FERNANDO JOSÉ DIAS

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DA PROTEÍNA
PURIFICADA DO LÁTEX NATURAL (*Hevea brasiliensis*) SOBRE A
LESÃO POR ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS
WISTAR: ESTUDO MORFOLÓGICO, IMUNOHISTOQUÍMICO E
ULTRAESTRUTURAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

FERNANDO JOSÉ DIAS

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DA PROTEÍNA
PURIFICADA DO LÁTEX NATURAL (*Hevea brasiliensis*) SOBRE A
LESÃO POR ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS
WISTAR: ESTUDO MORFOLÓGICO, IMUNOHISTOQUÍMICO E
ULTRAESTRUTURAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Ii-sei Watanabe

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Dias, Fernando José.

Efeito do laser de baixa intensidade e da proteína purificada do látex natural (*Hevea brasiliensis*) sobre a lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos Wistar: Estudo morfológico, imunohistoquímico e ultraestrutural / Fernando José Dias. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Ii-sei Watanabe.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Análises morfológicas e ultraestruturais das lesões de nervos periféricos.

Versão do título para o inglês: Effect of low-level laser and the protein purified from natural latex (*Hevea brasiliensis*) on crush injury of the sciatic nerve in rats: Morphologic, immunohistochemical and ultrastructural study.

1. Traumatismos dos nervos periféricos 2. Terapia a laser de baixa intensidade 3. Hevea 4. Anatomia e histologia 5. Imunohistoquímica 6. Ultraestrutura I. Watanabe, Prof. Dr. Ii-sei II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0212/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernando José Dias.

Título da Tese: Efeito do laser de baixa intensidade e da proteína purificada do látex natural (*Hevea brasiliensis*) sobre a lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos Wistar: Estudo morfológico, imunohistoquímico e ultraestrutural.

Orientador(a): Prof. Dr. Ii-sei Watanabe.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **78** nas fls. **89** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Ii-Sei Watanabe**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeito do laser de baixa intensidade e da proteína purificada do látex natural (Hevea brasiliensis) sobre a lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos Wistar. Estudo morfológico, imunohistoquímico e ultraestrutural** do qual participam o(s) alunos **Fernando José Dias**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **13.08.2010, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 16 de agosto de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP

Aos meus pais, **Antonio de Jesus Dias** e **Maria Watanabe Dias**, pela educação e valores transmitidos.

À minha irmã, **Paula Elisa Dias**, pelo convívio, pela inteligência, e pelas salutares discussões de ideias que tanto me fez e faz crescer.

À **Ana Paula Amorim Barbosa**, pelo amor e carinho que me ajudaram durante essa etapa da minha vida.

À uma força a que me acostumei a chamar de **DEUS**, que me proporcionou alento nos momentos mais difíceis e não me deixou desistir pelo caminho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Mestre e Orientador, **Prof. Dr. li-sei Watanabe**, pelos conhecimentos, valores científicos, profissionais e pessoais transmitidos no decorrer desse projeto. Que me fizeram crescer em todos os sentidos como aluno de pós-graduação, acadêmico e principalmente como ser humano. Agradeço a atenção e o esforço incansavelmente dispensados nesse projeto e na minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, representada pelo seu Diretor **Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt** pela estrutura e apoio no desenvolvimento do projeto.

À **Profa. Dra. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela atenção e apoio.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, representada pelo seu diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros** em especial ao Departamento de Materiais Dentários e Prótese pelo apoio estrutural para desenvolvimento da parte experimental desse estudo.

À **Profa. Dra. Mamie Mizusaki Iyomasa**, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio, convívio, estrutura e conhecimentos fornecidos para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa**, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio, ajuda na elaboração desse projeto, estrutura e conhecimentos fornecidos para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto** (in memoriam) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela ajuda na elaboração desse projeto e fornecer a proteína do látex natural, tornando esse estudo possível.

À **Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan**, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo vasto conhecimento dividido sobre os estudos de nervos periféricos.

À **Profa. Dra. Selma Siéssere** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelos conhecimentos divididos sobre a técnica de imunohistoquímica e estrutura para as análises.

À **Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelos conhecimentos transmitidos sobre a técnica de imunohistoquímica, bem como da ajuda com os materiais para essas análises.

Aos especialistas de laboratório **Luiz Gustavo de Souza, Paulo Batista de Vasconcelos, Sonia Regina Yokomizo de Almeida, Adilson da S. Alves e Alfredo Duarte** pelo convívio, os conhecimentos técnicos e ajuda na elaboração e desenvolvimento desse trabalho.

Aos técnicos de laboratório **Sebastião Aparecido Boleta, Marta Maria da Silva Righetti e Kelly Patrícia Nery Borges, Edson Rocha de Oliveira, Nilce Oliveira Wolga, Tulio Roberto Vasconcelos de Paula Lopes e Ricardo de Souza Antunes** pelo convívio, conhecimentos técnicos e ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários **Patrícia Rodrigues de Campos Rocha, Luciana Monteiro Silva, Cristiane Vitor Pinheiro Maciel, Cláudio Roberto Celestino Júnior e Reginaldo Souza**, pela cordialidade, disponibilidade e atenção.

Aos colegas Pós-graduandos **Diego Pulzzato Cury, Ricardo Alexandre Junqueira Calzzani, Carlos Alexandre dos Santos Haemmerle, Bruna Gabriela dos Santos Kotake, Daniela Mizusaki Iyomasa, Eduardo Andrés Borie Echevarría, Rodrigo Restrepo Fernandez, Yamba Carla Lara Pereira, Miliane Gonçalves Gonzaga e Adriano Polican Ciena**, pelo convívio, auxílio, troca de experiências e pela paciência tão necessária em algumas ocasiões.

Às alunas de iniciação científica **Kenia Muniz e Vanessa Perreira Barreiros**, pelo trabalho e aprendizado compartilhado no desafio dos seus respectivos estudos.

A todos os **Professores** do curso de Doutorado, pela transmissão de conhecimentos que enriqueceram a minha formação.

Aos **animais** utilizados nesse estudo, que tiveram suas vidas tiradas para que esse trabalho pudesse ser realizado.

À **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, que concedeu fomento e possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

A todas as outras pessoas que não foram supramencionadas que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta tese de doutorado, expresso aqui minha gratidão.

“Se você quer praticar o mal, a ciência pode lhe prover as mais poderosas armas; mas igualmente, se você deseja fazer o bem, a ciência também lhe põe nas mãos as mais poderosas ferramentas.”

Richard Dawkins

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”

Albert Einstein

RESUMO

DIAS, F. J. **Efeito do laser de baixa intensidade e da proteína purificada do látex natural (*Hevea brasiliensis*) sobre a lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos Wistar: Estudo morfológico, imunohistoquímico e ultraestrutural.** 2013. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As lesões de nervos periféricos são comuns, afetando negativamente a qualidade de vida da população. Embora as fibras nervosas periféricas apresentem um potencial de regeneração considerável, a recuperação espontânea geralmente é fraca, especialmente quando as lesões afetam grandes nervos. Novas terapias e materiais têm ajudado na recuperação dessas injúrias, sendo que o laser de baixa intensidade (LBI) como o látex natural (*Hevea brasiliensis*) demonstraram resultados positivos. Esse estudo avaliou os efeitos do LBI e da proteína purificada do látex natural (proteína P1) sobre a lesão por esmagamento controlado (15kgf, 5,2 MPa, 10 min, axonotmese) do nervo isquiático de ratos *Wistar*. Foram utilizados 132 ratos *Wistar*, machos (200-250g), divididos em 6 grupos (n=22): GI - controle; GII - nervo exposto; GIII - nervo lesado sem tratamento; GIV - nervo lesado e irradiado com LBI (15J/cm², 780nm); GV - nervo lesado tratado com a P1 (0,1%); e GVI – nervo lesado tratado com a P1 (0,1%) e irradiado com LBI (15J/cm², 780nm). Após 4 e 8 semanas da lesão, os animais foram eutanasiados por sobre-dose anestésica ou por perfusão intra-cardíaca, dependendo da análise ao qual foram submetidos, tiveram o nervo isquiático esquerdo removido e processado para a análise pelos métodos de morfologia, quantificação histológica e morfometria ao microscópio de luz (*Suddan Black* e vermelho neutro), análise imunohistoquímica (VEGF e NGF), análise ao microscópio eletrônico de transmissão e de varredura de alta resolução. Os dados morfológicos, histológicos quantitativos, morfométricos e ultraestruturais revelam melhora com a aplicação dos tratamentos propostos em ambos os períodos de análise. Após 4 semanas não foi possível eleger o melhor tratamento e após 8 semanas os animais que receberam a proteína P1 associada ou não ao LBI apresentaram maior número de capilares, e fibras nervosas mais organizadas com melhor recuperação. Os fatores NGF e VEGF estavam com expressão aumentada principalmente após 4 semanas principalmente nos grupos III, IV e VI, na oitava semana as expressões não eram tão evidentes, porém foi notadas a recuperação nervosa e o aumento dos capilares. Conclui-se que os tratamentos com LBI e P1 resultaram em melhora na recuperação do nervo isquiático após 4 e 8 semanas da lesão nervosa. No período de 8 semanas as características dos grupos lesados foram mais similares aos grupos não lesados, revelando a tempo-dependência desse tipo de recuperação; além disso nesse mesmo período de análise os animais que receberam apenas a proteína P1 apresentaram melhores características, pois a aplicação apenas do LBI não alcançou os mesmos resultados, e a associação dos tratamentos não potencializou a recuperação, sugerindo assim que a melhora observada nesse caso se refere principalmente a ação da P1.

Palavras-Chave: Traumatismos dos Nervos Periféricos. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. *Hevea*. Anatomia & Histologia. Imunohistoquímica. Ultraestrutura.

ABSTRACT

DIAS, F. J. **Effect of low-level laser and the protein purified from natural latex (*Hevea brasiliensis*) on crush injury of the sciatic nerve in rats: Morphologic, immunohistochemical and ultrastructural study.** 2013. 153 p. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The peripheral nerve injuries are common, adversely affecting the quality of life. Although peripheral nerve fibers show a considerable potential for regeneration, spontaneous recovery is generally poor, particularly when large nerves were affected. New therapies and materials have helped in the recovery of these injuries, the low-level laser therapy (LLLT) and the natural latex (*Hevea brasiliensis*) showed positive recovery results. This study evaluated the effects of LLLT and the protein purified from natural latex (P1 protein) on the controlled crush injury (15 kgf , 5.2 MPa , 10 min, axonotmesis) of the sciatic nerve of rats. We used 132 male Wistar rats (200 - 250g) divided into 6 groups (n=22): GI. control; GII. exposed nerve; GIII. injured nerve without treatment; GIV. injured nerve irradiated with LLLT (15J/cm² , 780nm) ; GV - injured nerve treated with P1 (0.1 %) and GVI - injured nerve treated with P1 (0.1 %) and irradiated with LLLT (5J/cm², 780nm). After 4 or 8 weeks of injury, the animals were sacrificed by anesthesia overdose or intra-cardiac perfusion depending on which the subjected to analysis, the left sciatic nerve were removed and processed for analysis by the methods of morphology, histological quantification and morphometry upon light microscopy (Suddan Black and neutral red staining), immunohistochemistry (VEGF and NGF), analysis by transmission electron microscopy and high resolution scanning electron microscopy. Morphological, quantitative histological, morphometric and ultrastructural data show improvement after the application of proposed treatments in both periods. After 4 weeks was not possible to choose the best treatment and after 8 weeks, the animals receiving the P1 associated or not to LLLT had a greater number of capillaries, and nerve fibers more organized with better recovery. The NGF and VEGF factors were mainly with increased expression after 4 weeks of nerve damage in the groups III, IV and VI, in the eighth postoperative week these expressions were not evident, it were noted the nerve recovery and increase in the number of capillaries. It was concluded that the LLLT and P1 protocols resulted in an improvement in peripheral nerve recovery after 4 and 8 weeks nerve injury. At 8 weeks the characteristics of the injured groups were more similar to the uninjured groups, showing the time-dependency of this type of recovery and additionally this same period of analysis the animals that received only the P1 showed a better recovery, because the only application of LLLT not achieved the same results, and the association of the treatments have not enhanced recovery, suggesting that the improvement observed in this case refers mainly to the action of P1.

Keywords: Peripheral Nerve Injuries. Low-level laser therapy. Hevea. Anatomy & Histology. Immunohistochemistry. Ultrastructure.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de Variância);
ATP – Adenosina trifosfato;
AVC – Acidente vascular cerebral
BLN – Biomembrana do látex natural;
BSA – *Bovine Serum Albumine* (soro fetal bovino);
CPD – *Critical Point Dryer* (secagem em ponto crítico);
CW – *Continuous wave* (onda contínua);
DAB – Diaminobenzidina;
DMSO – Dimetilsulfóxido;
EM – Esclerose múltipla
GaAlAs – Arseneto de Gálio Alumínio;
GAP-43 – *Growth associated protein 43* (Proteína associada ao crescimento-43);
IgE – imunoglobulina E
J – Joule, unidade de energia mecânica (trabalho);
J/cm² – Joule por centímetro quadrado (medida de densidade de energia do LBI)
Kgf – quilograma força;
LASER – light amplification by stimulated emission of radiation;
LBI/LLLT - Laser de baixa intensidade/ low-level laser therapy;
M – Molar, unidade de concentração de substâncias;
MET - Microscopia eletrônica de transmissão;
MEV-AR – Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução;
mg – miligrama (10^{-3} gramas), unidade de massa;
mm – milímetro (10^{-3} metros), unidade de distância/tamanho;
MMP9 – Matrix metalloproteinase 9 (Metaloproteinase da Matriz 9);
MPa – Megapascal equivale a 10^6 pascal, unidade de pressão e tensão, 1 pascal equivale a força de 1 Newton aplicado sobre 1 m²;
mW – miliwatts (medida da potência do LBI);
NGF - *Nerve Growth Factor* (fator de crescimento de nervos);
nm – nanômetro (10^{-9} metros) unidade de distância/tamanho;
NT3 – neurotrofina-3;
°C – graus celsius, unidade de temperatura;
OTC – *Optimal cutting temperature compound* (composto de corte em ótima temperatura);
P1 – proteína purificada do látex natural;
PBS – Phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino);
pH – potencial hidrogeniônico;
PVC – *polyvinyl chloride* (Cloroeto de polivinila);
rhBMP-2 – *recombinant human bone morphogenetic protein 2* (proteína óssea morfogênica 2 recombinante humana);
ROS – *Reactive oxygen specimen* (Espécie reativa de oxigênio);
s – segundo, unidade de tempo;

SCD – *Sputtering coating device* (Aparelho de cobertura metálica);

SD – *Standard deviation* (desvio padrão);

SEM – *Standard error of the mean* (Erro padrão da média);

SNC - Sistema nervoso central;

SNP – Sistema nervoso periférico;

TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha* (Fatores de necrose tumoral alfa);

VEGF – *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento do endotélio vascular);

μ l – microlitro (10^{-6} litros), unidade de volume;

