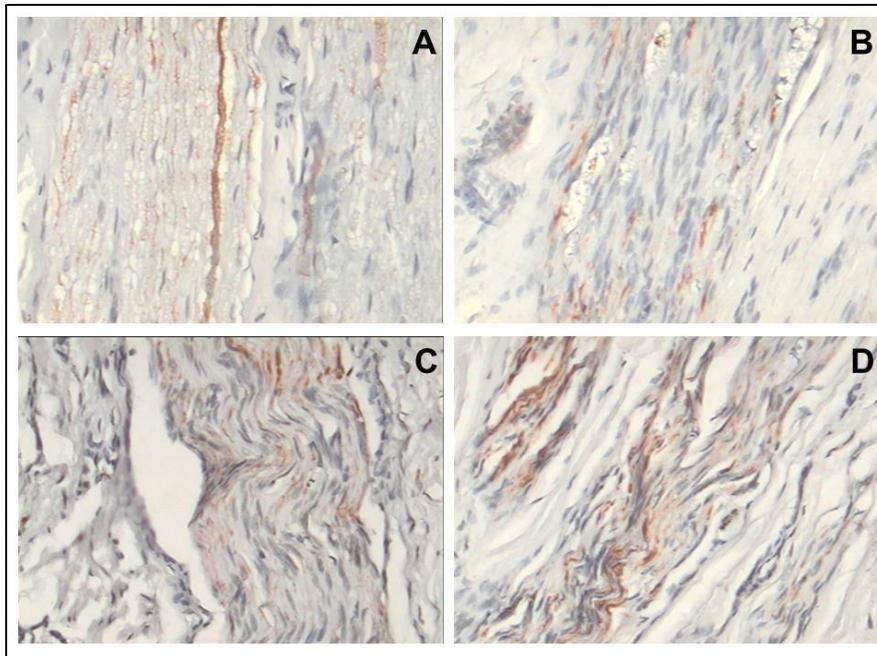


Figura 8. Se observa la expresión leve de GFAP (color marrón leve) sobre el tejido del nervio facial sano (A), tejido postneurorrafia sin tratamiento (B), tejido postneurorrafia tratado con injerto de nervio sural (C) y tejido postneurorrafia tratado con BDNF(D) 20X.

Discusión

La lesión iatrogénica del nervio facial es uno de los principales temores de los otorrinolaringólogos durante las cirugías debido a que puede producir parálisis facial por la alteración neuromuscular provocada por su lesión y ocasionar en el paciente problema estéticos, psicológicos, sociales y económicos (30,35). Para su tratamiento se han intentado diferentes estrategias quirúrgicas como la Neurorrafia primaria, colocación de injertos e incluso se ha probado con la ingeniería de tejidos, pero no han tenido el éxito deseado (37,45). También se ha recurrido al uso de factores de crecimiento para favorecer una adecuada cicatrización y regeneración del nervio facial ya que favorecen la regeneración axonal, formación de las bandas de Büngner y la supervivencia neuronal (18). En este estudio se evaluaron los cambios clínicos, macroscópicos, microscópicos y en la expresión de la proteína básica de mielina (MBP) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP) post- neurorrafia del facial combinada con la aplicación de BDNF o colocación de un injerto de nervio sural en cobayos.

En este estudio todos los cobayos sometidos a cirugía: sección y re-anastomosis del segmento mastoideo del nervio facial, mostraron parálisis facial inmediatamente posterior a ésta debido a que todos perdieron el reflejo de cierre palpebral y movimiento de las vibrisas, lo cual coincide con lo que se ha descrito en animales en el estudio de Borin et al (46). También concuerda con lo descrito en un metaanálisis por Sameh M. Zamzam, en donde se incluyeron 736 casos de 15 846 (4,6 %), se vio que la causa más frecuente de lesión iatrogénica al nervio facial son las cirugías de parótidas (364 casos, 49,5%). Las cirugías otológicas representaron 168 casos (22,8%) y dentro de éstas la más común a nivel de oído es la mastoidectomía en 49 casos (6,7%). La parte lesionada más común es la parte extratemporal (199 casos, 27%), y la rama mandibular marginal es la rama lesionada más común en (160 casos, 21,7%). El inicio inmediato ocurrió en 282 casos (38,3 %) (30).