μ m – micrometro (10^{-6} metros), unidade de distância/tamanho;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lesão nervosa por esmagamento controlado.....	39
Figura 2 - Tratamentos aplicados após a lesão nervosa.....	41
Figura. 3 – Metodologia da quantificação histológica.....	44
Figura 4 – Esquema da Análise Morfométrica.....	45
Figura 5 – Microscopia de luz – (Grupos I e II) – 4 semanas.....	50
Figura 6 – Microscopia de luz – (Grupos III e IV) – 4 semanas.....	52
Figura 7 – Microscopia de luz – (Grupos V e VI) – 4 semanas.....	54
Figura 8 - Microscopia de luz – (Grupos I e II) – 8 semanas.....	56
Figura 9 – Microscopia de luz – (Grupos III e IV) – 8 semanas.....	58
Figura 10 – Microscopia de luz (Grupos V e VI) – 8 semanas.....	60
Figura 11 – Imunomarcacão do NGF, 4 semanas (Grupos I, II e III).....	72
Figura 12 – Imunomarcacão do NGF, 4 semanas (Grupos IV, V e VI)....	73
Figura 13 – Imunomarcacão do VEGF, 4 semanas.....	75
Figura 14 – Imunomarcacão do NGF, 8 semanas.....	77
Figura 15 – Imunomarcacão do VEGF, 8 semanas.....	79
Figura 16 – Imunohistoquímica, controle negativo.....	80
Figura 17 – MEV-AR – Grupo I, controle - 4 semanas.....	81
Figura 18 – MEV-AR - Grupo II, exposto - 4 semanas.....	82
Figura 19 – MEV-AR - Grupo III, lesado - 4 semanas.....	83
Figura 20 – MEV-AR - Grupo IV, LBI - 4 semanas.....	84
Figura 21 – MEV-AR - Grupo V, proteína P1 - 4 semanas.....	85
Figura 22 – MEV-AR - Grupo VI, LBI e proteína P1 - 4 semanas.....	87
Figura 23 – MEV-AR - Grupo I, controle - 8 semanas.....	88
Figura 24 – MEV-AR - Grupo II, exposto - 8 semanas.....	89
Figura 25 – MEV-AR - Grupo III, lesado - 8 semanas.....	90
Figura 26 – MEV-AR - Grupo IV, LBI - 8 semanas.....	92
Figura 27 – MEV-AR - Grupo V, proteína P1 - 8 semanas.....	93
Figura 28 – MEV-AR – Grupo VI, LBI e proteína P1 - 8 semanas.....	95
Figura 29 – MET - Grupo I, controle - 4 semanas.....	97
Figura 30 – MET - Grupo II, exposto - 4 semanas.....	98
Figura 31 – MET - Grupo III, lesado - 4 semanas.....	100
Figura 32 – MET - Grupo IV, LBI - 4 semanas.....	101
Figura 33 – MET - Grupo V, proteína P1 - 4 semanas.....	103
Figura 34 – MET - Grupo VI, LBI e proteína P1 - 4 semanas.....	104
Figura 35 – MET - Grupo I, controle - 8 semanas.....	106
Figura 36 – MET - Grupo II, exposto - 8 semanas.....	107
Figura 37 – MET - Grupo III, lesado - 8 semanas.....	109
Figura 38 – MET - Grupo IV, LBI - 8 semanas.....	110
Figura 39 - MET - Grupo V, proteína P1- 8 semanas.....	111
Figura 40 – MET - Grupo VI (LBI e proteína P1), 8 semanas.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de irradiação do laser de baixa intensidade.....	40
Tabela 2 – Quantificação do nervo isquiático 4 semanas pós-lesão nervosa.....	61
Tabela 3 – Quantificação do nervo isquiático 8 semanas pós-lesão nervosa.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Razão Área de Mielina/área do nervo, 4 semanas após a lesão.....	62
Gráfico 2 – Densidade Capilar, 4 semanas após a lesão.....	62
Gráfico 3 – Razão Área de Mielina/área do nervo, 8 semanas após a lesão.....	63
Gráfico 4 – Densidade Capilar, 8 semanas após e lesão.....	64
Gráfico 5 – Diâmetro máximo das fibras nervosas 4 semanas após a lesão.....	65
Gráfico 6 – Diâmetro mínimo das fibras nervosas 4 semanas após a lesão.....	65
Gráfico 7 – Diâmetro dos axônios – 4 semanas após a lesão.....	66
Gráfico 8 – Razão-G 4 semanas após a lesão.....	67
Gráfico 9 – Espessura da bainha de Mielina 4 semanas após a lesão....	67
Gráfico 10 – Diâmetro máximo das fibras nervosas 8 semanas após a lesão.....	68
Gráfico 11 – Diâmetro mínimo das fibras nervosas 8 semanas após a lesão.....	68
Gráfico 12 – Diâmetro Axonal – 8 semanas após a lesão.....	69
Gráfico 13 – Razão-G 8 semanas após a lesão.....	70
Gráfico 14 – Espessura da bainha de Mielina 8 semanas após a lesão..	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Nervos periféricos	19
1.2 Laser de baixa intensidade (LBI)	25
1.3 Látex natural (<i>Hevea brasiliensis</i>)	28
1.4 Associação da laserterapia com o látex natural.....	32
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 MATERIAL E MÉTODO	37
4.1 Animais.....	38
4.2 Obtenção da lesão nervosa	38
4.3 Irradiação com laser de baixa intensidade	40
4.4 Látex natural (<i>Hevea brasiliensis</i>)	40
4.5 Grupos experimentais – Descrição dos protocolos realizados.....	41
4.6 Coleta e processamento do material.....	42
4.6.1 Microscopia de luz.....	42
4.6.2 Análise dos resultados da microscopia de luz.....	43
4.6.3 Análise Morfológica Qualitativa.....	43
4.6.4 Análise Histológica Quantitativa.....	43
4.6.5 Análise Morfométrica.....	45
4.7 Imunohistoquímica - Peroxidase	45
4.7.1 Criopreservação.....	45
4.7.2 Reação Imunohistoquímica – anti-NGF e anti-VEGF.....	46
4.8 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-AR).....	46
4.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	47
4.10 Análise estatística.....	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Análise morfológica - Microscopia de Luz.....	50
5.1.1 Análise morfológica - 4 semanas após a lesão nervosa.....	50
5.1.2 Análise morfológica - 8 semanas após a lesão nervosa.....	56
5.2 Análise histológica quantitativa das fibras nervosas	61
5.2.1 Grupo Experimental - 4 semanas após a lesão nervosa.....	61

5.2.2 Grupo Experimental - 8 semanas após a lesão nervosa.....	63
5.3 Análise Morfométrica das Fibras Nervosas	64
5.3.1 Grupo Experimental - 4 semanas após a lesão nervosa.....	65
5.3.2 Grupo Experimental - 8 semanas após a lesão nervosa.....	68
5.4. Reação Imunohistoquímica – Anticorpos: anti-NGF e anti-VEGF	71
5.4.1 Grupo Experimental - 4 semanas após a lesão nervosa.....	71
5.4.2 Grupos Experimentais - 8 semanas após a lesão nervosa.....	76
5.4.3 Controle negativo das reações de imunohistoquímica.....	80
5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução – MEV-AR.....	81
5.5.1 Grupos experimentais analisados 4 semanas após a lesão nervosa	81
5.5.2 Grupos experimentais analisados 8 semanas após a lesão nervosa	88
5.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão	97
5.6.1 Grupos experimentais analisados 4 semanas após a lesão nervosa	97
5.6.2 Grupos Experimentais Analisados 8 semanas após a lesão nervosa	106
6 DISCUSSÃO	115
6.1 Análise morfológica, quantitativa e morfométrica	116
6.2 NGF – Fator de crescimento de nervo.....	120
6.3 VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular	122
6.4 Análise tridimensional da superfície – microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-AR)	123
6.5 Análise ultraestrutural – microscopia eletrônica de transmissão (MET)	125
6.6 Considerações Finais.....	128
7 CONCLUSÃO.....	129
REFERÊNCIAS	131
APÊNDICE	142
Apêndice – Artigo referente à presente tese publicado na revista “Biomed Research International”	143

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nervos periféricos

Os nervos periféricos são prolongamentos de numerosos neurônios localizados nas colunas da medula espinal e gânglios nervosos. Esses prolongamentos podem se estender por distâncias que medem milhares de vezes o diâmetro de seu corpo celular. Devido às atividades metabólicas situadas no corpo celular, as porções axonais periféricas são dependentes da continuidade e integridade da porção central (LUNDBORG, 1987). Os nervos constituem a parte principal do sistema nervoso periférico (SNP) e são formados por fascículos de fibras nervosas mielínicas e amielínicas além de um arcabouço do estroma conjuntivo (RAIMONDO et al., 2011). Essas estruturas são compostas por porções motoras, sensitivas e autônomas que dependem da sua localização, contendo um ou vários fascículos envolvidos pelo epineuro, o perineuro envolve os feixes de fibras e o endoneuro cada fibra nervosa. Esses envoltórios de conjuntivo permitem a expansão e contração do comprimento do nervo frequentemente observado nos movimentos das extremidades e podem ser utilizados no reparo nervoso (EVANS, 2001).

O nervo isquiático em ratos origina-se no plexo sacral e se divide em ramos que inervam músculos do membro pélvico (pata traseira), envolvida na flexão e extensão do joelho e na movimentação da articulação do tornozelo. Vários testes motores e métodos observacionais foram desenvolvidos, e podem ser usados para avaliar a recuperação funcional dos nervos periféricos. Em situações clínicas, frequentemente os nervos afetados são mistos, tornando assim o nervo isquiático um excelente modelo para estudo da complexidade da reinervação motora e sensorial (IJKEMA-PAASSEN et al., 2004). O nervo isquiático de ratos é o modelo mais utilizado para estudar a lesão dos nervos periféricos também devido à sua acessibilidade e tamanho vantajosos (WOOD et al., 2011).

As lesões de nervos periféricos são comuns e geralmente não representam uma ameaça para a vida do paciente. No entanto, essas injúrias têm forte impacto negativo na qualidade de vida da população, podendo resultar em paralisia, anestesia, falta de controle das áreas afetadas e neuropatia dolorosa. Por esses motivos essas lesões representa um dos principais alvos da medicina atualmente. Embora as fibras nervosas periféricas apresentem um potencial de regeneração considerável, a recuperação espontânea geralmente é pobre podendo deixar sequelas, especialmente em caso de defeitos em grandes nervos (KIM, J. et al.,

2013¹; LI et al., 2013²; MARTINEZ DE ALBORNOZ et al., 2011; RAIMONDO et al., 2011; XIAO; TSUTSUI, 2013). Além disso, as lesões de nervos periféricos são muito mais frequentes do que as lesões na medula espinal, o que também contribui para o desenvolvimento de pesquisas básicas e clínicas sobre a reparação e regeneração nervosa (RAIMONDO et al., 2011).

Aproximadamente 5% das complicações relacionadas às feridas abertas em extremidades ocasionadas por acidentes esportivos e automobilísticos, envolvem trauma de nervos periféricos (IJKEMA-PAASSEN et al., 2004). Em 1995 segundo a *National Center for Health Statistics* foram realizados 50.000 reparos de nervos periféricos (EVANS, 2001). Sabe-se que trinta por cento dessas lesões surgem de lacerações e fraturas de ossos longos, e o restante se originaram de lesões penetrantes, esmagamento, isquemia, tração, choques elétricos e vibração. Cerca de 100.000 pacientes são submetidos à cirurgia para recuperação de nervos periféricos nos E.U.A. e na Europa anualmente. (MARTINEZ DE ALBORNOZ et al., 2011). Em um estudo recente Li et al. (2013)² relatam que nos países desenvolvidos entre 13 e 23 por 100 mil pessoas sofrem lesões de nervos periféricos por ano.

Devido à alta incidência dessas lesões a compreensão dos mecanismos de regeneração axonal e melhorar a sua recuperação pós-lesão tem sido uma busca antiga da neurociência e da comunidade médica. Axônios periféricos lesados contam com uma forte resposta regenerativa, e a recuperação funcional em humanos é possível, embora ela seja limitada pela longa distância que os axônios periféricos normalmente precisam crescer (FERGUSON; SON, 2011).

No sistema nervoso central (SNC) as células nervosas apresentam maiores dificuldades de sobrevivência e de regeneração após uma lesão em comparação ao SNP. Pois o meio dos axônios lesados no SNP pode ser mais favorável ao seu crescimento do que aquele encontrado pelos axônios do SNC (COTE et al., 2011). Dificilmente a regeneração axonal no SNC será solucionada sem que primeiro haja uma compreensão dos mecanismos da regeneração bem sucedida dos nervos

¹ KIM, J. R.; OH, S. H.; KWON, G. B.; NAMGUNG, U.; SONG, K. S.; JEON, B. H.; LEE J. H. Acceleration of Peripheral Nerve Regeneration Through Asymmetrically Porous Nerve Guide Conduit Applied with Biological/Physical Stimulation. **Tissue Eng. Part A.**, 2013.

² LI, R.; LIU, Z.; PAN, Y.; CHEN, L.; ZHANG, Z.; LU, L. Peripheral Nerve Injuries Treatment: a Systematic Review. **Cell Biochem. Biophys.**, 2013.

periféricos. Assim, a compreensão da regeneração dos nervos periféricos é de interesse básico e clínico e pode fornecer dados que ajudem inclusive na compreensão das lesões no SNC (KIRYU-SEO; KIYAMA, 2011).

Recentemente o conhecimento dos fatores que influenciam a regeneração nervosa cresceu, novas técnicas cirúrgicas e materiais para esse fim têm sido desenvolvidos. Porém os resultados funcionais ainda são desapontadores, revelando a necessidade do aperfeiçoamento das intervenções terapêuticas (IJKEMA-PAASSEN et al., 2004). O tratamento dessas lesões nervosas continua a ser um grande desafio. Apesar dos avanços na compreensão da regeneração nervosa em técnicas microcirúrgicas, a recuperação funcional no período pós-operatório se mantém insatisfatórios (LI et al., 2013²; MEEK; VAREJÃO; GEUNA, 2004; SHEN; YANG; LIU, 2011; XIAO; TSUTSUI, 2013).

Frente a esse quadro, existe a necessidade de pesquisas integradas, que vão além das estratégias terapêuticas com base em uma única abordagem, normalmente cirúrgica, além da importância de reunir disciplinas complementares que possam contribuir para a definição de novas estratégias eficazes que auxiliem na regeneração do nervo periférico lesado (RAIMONDO et al., 2011).

As lesões aos nervos periféricos podem ser classificadas como 1. neuropraxia, resultante de uma pressão leve com pouca perda motora e sensorial, sem mudanças estruturais; 2. axonotmese, perda de continuidade das fibras nervosas e subsequente degeneração axonal *Walleriana* do segmento distal sem perder células de *Schwann* e mantendo as camadas envoltórias (peri e epineuro), a recuperação desse tipo de lesão irá depender do grau de desorganização e também da distância lesada; e 3. neurotmese, secção completa do nervo com desorganização axonal causada por uma fibrose tecidual além da degeneração nervosa proximal e distal (GOMES; DALMARCO; ANDRÉ, 2012; WOOD et al., 2011).

Em relação aos modelos experimentais de lesão, os nervos periféricos podem ser severamente comprometidos como consequência de trauma mecânico. O esmagamento de um nervo geralmente não leva a descontinuidade, embora essa intervenção influencie diretamente os axônios, os órgãos inervados e a árvore dendrítica do motoneurônio (IJKEMA-PAASSEN et al., 2004). Esse modelo experimental se mostra vantajoso por não envolver variáveis relacionadas à secção seguida da sutura do nevo, porém a dificuldade nesse caso está na variedade de

formas de esmagamento (PACHIONI, 2006). Esse tipo de lesão nervosa induzida experimentalmente é um comum e normalmente resulta em axonotome, com a interrupção axonal e preservação das bainhas conjuntivas (DUBOVÝ, 2011).

As lesões dos nervos periféricos desencadeiam uma sequência de respostas moleculares, celulares, e ultraestruturais que são fundamentais para o sucesso do programa regenerativo associado ao crescimento do neurito (projeção da célula nervosa em desenvolvimento), a reinervação do alvo desnervado e recuperação da função (PATODIA; RAIVICH, 2012).