En el caso de nuestro estudio, con respecto a la evaluación clínica del nervio facial

con el cierre palpebral, se obtuvo una mejor y más rápida recuperación en los animales tratados con BDNF porque este mejora la neurogénesis y la neurotransmisión a través de las sinapsis, promueve el crecimiento sináptico y modula la plasticidad sináptica como lo observó Shi et al (47) al estudiar la aplicación de este factor de crecimiento en la anastomosis del nervio ciático y observo que hay una mejor regeneración de la funcionalidad del mismo a las 8 semanas postcirugía. Con respecto al mayor grado de cierre palpebral, observado en los cobayos que recibieron tratamiento con BDNF hasta la fecha no se ha descrito ningún estudio en el que hayan evaluado el grado de este.

En nuestro estudio evaluamos el movimiento de los bigotes, porque este es un comportamiento dinámico que presentan los roedores, el cual puede ser cuantificable y se ha utilizado en muchos laboratorios de investigación que han evaluado la lesión y restauración de la función del nervio facial (48). Así mismo en este estudio el animal del grupo II y todos los animales del grupo III que presentaron tremor leve en bigotes, posiblemente fue provocado porque en ocasiones la fuente del movimiento del bigote después de la denervación crónica proviene de los axones colinérgicos autonómicos que viajan en la rama infraorbitaria del nervio trigémino, como lo describió Heaton et al (48), al estudiar el movimiento de los bigotes después de seccionar el nervio facial y reanastomosis del mismo. Por otro lado, este movimiento de los bigotes (tremor) en los animales del grupo III pudo ser originado porque se sabe que las uniones neuromusculares que permiten el movimiento de los bigotes son monoinervadas y que durante la restauración de la reinervación post anastomosis, adquirieron una poliinervación aberrante y por ende disminuyeron su movimiento, como lo describió Rink et al (49) cuando estudiaron el papel de diferentes factores de crecimiento en la reinervación óptima de los músculos faciales y la función vibrilatoria después de una lesión del nervio facial y la reparación quirúrgica en ratas. En otro estudio Cao et al (50), realizaron reanastomosis termino-terminal del nervio facial usando andamios de colágena y lamina impregnados con factores neurotróficos de crecimiento: factor neurotrófico ciliar (CNTF), así como BDNF y observaron que todos los animales mostraron una parálisis facial completa en el lado lesionado; 3 semanas después de la lesión, había aproximadamente un 25 %-

40 % de animales en el grupo con CNTF + BDNF que mostró una ligera recuperación del movimiento de los bigotes (tremor leve). En la Semana 16, la proporción de animales que había alcanzado un movimiento leve de bigotes había llegado al 70% y 50% en los dos grupos de factor neurotrófico; lo cual coincide con nuestra investigación en donde en la cuarta semana postcirugía se inició el movimiento en los animales tratados con BDNF.

Con respecto a la parte macroscópica de nuestro estudio se observó un mayor grado de adherencias y fibrosis en los animales que fueron tratados con el injerto del nervio sural, pero el menor grado de estos hallazgos observado en el grupo III, concuerda con lo observado por Daradka et al (51) quienes mencionan que los animales que son tratados con células madres promueven la expresión de BDNF y facilitan la regeneración con menor fibrosis y adherencias, al estudiar la regeneración de nervios periféricos en perros.

Nuestros hallazgos histológicos del grupo III concuerdan con lo observado por García Medrano que estudio la regeneración de las lesiones críticas del nervio periférico con factores de crecimiento y observó que los nervios tratados con factores de crecimiento, aparecen como un nervio normal, con una distribución fascicular adecuada, poca producción de fibras de colágena de forma regular y ordenada, que permite identificar sus tres envolturas bien definidas. También lo observado en el grupo control de nuestro estudio coincide con lo observado en este estudio, ya que los animales que no recibieron tratamiento, presentaron más fibras mielinizadas de mayor con un diámetro más pequeño y morfología más irregular porque todavía está en regeneración (10).

En todos los grupos de estudio hubo expresión similar de MBP en la anastomosis de los nervios operados porque el BDNF ejerce influencias contrastantes en la mielinización periférica: mejora la mielinización de las neuronas DRG dependientes de NGF pero inhibe la mielinización de las neuronas dependientes de BDNF, como lo han descrito varios autores que han trabajado con el tratamiento con este factor de crecimiento en la regeneración de nervios periféricos seccionados (52,53).

Por otro lado, la similar expresión de GFAP fue ocasionada porque esta tiene una participación relevante en la regeneración nerviosa y la remielinización de las

neuronas y se incrementa después de un daño nervioso para proporcionar un reordenamiento eficiente del citoesqueleto, el cual es necesario para la proliferación y diferenciación (54). Hasta la fecha no existe ningún estudio en el que se evalúe la expresión de este después de la reanastomosis de un nervio facial tratado con BDNF, por lo que lo observado en este estudio nos hace suponer que este factor de crecimiento no altera la producción de esta proteína durante la regeneración de nervio facial tratado con BDNF.

Conclusión

La realización de una neurografía del facial en cobayos combinada con la aplicación de una dosis de BDNF durante la cirugía, disminuye el grado de parálisis facial en menor tiempo y los cambios macroscópicos y microscópicos en comparación con la anastomosis sin tratamiento y la colocación de un INS; pero no produce cambios en la producción de MBP y GFPA.

Referencias

- 1.- Ho ML, Juliano A, Eisenberg RL, Moonis G. Anatomy and pathology of the facial nerve. *AJR Am J Roentgenol.* 2015 ;204: W612-9. doi: 10.2214/AJR.14.13444.
- 2.- Dodds SD. Sistema nervioso periférico. In Martin I. Boyer, *Comprehensive Orthopaedic Review 2*, Edición en español. Ed. AAOS American Academy Of Orthopaedic Surgeons. 2014 pp 11-130.
- 3.- León Rojas ED, León Rodríguez SN, Gutiérrez Ortega FH, Torres Criollo LM. Parálisis Facial. En Torres Criollo LM, Álvarez Ochoa RI, Pérez Ramírez JE. *Medicina de Urgencias Tomo 2*. 1ra ed. Puerto Madero. La Plata, Argentina. 2022. pp 173-183.
- 4.- Gorodner A, Lagraña R, Lagraña G, Cabral D. Blood nutrition of the extratemporal portion of the facial nerve. Surgical importance. *Revista Argentina Anatomía Online* 2017; 8 : 84-89.
- 5.- Ottaiano AC, Gomez GD, Freddi TAL. The Facial Nerve: Anatomy and Pathology. *Semin Ultrasound CT MR.* 2023; 44: 71-80. doi: 10.1053/j.sult.2022.11.005.
- 6.- Kesser BW. Anatomy of the facial nerve and associated structures. In Slattery WH, Azizzadeh B. *The Facial Nerve*. Thieme Medical Publishers; 1ra ed. New York, USA. 2014. pp 1-12. doi:10.1055/b-0034-92447.
- 7.- Gordin E, Lee TS, Ducic Y, Arnaoutakis D. Facial nerve trauma: evaluation and considerations in management. *Craniofac Trauma Reconstr.* 2015; 8: 1-13. doi: 10.1055/s-0034-1372522.
- 8.- Wavreille G, Baroncini M, Fontaine C. Anatomía, histología y fisiología del nervio periférico. *EMC-Aparato Locomotor*, 2011; 44: 1–9. doi:10.1016/s1286-935x(11)70975-3.
- 9.- Hitier M, Edy E, Salame E, Moreau S. Anatomía del nervio facial. *EMC – Otorrinolaringología.* 2007; 36 (1): 1-16. doi:10.1016/s1632-3475(07)70323-5.

- 10.- García Medrano B. Regeneración de las lesiones críticas del nervio periférico con factores de crecimiento. Estudio experimental. Tesis Doctorado. Universidad de Valladolid. Valladolid, España. 2013.
- 11.- Olman E. Conduction velocity and myelin. En: Introduction to Sensation and Perception. University of Minnesota Libraries Publishing; 2022.
- 12.- Bobba MN. Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la Degeneración Walleriana mediante diferentes aproximaciones experimentales. Tesis Licenciatura. Universidad de la república de Uruguay. Montevideo, Uruguay. 2013.
- 13.- Li R, Li D, Zhang H, Wang J, Li X, Xiao J. Growth factors-based therapeutic strategies and their underlying signaling mechanisms for peripheral nerve regeneration. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2020; 41:1289-1300. doi:10.1038/s41401-019-0338-1.
- 14.- Carré F, Hervochon R, Lahlou G, Lastennet D, Gatignol P, Bernardeschi D, et al. Outcomes and prognostic factors of facial nerve repair: a retrospective comparative study of 31 patients and literature review. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2022; 279: 1091–1097. doi.org/10.1007/s00405-021-07043-6.
- 15.- Lobato RD. Historical vignette of Cajal's work degeneration and regeneration of the nervous system with a reflection of the autor. *Neurocirugía*. 2008; 19: 456-468.
- 16.- Yamada KM, Wessells NK. Axon elongation. Effect of nerve growth factor on microtubule protein. *Exp Cell Res* 1971; 66:346-52.
- 17.- Klimovich P, Rubina K, Sysoeva V, Semina E. New frontiers in peripheral nerve regeneration: Concerns and remedies. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 24: 13380. doi: 10.3390/ijms222413380.
- 18.- Cui Y, Lu C, Meng D, Xiao Z, Hou X, Ding W, et al. Collagen scaffolds modified with CNTF and bFGF promote facial nerve regeneration in minipigs. *Biomaterials*. 2014; 35: 7819-27. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.065.