As neurotrofinas (NT-3, 4 e 5) e fatores neurotróficos (Fator de crescimento neural - NGF, fator de crescimento derivado do cérebro – BDNF) regulam criticamente a sobrevivência, o desenvolvimento, a diferenciação e a regeneração neuronal. Embora os fatores neurotróficos possam ser produzidos espontaneamente após a lesão do tipo axonotmese, sabe-se que a regeneração completa do nervo depende das condições tróficas altamente favoráveis para a síntese de proteína neuronal e a expressões desses fatores (FERGUSON; SON, 2011; GOMES; DALMARCO; ANDRÉ, 2012).

O NGF é um fator neurotrófico secretado pelas células de *Schwann* após lesão nervosa, após 3 semanas os seus níveis diminuem. Uma elevada concentração de NGF *in vitro* com baixa ligação cruzada e liberação controlada por meio de conduítes nervosos tornou possível conectar um defeito de 15 mm no nervo isquiático de ratos (CHANG et al., 2009). No entanto os tratamentos com Neurotrofina-3 (NT3) ou NGF aplicados sobre o nervo isquiático submetido à ressecção, não aumentaram significativamente a recuperação motora, avaliado pela análise de marcha. Após 12 semanas de testes comportamentais, não houve diferença na recuperação motora. Os nervos regenerados de animais tratados com NT3 apresentavam um leve aumento no número de axônios em comparação aos animais controle e tratados com NGF (YOUNG et al., 2001).

A degeneração *Walleriana* é uma das reações mais elementares do SNP, se iniciando quando a continuidade da fibra nervosa é interrompida por traumas tóxicos, eventos isquêmicos ou metabólicos. A lesão axonal desencadeia uma cascata de acontecimentos incluindo, a ruptura da barreira de hemato-nervosa, proliferação de células de *Schwann*, recrutamento de macrófagos circulantes, a reorganização do espaço endoneural e mudanças nos componentes da matriz extracelular do

endoneuro, além da elevação da produção de neurotrofinas e citocinas (DUBOVÝ, 2011).

A regeneração *Walleriana* após o esmagamento do nervo é um processo lento, porém, mais rápido que a regeneração após a desconexão total do nervo (neurotmeze) incluindo as bainhas conjuntivas. A regeneração axonal é geralmente bem sucedida após este tipo de dano. Após um curto período de latência (1 a 2 dias) para atravessar o local da lesão, os axônios se regeneraram a uma taxa constante ao longo do segmento distal do nervo. Eles são ajudados pelas células de *Schwann* reativas e os tubos do endoneuro preservados que melhoram o alongamento axonal e facilitam a reinervação adequada do alvo e a recuperação funcional. (DUBOVÝ, 2011).

No século passado, muito se aprendeu sobre a fisiopatologia dos nervos periféricos. Já foi considerado que uma vez danificado, o tecido nervoso não seria capaz de se regenerar pela falta de células-tronco. Recentes descobertas revelam que o tecido nervoso contém células-tronco sendo dessa forma mais dinâmico do que o esperado; esses fatos levaram a novos caminhos terapêuticos com base em abordagens da medicina regenerativa (BINAN et al., 2013³). Nesse contexto as abordagens não cirúrgicas têm sido desenvolvidas para melhorar essa recuperação e servindo também como um complemento para o processo de reinervação (MARTINEZ DE ALBORNOZ et al., 2011).

Atualmente é extremamente importante a realização de mais pesquisas que se esforcem para alcançar um novo nível de inovação, reunindo disciplinas diferentes do nível básico ao clínico. Os recentes avanços científicos têm apontado claramente que a reparação e regeneração dos nervos periféricos não podem ser tratadas apenas como uma questão de reconstrução cirúrgica, devendo ser abordada a partir de múltiplos pontos de vista e de maneira interdisciplinar (RAIMONDO et al., 2011).

As pesquisas atuais estão amplamente focadas nas novas abordagens para o tratamento de lesões de nervos periféricos. Quaisquer tratamentos terapêuticos que acelerem a regeneração axonal pode melhorar a recuperação funcional (LI et al., 2013²). Outras metodologias não cirúrgicas comumente estudadas incluem a irradiação com laser de baixa intensidade e a aplicação de fatores de crescimento

³ BINAN, L.; AJJI, A.; de CRESCENZO, G.; JOLICOEUR, M. Approaches for Neural Tissue Regeneration. **Stem Cell Rev.**, 2013.

(ROVAK et al., 2004). Alguns sistemas de estimulação, estímulos biológicos (fatores de crescimento, células de *Schwann*), e os estímulos físicos (laser, eletricidade, ultrassom) revelaram resultados encorajadores na recuperação de nervos periféricos (KIM, J. et al., 2013¹).

As células de *Schwann* são células gliais responsáveis por envolver as fibras nervosas do SNP e formar as bainhas de mielina facilitando a rápida condução do potencial de ação ao longo dos axônios no sistema nervoso. Essas células plásticas extraordinárias são cruciais para o funcionamento normal e o reparo do nervo. As células de *Schwann* constituem 90% das células nucleadas dentro nervos periféricos. Elas fornecem suporte trófico para o desenvolvimento, maturação, e regeneração dos axônios. Além disso, a lâmina basal produzida por esta célula envolve os axônios, e os seus componentes suportam o crescimento axonal. Imediatamente após a injúria do nervo periférico, as células de *Schwann* na região distal começam a se diferenciar. As células de *Schwann* mielinizadoras associadas com axônios respondem às injúrias, mesmo antes de degeneração axonal ocorrer, por alterar a expressão gênica. As células de *Schwann* mielinizadoras e embainhadoras se dividem, atingindo o pico de proliferação em torno de 4 dias após a lesão (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011; GLENN; TALBOT 2013).

As doenças que levam a perda da mielina aparecem em muitas formas, das quais a esclerose múltipla (EM) é a mais prevalente em adultos jovens, afeta aproximadamente 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo (HUANG et al., 2011). A EM é uma doença crônica que resulta na destruição direcionada da mielina no SNC, ela apresenta tipicamente na forma surto/remissão, com remielinização e recuperação funcional após episódios agudos de desmielinização. A remielinização é o processo regenerativo no qual as bainhas de mielina novas são restauradas nos axônios após a desmielinização patológica. Pensava-se que o benefício de remielinização era apenas a restauração da condução saltatória e, portanto, a restauração da função perdida. Atualmente sabe-se que a manutenção da integridade axonal também depende das bainhas de mielina (ACOSTA et al., 2013⁴; FANCY et al., 2012). Enquanto ainda não existem terapias que melhorem a

⁴ ACOSTA, C. M.; CORTES, C.; MACPHEE, H.; NAMAKA, M. P. Exploring the Role of Nerve Growth Factor in Multiple Sclerosis: Implications in Myelin Repair. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets.**, 2013.

remielinização, a investigação nesta área está se desenvolvendo com foco em duas abordagens principais: transplante de células exógenas e estimulação do processo de reparação endógena (CRAWFORD; CHAMBERS; FRANKLIN, 2013).

1.2 Laser de baixa intensidade (LBI)

O LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) é uma energia formada por fótons com propriedades específicas, caracterizada como uma onda eletromagnética com comprimento de onda, direção, frequência e cor únicos, esses aspectos conferem a essa luz as propriedades de monocromaticidade, colimação e coerência (GOODMAN; KAUFMAN, 1977; MAIMAN, 1960).

Os lasers são capazes de levar grande quantidade de energia aos tecidos biológicos, com extrema precisão, caracterizada como uma radiação altamente concentrada, podendo resultar em efeitos térmicos, fotoquímicos e não lineares. O laser de baixa intensidade (LBI) é uma forma de energia não ionizante, não invasiva e bem tolerada pelo organismo, sem efeitos mutagênicos (BRUGNERA-JR; PINHEIRO, 1998).

O uso do laser cresceu desde a década de 60 nas áreas da saúde exigindo que esse complemento terapêutico seja mais estudado e compreendido na prática clínica (BAXTER, 1997; MIYASHITA; FONSECA, 2004), pois o conhecimento básico de seu funcionamento ainda é muito escasso por parte dos profissionais da área da saúde, principalmente aqueles que não foram treinados especificamente (BRUGNERA-JR; PINHEIRO, 1998).

Existe um considerável ceticismo sobre o conceito de fotomodulação na comunidade médica, pois a eficácia da bioestimulação dos lasers ainda não foi demonstrada sem equívocos com experimentos clínicos propriamente controlados, devido à falta de mecanismos experimentalmente suportáveis para comprovar os seus efeitos fotobiomodulatórios (YU et al., 1997).

Inicialmente o laser de baixa intensidade (LBI) era utilizado principalmente para recuperação de lesões e alívio da dor. As aplicações médicas foram ampliadas incluindo o tratamento de doenças como AVC, infarto do miocárdio, distúrbios degenerativos e traumas nervosos. Os mecanismos exatos de ação do laser terapêutico ainda não foram inteiramente elucidados. Acredita-se que a energia absorvida pelo organismo atinge as mitocôndrias, que agem como fotorreceptoras,

levando ao aumento do ATP, do ROS, do cálcio intracelular, e da liberação de óxido nítrico, e assim ativando fatores transcripcionais que elevam a expressão de muitos produtos protetores, anti-apoptóticos, antioxidantes e proliferativos (HASHMI et al., 2010).

Muitos estudos realizados em animais e humanos com a terapia de LBI indicam a sua relevância para a neurologia no tratamento de AVCs, injúrias traumáticas do cérebro, doenças degenerativas cerebrais, injúrias da medula espinal e a regeneração de nervos periféricos (HASHMI et al., 2010). O LBI por meio dos seus efeitos fotoquímicos e fotobiológicos produzidos no nível celular pode induzir tanto condições tróficas como a inibição do processo inflamatório que é necessário para a regeneração nervosa (GOMES; DALMARCO; ANDRÉ, 2012). Estudos revelam que o LBI melhora o crescimento de neuritos, a produção de ATP, expressão gênica e secreção de fatores neurais (YAZDANI et al., 2012).

Alguns exemplos desses estudos mostraram que sobre o nervo isquiático de ratos lesado por compressão a irradiação com o LBI (GaAIs, 660 nm; 4 J/cm²; 26,3 mW) melhorou a recuperação funcional e histopatológica (BELCHIOR et al., 2009). Em outro protocolo de irradiação a laser que comparou dois comprimentos de onda (660 nm e 830 nm) em diferentes períodos (7,14 e 21 dias) a recuperação funcional foi diferente no após 14 dias utilizando 660nm, sendo esse protocolo mais eficaz na recuperação dos axônios lesados (BARBOSA et al., 2010). O nervo isquiático de ratos submetido à neurotmeze e irradiado (660 nm, 4 J/cm²; 26,3 mW) mostrou melhora morfológica pela avaliação da área da bainha de mielina, mas não resultou em recuperação funcional (DOS REIS et al. 2009). Shin et al. (2003) mostraram que sobre nervo isquiático de ratos lesado por um esmagamento padronizado, resultando em uma axonotmeze parcial, o LBI (650 nm, 5 mW) antecipou a melhora funcional e elevou os níveis da proteínas associada ao crescimento 43 (GAP-43), proteína essa que se apresenta elevada em casos de regeneração neuronal.

O nervo isquiático de ratos submetido à ressecção de 5 mm e unido por um neurotubo de ácido poliglicólico e irradiado com o LBI (780 nm, 200 mW, área lesada e medula espinal) revelou melhora nas respostas somato-sensoriais voluntárias positivas, no índice funcional do isquiático e os nervos se reconectaram. Nos casos irradiados houve um aumento no número total de axônios mielinizados (ROCHKIND et al., 2007a). Em coelhos o nervo alveolar inferior submetidos à ressecção de 6 mm

unidos com um tubo (*GoreTex*), submetido a 10 irradiações (6 J/cm^2 , 820-830 nm) revelou aumento da densidade axonal (MILORO et al., 2002).

Em ratos, o LBI (1589 J/cm^2 , 810 nm e 150 mW) aplicado sobre lesões de hemissecção e contusão da medula espinal, revelou recuperação da injúria pelo aumento significativo do número de axônios, da distância e do comprimento médio de rebrotamento axonal, além dos aspectos funcionais retornando aos níveis basais, suprimindo a ativação de células imunes e a expressão da citocina/quimiocina (BYRNES et al., 2005; WU et al., 2009).

O LBI (904nm) sobre o nervo isquiático de ratos submetido a uma neuropraxia com uma pinça hemostática revelou, na análise histológica, o aumento no número de neurônios, das células de *Schwann* e de axônios mielínicos de grande diâmetro (CÂMARA et al., 2011).

Em culturas celulares a irradiação com o laser (810 nm, 50 mW – 1 e 4 J/cm^2) estimulou a proliferação das células de *Schwann*, além de aumentar a expressão do NGF, mostrando que as células de *Schwann* sofrem influencia do LBI (YAZDANI et al., 2012).

Sobre o nervo isquiático seccionado a aplicação do LBI (880 nm, 50 J/cm^2) revelou maiores valores de densidade de fibras nervosas em comparação ao controle. Os diâmetros axonais dessas fibras também foram maiores nos animais irradiados (660 nm e 50 J/cm^2) em comparação ao grupo controle, indicando que o laser é capaz de proporcionar a recuperação funcional da marcha e melhora de parâmetros morfométricos após a neurotinese (MEDALHA et al., 2012).

O LBI associado ao transplante de células tronco mesenquimais revelou os melhores resultados em relação à recuperação funcional na lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos em comparação com os tratamentos separados (YANG et al., 2013⁵).

Em uma lesão aguda do nervo isquiático (analisado após 3 dias do esmagamento) a aplicação do LBI (60 J/cm^2 , 660 nm, 40 mW) aumentou a atividade da MMP-9, da proteína TNF- α moduladora da inflamação podendo, dessa forma, ajudar na recuperação nervosa após o esmagamento (ALCANTRA et al., 2013).

⁵ YANG, C. C.; WANG, J.; CHEN, S. C.; HSIEH, Y. L. Synergistic effects of low-level laser and mesenchymal stem cells on functional recovery in rats with crushed sciatic nerves. **J. Tissue. Eng Regen Med.**, 2013.

Em outro estudo dois comprimentos de onda do LBI (660 e 780 nm) foram aplicados de maneira transcutânea sobre o nervo isquiático esmagados de ratos. O LBI de 660 nm com as densidades de 10 e 60 J/cm² restauraram a fibra muscular, a bainha de mielina e a área de secção transversa do nervo em comparação com o grupo controle. O LBI de 780 nm também restaurou os níveis normais de mielina e área de secção transversa da fibra nervosa, porém não preveniu a atrofia muscular, assim o LBI de 660 nm com densidade de energia baixa (10 J/cm²) e moderada (60 J/cm²) foi capaz de acelerar a recuperação após o esmagamento do nervo em ratos (GIGO-BENATO et al., 2011).

A fototerapia mantém atividade funcional do nervo lesionado por um longo período, diminui a formação de tecido cicatricial no local da lesão, diminui a degeneração em neurônios motores correspondentes da medula espinal e aumenta significativamente o crescimento axonal e a mielinização (ROCHKIND et al., 2009).

As pesquisas clínicas associando o LBI à regeneração nervosa revelam resultados positivos dessa terapia sobre a síndrome do túnel carpal, caracterizada pelo aprisionamento do nervo mediano no punho. A irradiação nesses casos mostrou uma melhora geral nos parâmetros subjetivos, exceto para a fraqueza muscular. Porém, esses resultados não foram tão satisfatórios como nos casos de cirurgia (ELWAKIL; ELAZZAZI; SHOKEIR, 2007). Os pacientes também reportaram melhoras na escala analógica visuais sobre os sintomas, além de melhoras funcionais (CHANG et al., 2008). Um estudo duplo-cego, avaliando o LBI (780 nm, 250 mW) sobre lesões nervosas de mais de 6 meses, revelou que a irradiação (450 J/mm²) do nervo periférico lesado e do segmento correspondente da medula espinal (300 J/mm²) culminou no aumento da função motora e do recrutamento dos músculos voluntários, porém não foram observadas melhoras da função sensorial (ROCHKIND et al., 2007b).

1.3 Látex natural (*Hevea brasiliensis*)

Na década de 90, desenvolveu-se um novo material biocompatível extraído da árvore *Hevea brasiliensis* (seringueira) no Laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (MRUÉ, 1996). Esse novo biomaterial foi efetivo em vários estudos regenerativos realizados em animais e também em estudos

clínicos com humanos. Esse potencial regenerativo tem motivado novas pesquisas, em especial no tecido nervoso no qual esse material foi pouco testado (GANGA et al., 2012).

Inicialmente esse material foi utilizado na forma de uma biomembrana, a biomembrana de látex natural (BLN). Para a sua obtenção o látex natural advindo da seringueira, era centrifugado para reduzir as proteínas presentes, muitas delas potenciais alérgenos. A BLN apresentava estrutura similar à membrana celular e é quimicamente produzida pela indução da polimerização do poliisopreno endógeno, em que se preserva a conformação nativa das proteinases, permitindo uma reorganização dos fosfolipídeos e proteínas contidas no látex. O cuidado especial tomado durante a polimerização fez com que a membrana adquirisse uma micro-arquitetura particular, com uma superfície natural, que permite a aderência celular e estimula diferentes tipos celulares. A BLN pode ser fabricada em forma de lâmina (sendo utilizada como um curativo) ou em muitos outros formatos, como próteses preparadas para moldes especiais (ALVES DE SOUSA et al., 2007).

Vários estudos demonstram resultados promissores com o uso da BLN, tais como: estímulo à angiogênese, adesão celular e formação de matriz extracelular, promoção da substituição e regeneração do tecido, aceleração da cicatrização de lesões em tecido cutâneo, pericárdio, esôfago, parede abdominal, tímpano, vasos sanguíneos e no conjuntivo dos olhos, sem produzir sinais de hipersensibilidade (BALABANIAN et al., 2006).

Em estudos com animais, a BLN apresentou resultados satisfatórios na região subcutânea da parede abdominal ventral de cães, levando à recuperação do tecido hospedeiro, sem qualquer sinal de fibrose ou rejeição. A BLN também foi estudada em um modelo de úlcera cutânea na orelha de coelho, revelando melhora no reparo do tecido, comparável à cura fisiológica (MRUÉ et al., 2004). Como uma prótese em inguinoplastia laparotômica em cães, a BLN não apresentou processos infecciosos, obstrução ou fístula intestinal, além de boa acomodação e incorporação o que demonstra a biocompatibilidade do látex (ANDRADE et al., 2009). No alvéolo dental de ratos, pós-exodontia, o látex foi biocompatível e mostrando progressiva integração no osso alveolar, acelerando a formação óssea, e assim desempenhando um papel importante na cicatrização (BALABANIAN et al., 2006). Na ampliação vesical em coelhos, a BLN levou à uma neoformação progressiva de todos os

componentes da parede da bexiga, promovendo regeneração do epitélio e do músculo, sem perda urinária pós-operatória, e com baixa formação de cálculos (DOMINGOS et al., 2009).

As cicatrizações obtidas em camundongos com a biomembrana de látex natural (BLN) pelos métodos imunohistológicos revela que a BLN estimulou os estágios da cicatrização, especialmente a fase inflamatória, recrutando leucócitos para a região lesada e estimulando o estresse oxidativo. Estes fatores parecem se relacionar a forte angiogênese e fibroplasia, estimulados pela BLN na fase de proliferação e formação tecidual (ANDRADE et al., 2011).

A BLN foi testada quanto à segurança no desencadeamento de resposta de hipersensibilidade em pacientes com úlceras cutâneas por meio do “*patch test*”. Os resultados epidemiológicos e de hipersensibilidade ao látex e IgE específica mostraram que a biomembrana foi segura como curativo, não induzindo reações de hipersensibilidade nos pacientes do estudo (FRADE et al., 2011). A BLN foi utilizada para o tratamento de úlceras cutâneas em pacientes, e avaliado foto-clinicamente por 120 dias utilizando o software “*ImageJ*”. Os achados clínicos e histopatológicos sugerem que a biomembrana do látex natural atuou como um fator indutor da cicatrização, especialmente na fase inflamatória, confirmada pela presença abundante de exsudato nas lesões, promovendo a transformação do microambiente das úlceras venosas crônicas e estimulando a angiogênese e a posterior reepitelização (FRADE et al, 2012).

O aumento na permeabilidade vascular e na angiogênese são eventos cruciais para o reparo de feridas, crescimento tumoral e revascularização de tecidos submetidos à isquemia. O aumento da permeabilidade vascular permite que uma variedade de citocinas e fatores de crescimento alcance o tecido lesado. A angiogênese supre os tecidos com uma ampla variedade de nutrientes e também é importante na liberação dos metabólitos. O látex da *Hevea brasiliensis* tem demonstrado propriedades de cicatrização e grande atividade angiogênica (MENDONÇA et al., 2010).

O esmagamento de um nervo periférico induz modificações patológicas dos capilares nervosos, diminuindo o fluxo sanguíneo e a tensão de oxigênio, resultando em isquemia e hipóxia. Esse tipo de lesão é muitas vezes tratado com agentes farmacológicos ao invés de cirurgia (JANG; CHO; CHOI, 2012).

Não existem evidências de toxicidade ou de reações alérgicas quando a BLN foi utilizada para reconstruir a membrana do tímpano de coelhos e em úlceras venosas em humanos. No entanto, o potencial alergênico do látex ultra-vulcanizado tem sido bem estabelecido em usuários de luvas de látex e em outros grupos de alto risco de pacientes com diferentes tipos de exposição ao látex. Estudos clínicos mostraram que a BLN foi eficaz na cura de úlceras de pele, especialmente em pacientes diabéticos, de úlceras venosas crônicas e úlceras de pressão (ANDRADE et al., 2011).

Especificamente sobre o nervo isquiático seccionado de ratos, um neurotubo feito com a BLN melhorou a qualidade de regeneração do nervo, a condução do impulso nervoso e a marcha funcional dos animais, além de preservar a estrutura muscular inervada pelo nervo isquiático (GANGA et al., 2012).

Para a regeneração de nervos periféricos a utilização desse material na forma de biomembrana apresentava a desvantagem de não ser biodegradável mesmo que biocompatível. Outros guias nervosos não biodegradáveis construídos com silicone, polímero acrílico, polietileno, elastômero hidrogel e aço inoxidável poroso, apresentavam como desvantagem a resposta de corpo estranho, muitas vezes com formação excessiva de tecido cicatricial, além da rigidez ou falta de estabilidade desses materiais (IJKEMA-PAASSEN et al., 2004). Dessa forma, para alguns tecidos e tipos de lesões, foi utilizada a proteína extraída do soro do látex natural, a proteína P1 (princípio ativo da BLN) para que fosse possível a sua reabsorção pelo organismo.

A proteína P1 em coelhos demonstrou evidente efeito angiogênico e foi eficaz no aumento da permeabilidade vascular. Em úlceras dérmicas, esse material acelerou a cicatrização de forma significativa (MENDONÇA et al., 2010). Ainda em coelhos foi avaliada a neovascularização retinal aplicando-se 3 concentrações (10, 30 e 50 mg) da proteína P1, durante 4 semanas. O grupo que recebeu 10 mg da fração angiogênica do látex natural demonstrou aumento na tortuosidade vascular retinal no 14º dia após a injeção e se mantendo por 28 dias, porém sem detecção de novos vasos. O grupo que recebeu 30 mg apresentou mudanças vasculares similares ao grupo anterior, porém 50 % dos olhos desenvolveram neovascularização 21 dias após a injeção. E o grupo que recebeu 50 mg todos os olhos demonstraram significativo aumento na tortuosidade vascular

neovascularização retinal 14 dias após a aplicação, progredindo para proliferação fibrovascular. Não foram observados novos vasos nos animais que não receberam a proteína P1 (SAMPAIO et al., 2010).

A regeneração óssea utilizando a rhBMP-2 (proteína morfogenética óssea) e a proteína P1 associados com o gel de monoleína e a gelatina de colágeno na calvária de ratos revelou que os melhores resultados foram conseguidos com o uso da rhBMP-2 pura associada com a gelatina de colágeno, seguida pela rhBMP-2 associada com o gel de monoleína e gelatina de colágeno, e pela proteína P1 associada com a monoleína e o colágeno, sendo comparável a utilização apenas da rhBMP-2 pura (ISSA et al., 2010).

A proteína P1 associada com o gel de monoleína aumentou a formação de fibras colágenas em ratos com defeitos ósseos críticos na calvária, superando inclusive a quantidade de fibras colágenas formada pela rhBMP-2. Embora tenha ocorrido o aumento da neoformação óssea com o uso da P1, a rhBMP-2 apresentou os melhores resultados quando associado com a monoleína (ISSA et al., 2012).

1.4 Associação da laserterapia com o látex natural

Até momento foi realizado apenas um trabalho que analisou os efeitos da associação da laserterapia com a proteína do látex natural. Esse estudo analisou a neoformação do tecido ósseo em defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos, comparando os resultados obtidos utilizando-se o LBI (780nm, 60 mW, 30 J/cm²), a proteína P1, a proteína morfogênica óssea-2 (rhBMP-2) assim como as associações desses tratamentos. Os resultados desse estudo mostraram que a proteína P1 associada com o LBI resultou na maior formação óssea quando comparada à aplicação individual da proteína P1. Porém, nesse caso a osteogênese foi menor que a observada na aplicação apenas da rhBMP-2 pura ou da associação rhBMP-2 e LBI. No entanto, a aplicação conjunta da rhBMP-2 com o LBI apresentou menor formação óssea em comparação apenas com a rhBMP-2. Dessa forma, o LBI parece ter atuando diminuindo a neoformação óssea obtida apenas quando foi aplicado a rhBMP-2; porém o LBI foi capaz de potencializar essa formação quando aplicado juntamente com a P1 (IYOMASA et al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA

As lesões dos nervos periféricos por esmagamento apresentam alta incidência clínica, principalmente em casos de acidentes, e ainda hoje, não existem meios e tratamentos totalmente eficazes para recuperação dessas injúrias que causam tamanha debilidade funcional e perda da qualidade de vida. Vários estudos revelam resultados positivos tanto no uso do laser de baixa intensidade como do látex natural (*Hevea brasiliensis*) na recuperação de vários tipos de tecidos, inclusive dos nervos periféricos. Entretanto, ainda se faz necessária uma investigação mais profunda, por meio de várias técnicas simultâneas, sobre a eficácia da laserterapia, bem como do látex natural. A investigação sobre a associação entre os dois tratamentos é original e trará informações sobre a possível potencialização dos efeitos benéficos na regeneração de nervos periféricos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem por finalidade contribuir com a compreensão e possivelmente com a recuperação das lesões de nervos periféricos, analisando o efeito do laser de baixa intensidade (LBI) associado à proteína purificada do látex natural (proteína P1) sobre a lesão por esmagamento (axonotmese) no nervo isquiático de ratos *Wistar*.

3.2 Objetivos específicos

1. Realizar as análises morfológica, histológica quantitativa e morfométrica do nervo e de seu conteúdo ao microscópio de luz utilizando a coloração de “*Sudan Black*” e vermelho neutro;
2. Analisar as reações imunohistoquímicas (peroxidase) utilizando os anticorpos: fator de crescimento neural (NGF), e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF);
3. Analisar tridimensionalmente as amostras ao microscópio eletrônico de varredura de alta resolução;
4. Analisar ultraestruturalmente os tecidos empregando a microscopia eletrônica de transmissão;

Todas as análises foram realizadas em dois períodos, 4 e 8 semanas após a lesão nervosa.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Foram utilizados 132 ratos *Wistar*, machos, com 2-3 meses de idade, pesando 200-250 g, distribuídos aleatoriamente em 6 grupos (n=22), cada grupo foi dividido em 2 subgrupos (n=11) analisados em períodos distintos, 4 e 8 semanas após a lesão nervosa. De cada subgrupo 5 animais foram destinados às análises ao microscópio de luz (morfologia, morfometria e quantificação histológica); dois para as análises imunohistoquímicas, dois para as análises ao microscópio eletrônico de varredura de alta resolução e dois para a análise ao microscópio eletrônico de transmissão. Os animais foram mantidos no biotério em caixas de polipropileno com até quatro animais por caixa, em temperatura controlada (22 a 24 °C), 12 horas de iluminação diária e trocas de ar, com regime de ração e água “*ad libitum*”. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB-USP sob o protocolo no. 78/10, em 16 de agosto de 2010, seguindo as normas e leis internacionais de experimentação animal.

4.2 Obtenção da lesão nervosa

Os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina (75/10 mg/Kg), e submetidos à tricotomia na face lateral do membro pélvico (pata posterior) esquerdo. O local da incisão foi padronizado pela posição de dois processos ósseos da crista ilíaca, as espinhas ventrais superior e inferior. Uma pequena incisão (2 cm aprox.) foi feita na pele perpendicularmente à linha de união desses processos ósseos. A incisão foi feita recuando aproximadamente 2 cm em direção caudal na face lateral do membro pélvico dos animais. Foi então realizada a divulsão dos músculos glúteo máximo superficial e bíceps femoral, expondo o nervo isquiático. Em seguida os animais foram posicionados em uma base de inox (figura 1A), confeccionada com dimensões e características específicas para essa finalidade (figura 1B), e posicionada (figura 1D) no aparelho de ensaios universais EMIC (figura 1C) do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. O esmagamento controlado do nervo isquiático esquerdo foi realizado conforme a técnica relatada por Garcez (2004) (figura 1E). O peso aplicado sobre o nervo isquiático foi constante de 15 Kgf por um período de 10 minutos, a área de esmagamento com área circular medindo aproximadamente

0,2826 cm² (diâmetro 0,6 cm), totalizando 5,2 MPa (53,07 Kgf/cm²). Após a lesão, os nervos foram recolocados em posição, realizados os protocolos preconizados para cada grupo experimental e a pele suturada com fio de nylon 4-0. Foram administrados 0,2 ml de anti-inflamatório (Banamine – *Schering Plough*, Flunixinina meglumina 10 mg/ml) e 0,3 ml de anti-infeccioso de amplo-espectro (pentabiótico – *Fort Dodge*), para prevenir a inflamação e infecção locais devido ao procedimento (figura 1F).

Figura 1 - Lesão nervosa por esmagamento controlado

A. Base de inox para lesão nervosa; **B.** Nervo isquiático exposto em posição; **C.** Mesa em posição no equipamento de ensaios universais EMIC; **D.** Mesa em posição no aparelho de ensaios universais EMIC; **E.** Lesão do nervo isquiático; **F.** Curativo pós-cirúrgico do local da lesão.

4.3 Irradiação com laser de baixa intensidade

Neste estudo foi utilizado o aparelho “Twin Laser – Mm Optics” (figura 2A) com as especificações: potência máxima de 70 mW, dose máxima de 315 J/cm², comprimento de onda de 780 nm (infravermelho), meio semiconductor de diodo arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs), área de aplicação de 0,04 cm² e diâmetro da ponta de aplicação (*spot*) de 5 mm. Foram realizadas 6 irradiações em dias alternados em 3 pontos na região do nervo lesado, correspondendo às regiões proximal, distal e da área da lesão propriamente dita. Para cada sessão de irradiação a sonda do laser foi envolvida em uma camada de filme PVC para evitar contaminação. Também foi utilizado um meio de contenção para que os animais permitissem a irradiação do laser (figura 2B) na região lesada e assim eliminando a necessidade de anestesia local ou geral, prevenindo a morte prematura dos animais durante o protocolo de irradiação. Os parâmetros de irradiação na fase pós-operatória estão descrito na **tabela 1**.