- 19.- Miller R. A change of fate for nerve repair. *Nature*. 2017; 551: 41-42. <https://doi.org/10.1038/551041a>.
- 20.- Arthur-Farraj PJ, Latouche M, Wilton DK, Quintes S, Chabrol E, Banerjee A, et al. C-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron*. 2012; 75: 633-647. doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.021.
- 21.- Gordon T. Nerve regeneration in the peripheral and central nervous systems. *J Physiol*. 2016; 594: 3517-3520. doi: 10.1113/JP270898.
- 22.- Klimovich, P; Rubina, K; Sysoeva, V & Semina, E. (2021). New Frontiers in Peripheral Nerve Regeneration: Concerns and Remedies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, pp. 1-14.
- 23.- Sebben AD, Lichtenfels M, da Silva JL. Peripheral nerve regeneration: cell therapy and neurotrophic factors. *Rev Bras Ortop*. 2015; 46: 643-9. doi: 10.1016/S2255-4971(15)30319-0.
- 24.- Önger ME, Delibaş B, Türkmen AP, Erener E, Altunkaynak BZ, Kaplan S. The role of growth factors in nerve regeneration. *Drug Discov Ther*. 2017; 10: 285-291. doi: 10.5582/ddt.2016.01058.
- 25.- Pandey S, Mudgal J. A Review on the Role of Endogenous Neurotrophins and Schwann Cells in Axonal Regeneration. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2022; 17:398-408. doi: 10.1007/s11481-021-10034-3.
- 26.- Chan JR, Cosgaya JM, Wu YJ, Shooter EM. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:14661-8. doi: 10.1073/pnas.251543398.
- 27.- Schirò G, Iacono S, Ragonese P, Aridon P, Salemi G, Balistreri CR. A Brief Overview on BDNF-Trk Pathway in the Nervous System: A Potential Biomarker or Possible Target in Treatment of Multiple Sclerosis? *Front Neurol*. 2022; 13: 917527. doi: 10.3389/fneur.2022.917527.

- 28.- Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63:1945-61. doi: 10.1007/s00018-006-6094-7.
- 29.- Ali SA, Stebbins AW, Hanks JE, Kupfer RA, Hogikyan ND, Feldman EL, et al. Facial Nerve Surgery in the Rat Model to Study Axonal Inhibition and Regeneration. *J Vis Exp.* 2020; 159: 10.3791/59224. doi:10.3791/59224.
- 30.- Zamzam, S.M., Hassouna, M.S., Elsayy, M.K. et al. Correction: Otolaryngologists and iatrogenic facial nerve injury: a meta-analysis. *Egypt J Otolaryngol.* 2023; 39, 85 <https://doi.org/10.1186/s43163-023-00450-y>.
- 31.- Dew LA, Shelton C. Iatrogenic facial nerve injury: prevalence and predisposing factors. *Ear Nose Throat J.* 1996; 75: 724-9.
- 32.- Quesada Martínez JL, Quesada Marín P, López Campos D. Parálisis facial traumática y iatrogénica. En Quesada Marín P. Parálisis facial periférica. Complicaciones y secuelas. E.U.R.O.M.E.D.I.C.E., Ediciones Médicas, S.L. Barcelona España. 2010. pp 95-103.
- 33.- López Aguado D, López Campos D, Bañales M, Pérez Lorensu J. Parálisis facial. Bernal Sprekelsen M, Riesgos y complicaciones en la cirugía ORL y de cabeza y cuello. Prevención y tratamiento E.U.R.O.M.E.D.I.C.E. Ediciones Médicas, S.L. Badalona, España. 2008. Pp 27-35.
- 34.- Jamshidi A, Hasanzadeh A, Zonnour A, Dabiri S, Yazdani N. Iatrogenic facial nerve injury in mastoidectomy: The impact of variables on the outcome. *American Journal of Otolaryngology.* 2022; 43: 103472. doi.org/10.1016/j.amjoto.2022.103472.
- 35.- Prats Golczer VE. Efectividad del tratamiento rehabilitador en pacientes con parálisis del nervio facial postparotidectomía y su impacto en la calidad de vida. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, Sevilla, España. 2015.
- 36.- Gardašević M, Zivić M, Djurdjević D, Petković-Ćurčin A. Application of different techniques in facial nerve reconstruction on experimental models. *Acta Veterinaria-Beograd.* 2023; 73 : 155-170. doi: 10.2478/acve-2023-0012.