Tabela 1 – Parâmetros de irradiação do laser de baixa intensidade

Potência	30 mW
Intensidade	0,75W/cm ²
Densidade de energia	15 J/cm ²
Comprimento de onda	780 nm
Tempo de aplicação (ponto)	20 s
Número de pontos de aplicação	3
Tipo de onda	contínua (CW)
Direção do feixe	Perpendicular ao tecido
Energia depositada (ponto)	0,6 J
Área do spot de aplicação	0,04cm ²
Número de sessões	6 (dias alternados)

4.4 Látex natural (*Hevea brasiliensis*)

A proteína purificada do látex natural (P1) extraída da *Hevea brasiliensis* foi associada a um hidrogel de ácido hialurônico que foi utilizado como veículo (PARK et al., 2010). O ácido hialurônico (*NikkoI*), isolado de bactérias gram-negativas, foi utilizado na concentração final de 1% e a P1 na concentração de 0,1%. Ambos foram misturados e filtrados em sistema estéril (filtros Millipore 0,22 µm) e armazenados em frascos de cultura estéreis. A mistura foi aplicada com o auxílio de uma micropipeta sobre o nervo (100 µl) (figura 2C) após a lesão e antes da sutura. O ácido hialurônico e a proteína purificada do látex natural foram obtidos pelo Prof. Dr.

Joaquim Coutinho Netto do Laboratório de Neuroquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pioneiro nos estudos de aplicação das proteínas da *Hevea brasilienses* na regeneração de tecidos (MRUÉ, 1996).

Figura 2 - Tratamentos aplicados após a lesão nervosa

A. Aparelho “Twin Laser” da MMOptics; B. Irradiação laser com o método de contenção; C. Aplicação da proteína purificada do látex natural na área da lesão.

4.5 Grupos experimentais – Descrição dos protocolos realizados

O presente estudo conta com 6 grupos avaliados após 4 e 8 semanas da lesão nervosa. Os protocolos dos grupos experimentais estão descritos a seguir:

Grupo I (controle) – Os animais foram anestesiados, submetidos à tricotomia no membro pélvico (pata posterior) esquerdo e ficaram em decúbito lateral por 10 minutos, simulando o estresse da lesão;

Grupo II – Os animais foram anestesiados, submetidos à tricotomia no membro pélvico (pata posterior) esquerdo, tiveram o nervo isquiático exposto e posicionado sobre o suporte da lesão por 10 minutos;

Grupo III – Os animais foram anestesiados, submetidos à tricotomia no membro pélvico (pata posterior) esquerdo. O nervo isquiático foi exposto e posicionado sobre o suporte e lesado por compressão (15 Kgf, 10 minutos);

Grupo IV – Os animais foram anestesiados, submetidos à tricotomia no membro pélvico (pata posterior) esquerdo, nervo isquiático exposto e posicionado sobre a mesa e lesado por compressão (15 Kgf, 10 minutos). Após 2 dias os animais foram submetidos ao protocolo de irradiação do laser de baixa intensidade (LBI) conforme os parâmetros da **tabela 1**;

Grupo V – Os animais foram anestesiados, submetidos à tricotomia no membro pélvico (pata posterior) esquerdo, nervo isquiático exposto, posicionado sobre a mesa e lesado por compressão (15 Kgf, 10 minutos). O nervo foi reposicionado e a mistura de ácido hialurônico contendo a proteína purificada do látex natural a 0,1% foi aplicada no local da lesão;

Grupo VI – Os animais foram anestesiados, submetidos à tricotomia no membro pélvico (pata posterior) esquerdo, nervo isquiático exposto e posicionado sobre a mesa, lesado por compressão (15 Kgf, 10 minutos). O nervo foi reposicionado e a mistura de ácido hialurônico contendo a proteína purificada do látex natural a 0,1% foi aplicada no local da lesão. Após 2 dias os animais foram submetido às irradiações do LBI conforme os parâmetros da **tabela1**.

4.6 Coleta e processamento do material

4.6.1 Microscopia de luz

Decorridas 4 ou 8 semanas da lesão nervosa e realizados os protocolos de tratamentos de cada grupo, os animais (n=5 subgrupo por período de análise) foram submetidos a eutanásia por sobre dose anestésica com a associação de quetamina e xilazina (150/10 mg/Kg do animal). O nervo isquiático esquerdo foi dissecado, coletado, fixado em paraformaldeído 4% e incluído em historesina *Leica*. Foram realizados os cortes em micrótomo (3 μ m) e a montagem das lâminas histológicas. As lâminas foram confeccionadas e coradas pela coloração de *Suddan Black* e vermelho neutro pela técnica indicada para a historesina LEICA para as análises qualitativas, quantitativas e morfométricas.

4.6.2 Análise dos resultados da microscopia de luz

Os cortes histológicos do segmento lesado do nervo isquiático foram corados e fotomicrografados com o auxílio do microscópio Leica DM4000 B & câmera Leica EC3 e armazenados de forma digital. Os nervos foram analisados e fotografados com aumento de 100X, quando foi necessário foram montadas imagens, unindo-se de duas até três fotomicrografias para que em todas as imagens analisadas o nervo isquiático estivesse com a área de secção transversa completa.

4.6.3 Análise Morfológica Qualitativa

Para a análise morfológica qualitativa foram analisadas as fotomicrografias coradas com a coloração de *Suddan Black* e vermelho neutro para historesina *Leica* do segmento correspondente a lesão nervosa. As lâminas foram banhadas em álcool 70º por 15 minutos para lavagem, seguindo a passagens em *Suddan Black* por 15 minutos, lavagem em álcool 70º, lavagem em água destilada, passagem em vermelho neutro por 1 a 2 minutos, e posterior lavagem em água destilada.

Essa coloração foi eleita e utilizada após a comparação com a coloração do mesmo material com azul de toluidina. Optou-se por essa coloração devido ao fato do corante *Suddan Black* corar a porção lipídica (BEHMER; TOLOSA; FREITAS NETO, 1976) das bainhas de mielina. Além disso, nessa técnica, a coloração de fundo é feita com o corante vermelho neutro que resulta em um maior contraste em comparação com a coloração utilizando o azul de toluidina, em que o fundo se apresentou com tons mais claros de azul, fato esse que poderia influenciar nos valores quantificados.

4.6.4 Análise Histológica Quantitativa

Para a análise histológica quantitativa as regiões ao redor do nervo isquiático (figura 3A), os vasos além das áreas de degeneração nervosa foram eliminadas manualmente utilizando o *software "Photoshop CS5"* (figura 3B) com o intuito que a quantificação não considere essas áreas como as bainhas de mielina. As imagens foram transformadas em preto e branco (binário) (figura 3C) e por fim a área escura foi quantificada com o auxílio do *software "ImageJ 1.47s"*, obtendo-se a área de

mielina (figura 3D) pela quantificação de *pixels*. A área total do nervo é obtida também com o auxílio do “*software ImageJ*” circulando-se o nervo na imagem original. Por fim a razão entre a área de mielina e área total do nervo foi obtida e comparada entre os grupos. Além da análise da quantidade de mielina (área de mielina/área do nervo), também foram quantificados os capilares sanguíneos presentes no nervo e posteriormente foi calculada a sua densidade, ou seja, a quantidade de capilares presentes em uma determinada área (capilares/mm²).

Figura. 3 – Metodologia da quantificação histológica

A. Aspecto geral do nervo isquiático contendo fibras nervosas e capilares sanguíneos; **B.** Fotomicrografia tratada do nervo isquiático, sem a região periférica e os capilares sanguíneos; **C.** Fotomicrografia em binário; **D.** Quantificação da área de mielina usando o *software ImageJ*.

4.6.5 Análise Morfométrica

Figura 4 – Esquema da Análise Morfométrica

Mensurações realizadas para análise morfométrica.

As análises morfométricas foram realizadas nas imagens originais com auxílio do *software* “ImageJ”. Os parâmetros avaliados foram: diâmetros máximo (seta azul, figura 4) e mínimo da fibra nervosa (seta vermelha, figura 4), diâmetro do axônio (seta verde, figura 4), razão-G (razão entre o diâmetro do axônio e o diâmetro da fibra nervosa), cujo valor varia de 0 a 1, e é reconhecido como um dado referente à mielinização das fibras (ARINO; BRANDT; DAHLIN, 2008; CHOMIAK e HU, 2009; SANTOS et al., 2012), e por fim foi mensurado também a espessura das bainhas de mielina (seta preta, figura 4). De cada grupo foram quantificadas no mínimo 250 fibras nervosas, que foram aleatoriamente selecionadas por meio da sobreposição de uma grade sobre as imagens, no qual as intersecções determinavam quais fibras deveriam ser mensuradas.

4.7 Imunohistoquímica - Peroxidase

4.7.1 Criopreservação

Após 4 e 8 semanas da lesão, os animais (n=2 subgrupo por período de análise) foram anestesiados com sobre-dose anestésica (quetamina 150 mg/Kg e xilazina 10 mg/Kg), decapitados e submetidos à remoção do nervo isquiático esquerdo. O nervo removido foi colocado em um recipiente (canudo plástico) contendo OTC (*Optimal cutting temperature compound - Tissue Tek Compound*) e congelado em isopentano resfriado pelo nitrogênio líquido (-196 °C), tomando-se o cuidado de marcar a região proximal para orientação dos cortes. Após o congelamento, as amostras obtidas

foram armazenadas em *freezer* (-80 °C) até o momento da montagem das lâminas. Os nervos foram transferidos para a câmara do micrótomo criostato (-20 °C), montados sobre o suporte metálico; os cortes transversais de 15 µm de espessura foram montados em lâminas histológicas adesivadas, e posteriormente submetidos ao protocolo da imunomarcção (peroxidase).

4.7.2 Reação Imunohistoquímica – anti-NGF e anti-VEGF

A imunomarcção foi realizada utilizando os anticorpos primários: anti-NGF (Abcam - ab6198, EUA, concentração 1:400), anti-VEGF (SantaCruz - sc152, EUA, concentração 1:100). Anticorpo secundário (polímero “histofine HRP Nichirei”, 414341F, Japão) e diaminobenzidina (Spring, DAB-125, EUA).

Seguindo a técnica descrita por Raimondo et al. (2009) os cortes foram inicialmente cobertos com peróxido de hidrogênio (3% - 10 volumes) para bloqueio da peroxidase endógena por 10 minutos e das ligações inespecíficas com “*Protein Block – Spring* (DPB-125)” por 1 hora, foi realizada a lavagem das amostras em PBS, e posteriormente foi realizada a incubação com os anticorpos primários (anti-NGF 1:400 e anti-VEGF 1:100) *overnight* à 4-8 °C. No dia seguinte, os cortes foram novamente lavados em PBS e incubados por 2 horas com o anticorpo secundário sistema-HRP (temperatura ambiente). A reação foi revelada com solução de diaminobenzidina (0,5 mg/ml) e peróxido de hidrogênio líquido (0,005 ml/100ml) em PBS por 1 minuto. Os cortes foram lavados em PBS, contra corados com hematoxilina de *Mayer*, lavados com água destilada e montados com *Entellan*. Para o controle negativo da reação foi realizado o mesmo procedimento anterior sobre as lâminas, exceto a incubação com anticorpo primário, que foi substituído pelo meio em que os anticorpos foram diluídos (PBS/BSA 1%). Os resultados das reações imunohistoquímicas foram analisados qualitativamente.

4.8 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-AR)

Para observação dos detalhes estruturais após 4 e 8 semanas da lesão o nervo isquiático esquerdo (n=2 subgrupo por período de análise) foi dissecado, e as amostras do segmento da lesão nervosa foram tratadas com o método de ósmio-DMSO-ósmio (TANAKA, 1989; WATANABE; KORIYAMA; YAMADA, 1992). Os

nervos foram fixados por imersão em tetróxido de ósmio 2% em tampão fosfato de sódio 1/15 M a 4 °C (pH 7,4) 2h, lavados em solução tampão fosfato de sódio (8h) a 4 °C e então imersos em solução aquosa de dimetil sulfóxido (DMSO) com sucessivas concentrações – 12,5; 25 e 50%, 90 minutos cada. A seguir, as amostras foram fraturadas em DMSO a 50% congelado em aparato próprio para essa finalidade. As partes da fratura foram devolvidas para a solução de DMSO a 50% sofrendo o descongelamento gradativo e lavado em água destilada (temperatura ambiente) por 1h. A pós-fixação foi feita em solução de tetróxido de ósmio à 2%, durante 2h à 4 °C e maceração em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 0,1% a temperatura de 22 °C por 48h. Novamente foi realizada a lavagem das amostras em água destilada por 15 minutos, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2%, por 2h à 4 °C. Em seguida, a lavagem com água destilada por 3 horas e tratadas em solução aquosa de ácido tânico a 2%, durante uma hora a temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a lavagem em água destilada por 5 horas à temperatura ambiente e desidratação em série crescente de álcoois (70 a 100°) seguida de secagem em aparelho Balzers CPD-030 (Processo FAPESP 86/2549-0). As amostras foram montadas em bases metálicas, cobertas com íon de ouro no aparelho Blazers SCD-040 (Processo FAPESP 92/444-1) e examinadas em microscópio eletrônico de varredura de alta resolução *Field Emission Gun Scanning Electron Microscope* (FEG-SEM) JEOL JSM-7401F (Japão) da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os animais (n=2 subgrupo por período de análise) após serem submetidos à lesão e aos protocolos do trabalho foram anestesiados com quetamina e xilazina (75 e 10 mg/kg), tiveram o diafragma rompido e foram perfundidos por via intra-cardíaca com solução de *Karnovsky* modificado contendo glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 2% em solução de tampão fosfato de sódio a 0,1M e pH 7,4 (WATANABE e YAMADA, 1983). O segmento correspondente a área da lesão do nervo isquiático esquerdo foi removido e imerso em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M por 2 horas à 4 °C. A pós-fixação foi feita em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1%, durante 2 horas a 4 °C, em seguida imerso em solução aquosa de acetato de uranila a 0,5% *overnight* para melhorar o

contraste da amostra. As peças foram desidratadas em série crescentes de álcoois (70, 80, 90, 95 e 100°), seguida de duas passagens por óxido de propileno durante de 30 minutos. Foram submetidas à infiltração na mistura de óxido de propileno e resina *Spurr* (1:1) e incluídas em resina pura durante 6h. As peças foram colocadas em molde de borracha e mantidas em estufa à 60°C até a polimerização (48 a 72 h). Os blocos foram trimados e montados no ultramicrotomo para a obtenção de cortes semi-finos de 1µm, e então corados com a solução de azul de toluidina para a identificação da área de interesse. Os cortes ultrafinos de 90nm foram obtidos em ultramicrotomo *Reichert, Ultra-Cut* (Processo FAPESP 97/09943-0) e coletados em telas de 200 “*mesh*”, contrastados com soluções de acetato de uranila (WATANABE e YAMADA, 1983; WATSON, 1958) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963; WATANABE e YAMADA, 1983) e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão, JEOL 1010 (Japão) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.10 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do *software estatístico* “*GraphPad InStat 3.0*”. O teste “*Shapiro-Wilk*” foi utilizado para a análise de normalidade dos dados. Para os dados que tiveram a distribuição normal (quantificação histológica), foi adotado o teste estatístico da análise de variância (ANOVA, $p=0,05$) com o pós-teste de “*Bonferroni*”, com a comparação múltipla grupo a grupo, os dados nesse caso foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (mean $\pm$ SD), e para os dados sem a distribuição normal (análise morfométrica), o teste eleito foi o *Kruskal-Wallis* com o método de comparação múltipla de *Dunn* realizada comparando-se grupo a grupo, nesse caso os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (mean $\pm$ SEM).