- 37.- Myckatyn TM, Mackinnon SE. The surgical management of facial nerve injury. *Clin Plast Surg.* 2003; 30: 307-318. doi: 10.1016/s0094-1298(02)00102-5.
- 38.- Estados Unidos Mexicanos. AFÍA. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. *Diario Oficial de la Federación* 6 dic, 1999.
- 39.- National Institutes of Health U.S.A. Guía Para el Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health U.S.A. Edición Mexicana Auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. México, D.F. 2002.
- 40.- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol.* 2010; 8: e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412.
- 41.- Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain.* 2011; 7:55.
- 42.- De Faria SD, Testa JR, Borin A, Toledo RN. Standardization of techniques used in facial nerve section and facial movement evaluation in rats. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006; 72: 341-7. doi: 10.1016/s1808-8694(15)30966-6.
- 43 Veiga A, Rendal M, Matheu G, Andi3n C. S3nchez J, Segura R. Cambios histopatol3gicos en arterias humanas sometidas a procesos de isquemia fr3a y criopreservaci3n. *Angiolog3a.* 2004; 56: 97-105. doi.org/10.1016/S0003-3170(04)74854-3.
- 44.- Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PlosOne.* 2014: 9; 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0096801.e96801.
- 45.- Rovak JM, Tung TH, Mackinnon SE. The surgical management of facial nerve injury. *Semin Plast Surg.* 2004; 18: 23-30. doi: 10.1055/s-2004-823120.

- 46.- 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.
- 47.- Shi ZL, Fan ZY, Zhang H, Li ST, Yuan H, Tong JH. Localized delivery of brain-derived neurotrophic factor from PLGA microspheres promotes peripheral nerve regeneration in rats. *J Orthop Surg Res.* 2022; 17: 172. <https://doi.org/10.1186/s13018-022-02985-x>.
- 48.- Heaton JT, Sheu SH, Hohman MH, Knox CJ, Weinberg JS, Kleiss IJ, et al. Rat whisker movement after facial nerve lesion: evidence for autonomic contraction of skeletal muscle. *Neuroscience.* 2014; 265: 9-20. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.01.038.
- 49.- Rink S, Chatziparaskeva C, Elles L, Pavlov S, Nohroudi K, Bendella H, et al. Neutralizing BDNF and FGF2 injection into denervated skeletal muscle improve recovery after nerve repair. *Muscle Nerve.* 2020; 62:404-412. doi:10.1002/mus.26991.
- 50.- Cao J, Xiao Z, Jin W, Chen B, Meng D, Ding W, et al. Induction of rat facial nerve regeneration by functional collagen scaffolds. *Biomaterials.* 2013; 34: 1302-1310. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.031.
- 51.- Daradka MH, Bani Ismail ZA, Irsheid MA. Peripheral nerve regeneration: A comparative study of the effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells, platelet-rich plasma, and lateral saphenous vein graft as a conduit in a dog model. *Open Vet J.* 2021; 11: 686-694. doi: 10.5455/OVJ.2021.v11.i4.20.
- 52.- Xiao J, Wong AW, Willingham MM, Kaasinen SK, Hendry IA, Howitt J, Putz U, Barrett GL, Kilpatrick TJ, Murray SS. BDNF exerts contrasting effects on peripheral myelination of NGF-dependent and BDNF-dependent DRG neurons. *J Neurosci.* 2009; 29: 4016-4022. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3811-08.2009.

53.- Lewin SL, Utley DS, Cheng ET, Verity AN, Terris DJ. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope*. 1997; 107: 992-999. doi: 10.1097/00005537-199707000-00029.

54.- Triolo D, Dina G, Lorenzetti I, Malaguti M, Morana P, Del Carro U, et al. Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. *J Cell Sci*. 2006; 119: 3981-3993. doi: 10.1242/jcs.03168.