5 RESULTADOS

5.1 Análise morfológica - Microscopia de Luz

5.1.1 Análise morfológica - 4 semanas após a lesão nervosa

Figura 5 – Microscopia de luz – (Grupos I e II) – 4 semanas

A. Nervo isquiático, segmento correspondente à região da lesão do **grupo I** (controle), 4 semanas– Fibras nervosas (*) separadas em feixes pelo perineuro (seta grossa), capilares sanguíneos (setas) e a região do epineuro que divide os fascículos nervosos (cabeça de seta). Aumento: 100X. **B.** Nervo isquiático, segmento correspondente à região da lesão do **grupo II** (nervo exposto), 4 semanas - Grupamento de fibras nervosas (*), perineuro (seta grossa), capilares sanguíneos (setas) e a região do epineuro (cabeça de seta). Aumento: 100X.

No **grupo I** cujos animais foram submetidos à simulação da lesão nervosa (figura 5A) os cortes histológicos mostraram a constituição, a organização das fibras nervosas e o conteúdo do nervo isquiático com aspecto normal. Observam-se feixes de fibras nervosas divididas pelos envoltórios de tecido conjuntivo, o perineuro, com características morfológicas normais, presença de capilares sanguíneos de vários diâmetros e formatos distribuídos em toda área de secção transversa do nervo isquiático, além da região do epineuro sem alterações que divide os fascículos nervosos.

O **grupo II** (figura 5B) em que os animais foram submetidos à exposição do nervo isquiático, revelou características similares ao grupo controle. Não se observam alterações morfológicas significativas, com feixes de fibras nervosas com características normais e organizadas, envoltas pelo perineuro. Foram notados capilares sanguíneos de vários calibres e formatos distribuídos por toda região da secção transversa no nervo isquiático. O perineuro mostra-se com características morfológicas sem alterações dividindo os fascículos nervosos.

Figura 6 – Microscopia de luz – (Grupos III e IV) – 4 semanas

A. Nervo isquiático, segmento da área da lesão do **grupo III** (nervo lesado sem tratamento), 4 semanas após a lesão nervosa – Grupamento de fibras nervosas (*), espaços contendo substância amorfa entre as fibras (seta grossa), região do perineuro (seta), capilares (setas) e região do epineuro (cabeça de seta). Aumento: 200X. **B.** Nervo isquiático, segmento da área da lesão do **grupo IV** (nervo lesado tratado com LBI), 4 semanas após a lesão nervosa – Observa-se grupamentos de fibras nervosas (*), a região do perineuro (seta grossa), capilares sanguíneos (setas) e a região do epineuro (cabeça de seta), infiltrado inflamatório na periferia (**). Aumento: 200X.

O **grupo III** (figura 6A), cujos animais foram submetidos à lesão no nervo isquiático esquerdo por esmagamento e não receberam tratamento, apresentou

características morfológicas que diferem dos dois grupos analisados anteriormente, entre essas diferenças destaca-se a perda da integridade do conteúdo interno do nervo com presença de fibras nervosas de diâmetro reduzido, além da existência de espaços contendo substância amorfa entre as fibras nervosas. Essas características levam à diminuição da densidade das fibras nervosas. O perineuro revela-se desorganizado, os capilares sanguíneos de vários calibres estão presentes entre os grupamentos de fibras nervosas com diâmetro reduzido e formato irregular em alguns casos, o epineuro mostrou características pouco alteradas e sem a presença de infiltrados inflamatórios.

No **grupo IV** (figura 6B), cujos animais foram submetidos à lesão nervosa e irradiados com o LBI, observou-se maior organização dos grupamentos das fibras nervosas em comparação ao grupo III. Contudo, foram ainda notadas fibras nervosas de diâmetro reduzido e espaços entre elas corados em vermelho, sugerindo o acúmulo de fibras colágenas, esses fatores resultam em uma menor densidade de fibras nervosas em comparação com os grupos I e II. A região do perineuro nesse caso se mostrou mais organizada em comparação ao grupo III, os capilares sanguíneos estavam distribuídos por toda a área de secção transversa do nervo isquiático, no entanto com menores calibres se comparados aos grupos anteriores. A região do epineuro apresentou-se com características morfológicas alteradas e contendo infiltrados inflamatórios.

Figura 7 – Microscopia de luz – (Grupos V e VI) – 4 semanas

A. Nervo isquiático, segmento da área da lesão do **grupo V** (nervo lesado tratado com proteína P1), 4 semanas após a lesão nervosa – Grupamentos de fibras nervosas (*), a região do perineuro (setas grossas), capilares sanguíneos (setas), além da região do epineuro (cabeça de seta). Aumento: 200X. **B.** Nervo isquiático, segmento da área da lesão do **grupo VI** (nervo lesado tratado com proteína P1 e LBI), 4 semanas após a lesão nervosa – Grupamento das fibras nervosas (*) com espaçamento na região do endoneuro, região do perineuro (setas grossas), capilares (setas), região do epineuro (cabeça de seta) com infiltrado inflamatório (**) em algumas áreas. Aumento: 200X.

O **grupo V** (figura 7A), cujo nervo isquiático foi lesado e recebeu aplicação da proteína P1, mostrou o conteúdo interno do nervo mais organizado em comparação

aos grupos III e IV. Os grupamentos de fibras nervosas apresentam características morfológicas mais próximas dos grupos I e II com bainha de mielina mais definida, no entanto ainda foram notadas fibras de diâmetro reduzido e maior espaço no endoneuro. O perineuro, que divide os feixes de fibras nervosas, revela-se mais organizado e definido em comparação aos outros grupos lesados (III e IV). Os capilares sanguíneos de diversos calibres e formatos estão distribuídos por todo o nervo isquiático, característica similar àquela observada no grupo controle, assim como o epineuro que mostrou características morfológicas mais semelhantes com os grupos I e II sem a presença de infiltrados inflamatórios.

O **grupo VI** (figura 7B), cujos animais foram submetidos à lesão nervosa e foram irradiados com o LBI e receberam a aplicação da proteína P1, apresentou maior organização dos grupamentos das fibras nervosas em comparação ao grupo III, porém ainda notam-se grandes espaços no endoneuro entre as fibras nervosas de diâmetro reduzido, ocupadas por estruturas coradas em vermelho que sugere a presença de fibras colágenas. O perineuro apresenta-se mais definido do que no grupo III, os capilares sanguíneos de calibre reduzido apresentaram-se distribuídos por toda a área de secção transversa do nervo isquiático. O epineuro mostra-se com morfologia alterada e com infiltrações inflamatórias em algumas regiões.

5.1.2 Análise morfológica - 8 semanas após a lesão nervosa

Figura 8 - Microscopia de luz – (Grupos I e II) – 8 semanas

A. Nervo isquiático, segmento da área da lesão do **grupo I** (controle), 8 semanas após a manipulação nervosa – Observa-se as fibras nervosas (*) envoltas pelo perineuro (seta grossa), capilares sanguíneos (setas) as lâminas da região do epineuro (cabeça de seta). Aumento: 100X. **B.** Nervo isquiático, segmento da área da lesão do **grupo II** (nervo exposto), 8 semanas após a exposição nervosa – Grupamentos de fibras nervosas (*), região do perineuro (seta grossa), capilares sanguíneos (setas), região do epineuro (cabeça de seta). Aumento: 100X.

Após 8 semanas, o **grupo I** (controle, figura 8A) revelou organização dos grupamentos das fibras nervosas e conteúdo interno do nervo isquiático com características morfológicas normais, semelhante ao observado no grupo I analisado após 4 semanas da manipulação nervosa. Os grupamentos de fibras nervosas, divididas em feixes pelo perineuro, são notados com características morfológicas normais, além da presença de capilares sanguíneos de vários diâmetros distribuídos pela área de secção transversa do nervo isquiático. A região perineural não apresentou alterações das características morfológicas, e o epineuro envolvia os fascículos nervosos também sem apresentar alterações.

O **grupo II** (nervo exposto, figura 8B), apresentou características morfológicas sem alterações significantes, assemelhando-se assim ao grupo I, com feixes de fibras nervosas íntegras e organizadas pela presença do perineuro, além da presença de vários capilares sanguíneos de diversos calibres e formatos distribuídos por todo nervo, a região do epineuro mostrou-se íntegra e sem modificações.

Figura 9 – Microscopia de luz – (Grupos III e IV) – 8 semanas

A. Nervo isquiático, segmento da área da lesão do **grupo III** (nervo lesado sem tratamento), 8 semanas após a lesão nervosa – Grupamentos de fibras nervosas (*), perineuro (seta grossa), capilares (setas), área do epineuro (cabeça de seta) com infiltrado inflamatório (**) e vascularizada. Aumento: 100X. **B.** Nervo isquiático, segmento da área da lesão do **grupo IV** (nervo lesado tratado com LBI), 8 semanas após a lesão nervosa – Fibras nervosas (*), região do perineuro (seta grossa), capilares sanguíneos (setas) e região do epineuro (cabeça de seta) contendo muitos vasos sanguíneos. Aumento: 100X.

No **grupo III** (lesado, figura 9A), analisado após 8 semanas da lesão nervosa, observa-se que a densidade das fibras nervosas diminuiu devido à presença de feixes de fibras de tamanho reduzido e maior espaçamento entre elas, em especial

na região correspondente ao endoneuro, o perineuro não se mostra bem definido dividindo as fibras nervosas em feixes. Os capilares sanguíneos estão presentes por toda região do nervo isquiático, no entanto com tamanho e formato mais uniforme em comparação com os grupos I e II, na região do epineuro foram observadas infiltrações inflamatórias e grande quantidade de capilares sanguíneos. Comparando-se as características do grupo III analisado após 4 e 8 semanas da lesão nervosa é possível notar no período pós-operatório mais longo que as características morfológicas internas do nervo isquiático foram melhores, com fibras mais organizadas e redução dos espaços entre elas. Porém, em ambos os períodos de análise, as características morfológicas apresentaram qualidade inferior aos grupos I e II.

O **grupo IV** (tratado com LBI, figura 9B) revela fibras nervosas maiores e com menor espaçamento em comparação com o grupo III, essas características resultam em uma maior densidade de fibras nervosas, no entanto essa densidade de fibras foi menor no presente grupo que a observada nos grupos I e II. O perineuro mostra-se bem definido, com aspecto morfológico normal e separa as fibras nervosas em feixes, os capilares sanguíneos são numerosos e distribuídos por toda área de secção transversa do nervo isquiático, e a região do epineuro revela-se sem alterações e similar ao grupo controle, nesse período de análise não foram mais observadas a presença de infiltrações inflamatórias no epineuro, porém são observadas grande quantidade de capilares sanguíneos nessa região.

Figura 10 – Microscopia de luz (Grupos V e VI) – 8 semanas

A. Nervo isquiático, segmento da área da lesão do **grupo V** (nervo lesado tratado com proteína P1), 8 semanas após a lesão nervosa - Nota-se o grupamento das fibras nervosas (*), região do perineuro (seta grossa), capilares sanguíneos (setas) e região de epineuro (cabeça de seta). Aumento: 100X. **B.** Nervo isquiático, segmento da área da lesão do **grupo VI** (nervo lesado tratado com proteína P1 e laserterapia), 8 semanas após a lesão nervosa – Fibras nervosas (*), perineuro (seta grossa), capilares sanguíneos (setas) e região do epineuro (cabeça de seta). Aumento: 100X.

No **grupo V** (tratado com proteína P1, figura 10A), analisado após 8 semanas da lesão nervosa, foi possível notar o conteúdo interno do nervo com características similares ao grupo controle, os feixes de fibras nervosas com características

morfológicas normais e sem espaçamento significativo entre elas na região do endoneuro. Observou-se a região do perineuro bem definida dividindo as fibras nervosas em feixes, os capilares sanguíneos apresentam diversos tamanhos e estão distribuídos em todas as regiões da secção transversa do nervo isquiático. O epineuro não mostrou alterações significativas em relação aos grupos I e II analisados após 8 semanas, e como ocorreu no período anterior não foram observadas infiltrações inflamatórias.

No **grupo VI** (tratado com LBI e proteína P1, figura 10B), foram notadas características semelhantes ao grupo controle. Os grupamentos de fibras nervosas não apresentam alterações morfológicas significantes, não foram observados espaçamentos entre as fibras, resultando e uma densidade de fibras maior que os grupos III e IV e similar aos dos grupos I, II e V. O perineuro revela-se bem definido e organizando as fibras nervosas em feixes. Muitos capilares sanguíneos de diversos calibres estão distribuídos por todo nervo isquiático, sugerindo uma melhor vascularização, e o epineuro apresenta características morfológicas normais, semelhante à observada no grupo I, e sem a presença de infiltrações inflamatórias.

5.2 Análise histológica quantitativa das fibras nervosas

5.2.1 Grupo Experimental - 4 semanas após a lesão nervosa

Na **tabela 2** estão apresentados os dados obtidos da quantificação utilizando a coloração de *Suddan Black* e vermelho neutro. Os dados são relativos as médias ($\pm$ desvio padrão) dos animais dos 6 grupos (n=5) totalizando 30 animais, passadas 4 semanas da lesão nervosa.

Tabela 2 – Quantificação do nervo isquiático 4 semanas pós-lesão nervosa

	Área nervo (μm^2)	Área mielina (μm^2)	A. mielina/A. nervo (%)	Capilares	Densidade de capilares (capilares/ mm^2)
GI	506260,29	301583,14	60,28 $\pm$ 9,66	42,47	86,03 $\pm$ 30,07
GII	528856,68	298976,71	57,55 $\pm$ 11,86	44,14	85,69 $\pm$ 22,07
GIII	547529,84	208071,30	32,37 $\pm$ 7,78	39,93	74,45 $\pm$ 26,62
GIV	530146,08	215996,44	40,81 $\pm$ 13,07	39,45	78,83 $\pm$ 39,67
GV	622473,35	247001,80	43,72 $\pm$ 14,83	46,80	77,80 $\pm$ 26,10
GVI	649142,59	217904,45	36,64 $\pm$ 8,32	62,75	98,16 $\pm$ 20,87

Gráfico 1 – Razão Área de Mielina/área do nervo, 4 semanas após a lesão. As marcações “a, b” indicam a semelhanças e diferenças estatísticas entre os grupos baseados no valor de P.

Gráfico 2 – Densidade Capilar, 4 semanas após a lesão. Não houve diferença entre os grupos baseado no valor de $P=0,05$.

O **gráfico 1** representa a comparação do resultados da área de mielina/área do nervo isquiático após 4 semanas da lesão nervosa, obtida pela quantificação de *pixels* conforme descrito no item “6.1.3 - Análise Histológica Quantitativa” da seção de material e métodos. Os dados revelam que os grupos I ($60,28 \pm 9,66$) e II ($57,55 \pm 11,86$) foram semelhantes estatisticamente e apresentaram os maiores resultados quando comparado aos demais grupos. Os grupos III ($32,37 \pm 7,78$), IV ($40,81 \pm 13,07$), V ($43,72 \pm 14,83$) e VI ($36,64 \pm 8,32$) não apresentaram diferenças significantes entre si, porém observa-se uma tendência de aumento desse

parâmetro no grupo V, uma vez que a diferença estatística não foi tão significativa quando esse grupo foi comparado ao grupo II.

No **gráfico 2** estão os valores da densidade de capilares sanguíneos (número de capilares/mm²) dos seis grupo do estudo (GI – 86,03 ± 30,07; GII – 85,69 ± 22,07; GIII – 74,45 ± 26,62; GIV – 78,83 ± 39,67; GV – 77,80 ± 26,10 e GVI – 98,16 ± 20,87) após 4 semanas da lesão nervosa. A análise estatística não revelou diferenças significantes entre os grupos do estudo.

5.2.2 Grupo Experimental - 8 semanas após a lesão nervosa

Os dados obtidos da quantificação histológica com a coloração de *Suddan Black* e vermelho neutro, após 8 semanas da lesão nervosa, estão apresentados na **tabela 3**. Os dados (±desvio padrão) são relativos às médias dos animais dos 6 grupos (n=5) totalizando 30 animais, analisados após 8 semanas da lesão nervosa.

Tabela 3 – Quantificação do nervo isquiático 8 semanas pós-lesão nervosa

	Área nervo (µm ²)	Área mielina (µm ²)	A. mielina/A. nervo (%)	Capilares	Densidade de capilares (capilares/mm ²)
GI	542780,48	258291,17	47,85 ± 5,05	52,92	99,22 ± 25,29
GII	601586,20	230101,07	40,60 ± 7,19	50,42	87,60 ± 20,87
GIII	532432,67	136047,71	26,14 ± 11,61	53,54	99,12 ± 22,56
GIV	474405,86	163314,33	35,89 ± 14,24	54,92	116,59 ± 21,24
GV	459164,22	186626,33	43,04 ± 12	61,46	135,35 ± 27,45
GVI	523248,26	225172,00	43,19 ± 10,55	71,38	140,84 ± 19,82

ANOVA (Bonferroni)	
Comp.	Valor P
GI x GII	ns >0,05
GI x GIII	***<0,001
GI x GIV	ns >0,05
GI vs GV	ns >0,05
GI x GVI	ns >0,05
GII x GIII	*<0,05
GII x GIV	ns >0,05
GII x GV	ns >0,05
GII x GVI	ns >0,05
GIII x GIV	ns >0,05
GIII x GV	**<0,01
GIII x GVI	**<0,01
GIV x GV	ns >0,05
GIV x GVI	ns >0,05
GV x GVI	ns >0,05

Gráfico 3 – Razão Área de Mielina/área do nervo, 8 semanas após a lesão. As marcações “a, b” indicam semelhanças e diferenças estatísticas entre os grupos baseados no valor de P.

Gráfico 4 – Densidade Capilar, 8 semanas após e lesão. As marcações “a, b” indicam semelhanças e diferenças estatísticas entre os grupos baseados no valor de P.

O **gráfico 3** mostra os dados referentes à área de mielina/área do nervo após 8 semanas da lesão nervosa. A análise desses dados revelou que os grupos I ($47,85 \pm 5,05$), II ($40,60 \pm 7,19$), IV ($35,89 \pm 14,24$), V ($43,04 \pm 12$) e VI ($43,19 \pm 10,55$) foram semelhantes estatisticamente. O grupo III ($26,14 \pm 11,61$) apresentou o menor valor para esse parâmetro em comparação aos grupo citados anteriormente sendo essa diferença significativa, além disso também foi observada semelhança estatística entre os grupos III e IV.

O **gráfico 4** mostra os valores da densidade de capilares sanguíneos (número de capilares/mm²) dos grupos do estudo após 8 semanas da lesão nervosa. A análise estatística revelou que os grupos I ($99,22 \pm 25,29$), II ($87,60 \pm 20,87$), III ($99,12 \pm 22,56$) e IV ($116,59 \pm 21,24$) foram semelhantes com os menores valores desse parâmetro. Os grupos V ($135,35 \pm 27,45$) e VI ($140,84 \pm 19,82$) foram semelhantes estatisticamente revelando uma maior densidade de capilares em comparação com os demais grupos, além disso foi observado que o grupo IV também foi semelhante aos grupos V e VI.

5.3 Análise Morfométrica das Fibras Nervosas

As análises morfométricas foram realizadas como descrito no item “6.1.4. Análise Morfométrica” e esquematizado na figura 17. Os grupos do presente estudo revelam diferenças nos resultados dependendo dos protocolos aplicados após 4 e 8

semanas do esmagamento do nervo isquiático. Os dados (média $\pm$ erro padrão da média) das análises morfométricas estão descritas na sequência.

5.3.1 Grupo Experimental - 4 semanas após a lesão nervosa

Diâmetros máximo e mínimo da fibra nervosa e diâmetro axonal – 4 semanas

Gráfico 5 – Diâmetro máximo das fibras nervosas 4 semanas após a lesão. As marcações “a, b, c, d” indicam semelhanças e diferenças estatísticas entre os grupos baseados no valor de P.

Gráfico 6 – Diâmetro mínimo das fibras nervosas 4 semanas após a lesão. As marcações “a, b, c” indicam semelhanças e diferenças estatísticas entre os grupos baseados no valor de P.

Gráfico 7 – Diâmetro dos axônios – 4 semanas após a lesão. As marcações “a, b, c, d, e” indicam semelhanças e diferenças estatísticas entre os grupos baseados no valor de P.

Decorridas 4 semanas da lesão nervosa, os diâmetros máximo, mínimo e o diâmetro axonal das fibras nervosas apresentaram diferenças entre os grupos examinados.

Em relação ao diâmetro máximo (**gráfico 5**), os grupos I ($9,03 \pm 1,89 \mu\text{m}$) e II ($8,68 \pm 2,19 \mu\text{m}$) foram semelhantes estatisticamente e apresentaram os maiores valores em comparação aos demais grupos do estudo. Enquanto, o grupo V ($8,05 \pm 1,74 \mu\text{m}$) foi semelhante apenas ao grupo II. Os grupos IV ($5,72 \pm 2,48 \mu\text{m}$) e VI ($6,23 \pm 2,54 \mu\text{m}$) também foram semelhantes entre si e o grupo III ($3,94 \pm 1,1 \mu\text{m}$) apresentou os menores valores entre todos os grupos para esse parâmetro morfológico.

Em relação ao diâmetro mínimo das fibras nervosas (**gráfico 6**) os grupos I ($6,26 \pm 1,26 \mu\text{m}$) II ($5,99 \pm 1,49 \mu\text{m}$) e V ($5,82 \pm 1,33 \mu\text{m}$) foram semelhantes entre si e apresentam, respectivamente, os maiores valores desse parâmetro. Os grupos VI ($4,94 \pm 1,95 \mu\text{m}$), IV ($4,39 \pm 1,86 \mu\text{m}$) são semelhantes entre si e por fim o grupo III ($3,22 \pm 0,99 \mu\text{m}$) é diferente de todos os grupos e com o menor valor para esse parâmetro.

Em relação ao diâmetro axonal (**gráfico 7**), o grupo I ($5,14 \pm 1,52 \mu\text{m}$) foi aquele com o maior valor significativo desse parâmetro, seguido pelos grupos V ($4,26 \pm 1,14 \mu\text{m}$) e II ($4,10 \pm 1,19 \mu\text{m}$) que foram semelhantes entre si, e posteriormente pelos grupos VI ($3,63 \pm 1,5 \mu\text{m}$), IV ($3,12 \pm 1,22 \mu\text{m}$) e III ($2,2 \pm 0,73 \mu\text{m}$) que revelaram diferenças significativas entre si.

Razão-G – 4 semanas

Kruskal-Wallis (Dunn)	
Comp.	Valor P
GI x GII	***<0,001
GI x GIII	ns >0,05
GI x GIV	ns >0,05
GI vs GV	***<0,001
GI x GVI	ns >0,05
GII x GIII	***<0,001
GII x GIV	***<0,001
GII x GV	***<0,001
GII x GVI	***<0,001
GIII x GIV	ns >0,05
GIII x GV	* <0,05
GIII x GVI	ns >0,05
GIV x GV	** <0,01
GIV x GVI	ns >0,05
GV x GVI	***<0,001

Gráfico 8 – Razão-G 4 semanas após a lesão. As marcações “a, b, c” indicam semelhanças e diferenças estatísticas entre os grupos baseados no valor de P.

Após 4 semanas da lesão nervosa os valores da razão-G (razão diâmetro axonal/diâmetro da fibra) (**gráfico 8**) revelam diferença entre os grupos do estudo. O grupo que apresentou o menor valor significativo da razão-G foi o grupo II ($0,475 \pm 0,079$), seguido pelo grupo V ($0,53 \pm 0,088$). Os grupos I ($0,566 \pm 0,094$), III ($0,558 \pm 0,097$), IV ($0,568 \pm 0,1$) e VI ($0,593 \pm 0,1$) apresentaram valores maiores que os grupos II e V e foram semelhantes entre si.

Espessura da bainha de mielina – 4 semanas

Kruskal-Wallis (Dunn)	
Comp.	Valor P
GI x GII	* <0,05
GI x GIII	***<0,001
GI x GIV	***<0,001
GI vs GV	ns >0,05
GI x GVI	***<0,001
GII x GIII	***<0,001
GII x GIV	***<0,001
GII x GV	***<0,001
GII x GVI	***<0,001
GIII x GIV	***<0,001
GIII x GV	***<0,001
GIII x GVI	***<0,001
GIV x GV	***<0,001
GIV x GVI	ns >0,05
GV x GVI	***<0,001

Gráfico 9 – Espessura da bainha de Mielina 4 semanas após a lesão. As marcações “a, b, c, d” indicam semelhanças e diferenças estatísticas entre os grupos baseados no valor de P.

Os dados referentes à espessura da bainha de mielina das fibras nervosas após 4 semanas da lesão nervosa (**gráfico 9**) revela diferença entre os grupos do estudo.

O grupo II ($2,29 \pm 0,72 \mu\text{m}$) apresentou a maior espessura da bainha de mielina, seguido pelos grupos I ($1,94 \pm 0,51 \mu\text{m}$) e V ($1,89 \pm 0,55 \mu\text{m}$) que foram semelhantes, posteriormente os grupos IV ($1,30 \pm 0,75 \mu\text{m}$) e VI ($1,30 \pm 0,67 \mu\text{m}$) que também foram semelhantes e por fim o grupo III ($0,87 \pm 0,31 \mu\text{m}$) foi o grupo com o menor valor significativo da espessura da bainha de mielina entre os grupos do estudo.

5.3.2 Grupo Experimental - 8 semanas após a lesão nervosa

Diâmetros máximo e mínimo da fibra nervosa e diâmetro axonal – 8 semanas

Gráfico 10 – Diâmetro máximo das fibras nervosas 8 semanas após a lesão. As marcações “a, b, c, d” indicam semelhanças e diferenças estatísticas entre os grupos baseados no valor de P

Gráfico 11 – Diâmetro mínimo das fibras nervosas 8 semanas após a lesão. As marcações “a, b, c, d” indicam semelhanças e diferenças estatísticas entre os grupos baseados no valor de P.

Gráfico 12 – Diâmetro Axonal – 8 semanas após a lesão. As marcações “a, b, c, d” indicam semelhanças e diferenças estatísticas entre os grupos baseados no valor de P.

Após 8 semanas do esmagamento dos nervos isquiático os parâmetros morfométricos relativo aos diâmetros máximo, mínimo e o diâmetro axonal da fibras nervosas apresentaram diferenças entre os grupos do estudo.

Em relação ao diâmetro máximo (**gráfico 10**), o grupo com os maiores valores dos diâmetros máximos das fibras nervosas foi o grupo I ($10,16 \pm 2,21 \mu\text{m}$), seguido pelos grupos II ($9,09 \pm 2,19 \mu\text{m}$), V ($9,02 \pm 2,22 \mu\text{m}$) e VI ($8,48 \pm 2,52 \mu\text{m}$) μm que foram semelhantes entre si. O grupo IV ($8,24 \pm 2,69 \mu\text{m}$) apresentou valor menor que o grupo II, no entanto foi semelhante aos grupos V e VI, e por fim o grupo III ($5,08 \pm 1,36 \mu\text{m}$) foi o grupo com os menores valores significativos do diâmetro máximo das fibras nervosas após 8 semanas do lesão.

Em relação do diâmetro mínimo das fibras nervosas (**gráfico 11**), os grupos com os maiores valores para esse parâmetro foram os grupos I ($7,11 \pm 1,42 \mu\text{m}$), II ($6,78 \pm 1,66 \mu\text{m}$) e V ($6,37 \pm 1,43 \mu\text{m}$). No entanto apenas o grupo V foi semelhante aos grupos IV ($5,95 \pm 1,56 \mu\text{m}$) e VI ($5,64 \pm 1,52 \mu\text{m}$) que também foram semelhantes entre si. O grupo III ($4,21 \pm 1,03 \mu\text{m}$) foi aquele que apresentou os menores valores desse parâmetro após 8 semanas da lesão nervosa.

O grupo que mostrou o maior diâmetro axonal (**gráfico 12**) foi o grupo I ($5,82 \pm 1,68 \mu\text{m}$), seguido pelo grupo II ($5,05 \pm 1,43 \mu\text{m}$). Os grupos V ($4,66 \pm 1,22 \mu\text{m}$) e VI ($4,73 \pm 1,58 \mu\text{m}$) apresentaram menores valores em relação ao grupo I, foram semelhantes entre si e também revelaram semelhança com os grupos II e IV ($4,36 \pm 1,38 \mu\text{m}$). Novamente o grupo III ($2,68 \pm 0,91 \mu\text{m}$) foi diferente de todos os demais

grupos, revelando os menores valores desses parâmetros após 8 semanas da lesão nervosa.

Razão-G – 8 semanas

Gráfico 13 – Razão-G 8 semanas após a lesão. As marcações “a, b, c” indicam semelhanças e diferenças estatísticas entre os grupos baseados no valor de P.

Após 8 semanas em relação a Razão-G (razão diâmetro axonal/diâmetro da fibra) foram notadas diferenças (**gráfico 13**). Os grupos com os menores valores da razão-G foram os grupos III ($0,52 \pm 0,078$), e V ($0,521 \pm 0,084$) que foram semelhantes entre si e com o grupo IV ($0,538 \pm 0,092$). O grupo IV por sua vez foi semelhante também aos grupos II ($0,556 \pm 0,074$) e VI ($0,557 \pm 0,087$). Os grupos I ($0,567 \pm 0,078$), II e VI apresentaram os maiores valores desse parâmetro nesse período de análise e também foram semelhantes entre si.

Espessura da bainha de mielina – 8 semanas

Gráfico 14 – Espessura da bainha de Mielina 8 semanas após a lesão. As marcações “a, b, c, d” indicam semelhanças e diferenças estatísticas entre os grupos baseados no valor de P.

A análise da espessura da bainha de mielina das fibras nervosas após 8 semanas da lesão nervosa (**gráfico 14**) revela que os grupos I ($2,169 \pm 0,497 \mu\text{m}$), II ($2,021 \pm 0,593 \mu\text{m}$) e V ($2,178 \pm 0,726 \mu\text{m}$) foram semelhantes estatisticamente e apresentaram as maiores espessuras das bainhas de mielina. O grupo IV ($1,94 \pm 0,82\mu\text{m}$) foi semelhante ao grupo II e ao grupo VI ($1,874 \pm 0,696 \mu\text{m}$), e o grupo III ($1,202 \pm 0,324 \mu\text{m}$) foi diferente de todos os outros grupos apresentando a menor espessura da bainha de mielina nesse período de análise.

5.4 Reação Imunohistoquímica – Anticorpos: anti-NGF e anti-VEGF

5.4.1 Grupo Experimental - 4 semanas após a lesão nervosa

Estão apresentados na sequência as fotomicrografias para a análise qualitativa das marcações das reações imunohistoquímicas (peroxidase) para demonstrar *in situ* a atividade dos fatores de crescimento neural (NGF) e do endotélio vascular (VEGF) após 4 semanas da lesão no nervo isquiático.

NGF – Fator de crescimento neural – 4 semanas**Figura 11 – Imunomarcacão do NGF, 4 semanas (Grupos I, II e III)**

A e B – Grupo I (controle) – Marcação positiva para o NGF (seta); **C e D – Grupo II (exposto)** – Marcação positiva para o NGF (seta); **E e F – Grupo III (lesado)** – Marcação positiva para o NGF no endoneuro (*) e epineuro (seta). Aumentos: 400X.

Figura 12 – Imunomarcação do NGF, 4 semanas (Grupos IV, V e VI)

A e B – Grupo IV (LBI) – Marcação positiva para o NGF no endoneuro (*) e epineuro (seta) e capilares (cabeça de seta); **C e D – Grupo V (Proteína P1)** - Marcação positiva para o NGF no endoneuro (*) e epineuro (seta) e capilares (cabeça de seta); **E e F – Grupo VI (LBI e Proteína P1)** - Marcação positiva para o NGF no endoneuro (*) e epineuro (seta) e capilares (cabeça de seta). Aumentos: 400X.

Após 4 semanas da lesão nervosa o **grupo I** (controle) não revelou imunorreatividade do fator de crescimento neural (NGF) (figuras 11A e B) entre as fibras nervosas, foi observada leve marcação positiva apenas na região mais periférica do epineuro. No **grupo II** (nervo exposto) a imunorreatividade do NGF (figuras 11C e D) mostra leve marcação positiva apenas na região do epineuro. No **grupo III** (nervo lesado) foi observada uma grande atividade do NGF (figuras 11E e

F) com uma forte marcação entre as fibras nervosas na região do endoneuro e também na região do epineuro. O **grupo IV** (nervo lesado tratado com LBI) revelou forte marcação positiva para o NGF (figuras 12A e B) entre as fibras nervosas e nas porções mais internas do epineuro, porém nesse caso a marcação foi menos intensa que a observada no grupo III. O fator NGF no nervo isquiático dos animais do **grupo V** (nervo lesado tratado com proteína P1) (figuras 12C e D) revelou marcação positiva entre as fibras nervosas e na região do endoneuro, além da região do epineuro, a intensidade da marcação do NGF nesse grupo foi maior que no grupos I e II, porém menor a do grupo III e IV. No **grupo VI** (nervo lesado tratado com LBI e proteína P1), nota-se a imunorreatividade do NGF (figuras 12E e F) entre as fibras nervosas e marcação positiva da região do epineuro que foi mais intensa que o grupo V e similar ao grupo IV.

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular, 4 semanas

Figura 13 – Imunomarcação do VEGF, 4 semanas

A. Grupo I (controle) – Marcação positiva para o VEGF nos capilares (seta); **B. Grupo II (exposto)** – Marcação positiva para o VEGF nos capilares (seta); **C. Grupo III (lesado)** – Marcação positiva para o VEGF no endoneuro (*); **D. Grupo IV (LBI)** – Marcação positiva para o VEGF nos capilares (seta) e no endoneuro (cabeça de seta); **E. Grupo V (proteína P1)** – Marcação positiva para o VEGF nos capilares (seta) e no endoneuro (cabeça de seta); **F. Grupo VI (LBI e proteína P1)** – Marcação positiva para o VEGF nos capilares (seta) e no endoneuro (cabeça de seta). Aumentos: 400X.

Após 4 semanas da lesão nervosa foram observadas marcações positivas para fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em todos os grupos

experimentais. Nos **grupos I** (controle, figura 13A) e **II** (exposto, figura 13B) foram observadas marcações positivas nas regiões de capilares sanguíneos. No **grupo III** (lesado, figura 13C) ocorreu marcação positiva na região dispersa entre as fibras nervosas na região do endoneuro. No **grupo IV** (LBI, figura 13D) nota-se fraca marcação positiva entre as fibras nervosas, na região do epineuro e nas células endoteliais. Os **grupos V** (proteína P1, figura 13E) e **VI** (LBI e proteína P1, figura 13F) apresentaram uma marcação para o VEGF com maior intensidade em comparação com os demais grupos experimentais, localizadas nas células endoteliais e entre as fibras nervosas dispersa na região do endoneuro.

5.4.2 Grupos Experimentais - 8 semanas após a lesão nervosa

A seguir estão as fotomicrografias da análise dos dados obtidos pelas marcações das pelas reações imunohistoquímica (peroxidase) para demonstrar *in situ* a atividade dos fatores de crescimento neural (NGF) e do endotélio vascular (VEGF) após 8 semanas da lesão no nervo isquiático.

NGF – Fator de crescimento neural, 8 semanas

Figura 14 – Imunomarcção do NGF, 8 semanas

A. Grupo I (controle) – Marcação positiva para o NGF no epineuro (seta); **B. Grupo II (exposto)** – Marcação positiva para o NGF no perineuro (seta); **C. Grupo III (lesado)** - Marcação positiva para o NGF no endoneuro (setas); **D. Grupo IV (LBI)** - Marcação positiva para o NGF no endoneuro (setas); **E. Grupo V (proteína P1)** - Marcação positiva para o NGF no epineuro (seta); **F. Grupo VI (LBI e proteína P1)** - Marcação positiva para o NGF no epineuro (seta). Aumentos: 400X.

Decorridas 8 semanas da manipulação nervosa o **grupo I** (controle, fig 14A) revelou fraca imunorreatividade do fator de crescimento neural (NGF) localizada na região do epineuro. O **grupo II** (exposto, figura 14B), também revelou fraca

marcação positiva para NGF entre as fibras nervosas em especial na região do perineuro. O **grupo III** (lesado, figura 14C) revelou marcação positiva para o fator NGF principalmente na região epineural e entre as fibras nervosas, essa marcação foi mais intensa em comparação aos demais grupos, além disso, foi bem menos intensa quando comparado ao grupo III avaliado no período anterior de 4 semanas. O **grupo IV** (LBI, figura 14D) revelou fraca marcação positiva para o NGF entre as fibras nervosas nas regiões do endo e perineuro, nesse caso a marcação foi menos intensa que a observada no grupo III e com o grupo IV analisado após 4 semanas da lesão nervosa. Nos **grupos V** (proteína P1, figura 14E) e **VI** (LBI e proteína P1, figura 14F) foram notadas fracas marcações positivas para o NGF principalmente na região do epineuro, e como aconteceu com os grupos anteriores, a marcação para esse fator foi menos intensa quando foram comparadas aos grupos V e VI após 4 semanas da lesão nervosa.

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular, 8 semanas

Figura 15 – Imunomarcação do VEGF, 8 semanas

A. Grupo I (controle) – Marcação positiva para o VEGF nos capilares (seta) e no endoneuro (cabeça de seta); **B. Grupo II (exposto)** – Marcação positiva para o VEGF nos capilares (seta); **C. Grupo III (lesado)** - Marcação positiva para o VEGF nos capilares (seta); **D. Grupo IV (LBI)** - Marcação positiva para o VEGF nos capilares (seta) e no endoneuro (cabeça de seta); **E. Grupo V (proteína P1)** - Marcação positiva para o VEGF nos capilares (seta) e no endoneuro (cabeça de seta). **F. Grupo VI (LBI e proteína P1)** - Marcação positiva para o VEGF nos capilares (seta) e no endoneuro (cabeça de seta). Aumentos: 400X.

Em relação ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) após 8 semanas, as marcações foram fracas e semelhantes nos **grupos I** (controle, figura 15A), **II** (exposto, figura 15B) e **IV** (LBI, figura 15C) localizadas principalmente nas

células endoteliais. O **grupo III** (lesado, figura 15D) apresentou imunoreatividade para o VEGF ainda mais fraca quando comparado com os grupos citados anteriormente, essa marcação foi localizada nas células endoteliais e se mostrou quase nula. Os **grupos V** (proteína P1, figura 15E) e **VI** (LBI e proteína P1, figura 15F) apresentaram marcações positivas para esse fator mais forte em comparação aos demais grupos nesse período de análise, essas marcações estão localizadas principalmente nas células endoteliais e seus entornos.

5.4.3 Controle negativo das reações de imunohistoquímica

Figura 16 – Imunohistoquímica, controle negativo

A. GIV (LBI), 4 semanas - controle negativo. **B. GIV (LBI), 4 semanas** – Marcação positiva para o NGF. Aumento: 100X.

As figuras 16 A e B são fotomicrografias de cortes seriados de regiões similares do grupo IV (LBI) analisado após 4 semanas da lesão. A figura 16A representa a reação de controle negativo em relação à figura 16B que representa a marcação positiva para o fator de crescimento neural (NGF). Notou-se que não houve marcação positiva na figura 16A, fato esse que comprova que nas reações de imunolocalização anteriores, o que de fato é marcado pelas reações é a imunorreatividade dos fatores de crescimento alvo dos anticorpos primários e amplificadas pelo anticorpo secundário.

5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução – MEV-AR

5.5.1 Grupos experimentais analisados 4 semanas após a lesão nervosa

Figura 17 – MEV-AR – Grupo I, controle - 4 semanas

A. Grupamento de fibras nervosas (*) e células epineurais (setas) do nervo isquiático. Aumento: 70X. **B.** Feixes de fibra nervosas(*) divididas pelos perineuro (setas). Aumento: 300X. **C.** Fibras nervosas mielinicas densamente agrupadas (seta) e perineuro (*). Aumento: 1.500X. **D.** Neurofilamentos do axoplasma (a) e as fibras colágenas do endoneuro (setas). Aumento: 15.000X.

Após 4 semanas do experimento a observação ao microscópio eletrônico de varredura do **grupo I** (controle) revelou a presença das fibras nervosas do nervo isquiático e suas células perineurais adjacentes (figura 17A). Em maior aumento notou-se a densa organização das numerosas fibras nervosas divididas em feixes com diferentes orientações (figura 17B). As fibras nervosas criofraturada foram vistas com maiores detalhes na figura 17C com diâmetros variados e o espaço

correspondente e o epineuro de tamanho normal. Em detalhe observa-se na fibra nervosa mielínica a rede de neurofilamentos compondo a região do axoplasma e a organização das fibras colágenas do endoneuro (figura 17D).

Figura 18 – MEV-AR - Grupo II, exposto - 4 semanas

A. Fibras nervosas (*) de diâmetros variados. Aumento: 1.500X. **B.** Fibras nervosas mielínicas (*) e colágeno do endoneuro (setas). Aumento: 2.500X. **C.** Axoplasma (a), bainha de mielina (seta), fibras colágenas do endoneuro (cabeça de seta). Aumento: 15.000X. **D.** Fibra nervosa mielínica revelando a textura da lâmina basal da célula de *Schwann* (seta) com característica rugosa. Aumento: 20.000X.

Decorridas 4 semanas da exposição nervosa dos animais o exame das amostras ao microscópio eletrônico de varredura do **grupo II** (nervo exposto) revela uma compacta organização das fibras nervosas com diâmetro variado e características normais (figura 18A). Em maior aumento (figura 18B) é possível notar fibras mielínicas envolvidas por fibras colágenas do endoneuro. Na figura 18C o axoplasma revela o seu conteúdo de uma rede entrelaçada de neurofilamentos, as

lamelas que compõe a bainha de mielina e as fibras colágenas do endoneuro em maior detalhe. A lâmina basal da célula de *Schwann* que envolve a fibra mielínica se revela com textura rugosa contendo cavitações (figura 18D).

Figura 19 – MEV-AR - Grupo III, lesado - 4 semanas

A. Fibras nervosas (setas) e espaçamento no endoneuro (*). Aumento: 2.000X. **B.** Área de degeneração de fibras nervosas (*), fibras colágenas do endoneuro (setas). Aumento: 10.000X. **C.** Fibra nervosa de calibre reduzido (seta) e fibras colágenas do endoneuro (*). Aumento: 15.000X. **D.** Fibras nervosas envolvidas pela célula perineural (cabeça de seta) e colágeno do endoneuro (*). Aumento: 20.000X.

O exame ao microscópio eletrônico de varredura das amostras nervo isquiático do **grupo III** (lesado), após 4 semanas do experimento, mostra o aspecto geral com fibras nervosas de diâmetro reduzido e com organização bem distinta daquelas observadas nos grupos anteriores, contendo espaçamento na região do endoneuro (figura 19A). Em maior aumento é possível notar áreas de degeneração de fibras nervosas (figura 19B) e grande quantidade de fibras colágenas no endoneuro. Em

detalhes observa-se uma fibra nervosa de diâmetro reduzido com o axoplasma revelando uma rede do neurofilamentos, e sua bainha de mielina com suas lamelas e uma espessa camada de fibras colágenas da região do endoneuro (figura 19C). Na figura 19D nota-se um grupamento com duas fibras nervosas de calibre reduzido envolvida pela célula perineural e espessa camada de fibras colágenas.

Figura 20 – MEV-AR - Grupo IV, LBI - 4 semanas

A. Fibras nervosas com bainha de mielina delgada (setas). Aumento: 1.500X. **B.** Grupamento de fibras nervosas (setas), fibras colágenas do endoneuro (cabeça de seta). Aumento: 5.000X. **C.** Fibras nervosas (setas) envolvidas pela célula perineural (cabeça de seta). Aumento: 10.000X. **D.** Fibras nervosas com bainha de mielina delgada (seta), axoplasma (a), fibras colágenas (cabeça de seta). Aumento: 15.000X.

Após 4 semanas da lesão nervosa do **grupo IV** (nervo lesados e tratado com LBI), a característica geral revela fibras nervosas com bainhas de mielina visivelmente mais delgadas em comparação aos grupos I e II e maior diâmetro em comparação ao grupo III, além da existência de áreas de degeneração (figura 20A).

Na figura 20B em maior aumento notam-se fibras nervosas de diversos calibres, com menor quantidade de colágeno no endoneuro e em alguns casos essas fibras nervosas se agrupam em pequeno número. Em maior aumento observa-se um agrupamento contendo 4 fibras nervosas envolvidas por uma célula perineural (figura 20C). Em detalhe um grupamento com duas fibras nervosas, de calibres distintos e delgadas bainhas de mielina, mostra o conteúdo do axoplasma com a rede de neurofilamentos e fibras colágenas ao redor envolvidas pelo citoplasma da célula perineural (figura 20D).

Figura 21 – MEV-AR - Grupo V, proteína P1 - 4 semanas

Figura 21 – MEV-AR - Grupo V (proteína P1) 4 semanas – A. Fibras nervosas (setas), células perineurais (cabeça de seta) e capilar sanguíneo (*). Aumento: 1.500X. **B.** Área de degeneração (*), núcleo da célula perineural (seta), fibras colágenas no endoneuro (cabeça de seta). Aumento: 5.000X. **C.** Fibras mielínicas de pequeno calibre (setas), núcleo das células de Schwann (cabeça de seta). Aumento: 10.000X. **D.** Axoplasma (a) com poucos neurofilamentos, citoplasma da célula de Schwann (seta) e fibras colágenas do endoneuro (cabeça de seta). Aumento: 15.000X.

Na quarta semana pós-operatória da lesão nervosa, a análise tridimensional do **grupo V** (nervo tratado com proteína P1) ao microscópio eletrônico de varredura revelou fibras nervosas de diâmetro reduzido, grande número células perineurais com núcleo evidente e vasos sanguíneos (figura 21A). Em maior aumento notam-se áreas de degeneração de fibras nervosas, bainhas de mielina com pequena espessura, núcleos das células de *Schwann* e menor quantidade de colágeno no endo e perineuro envolvendo as fibras nervosas em comparação ao grupo III, essas características se assemelham às aquelas observadas no grupo IV (figura 21B). A figura 21C mostra grupamento de duas fibras mielínicas de tamanho reduzido com bainha de mielina compacta adjacente ao núcleo das células de *Schwann* que nesse caso são maiores que as fibras nervosas. Em detalhe outro pequeno grupamento de fibras nervosas revela o axoplasma com poucos neurofilamentos, citoplasma da célula de *Schwann* envolvendo as fibras mielínicas e por sua vez sendo envolvido por fibras colágenas da região do endoneuro (figura 21D).

Figura 22 – MEV-AR - Grupo VI, LBI e proteína P1 - 4 semanas

A. Áreas de degeneração (setas) entre as fibras nervosas (*). Aumento:1.000X. **B.** Fibras nervosas (setas), núcleos das células de Schwann (cabeças de seta) e fibras colágenas do endoneuro (*). Aumento: 5.000X. **C.** Grupamento de fibras mielínicas envolvidas pelas células de Schwann (seta) e fibras colágenas do endoneuro (cabeça de seta). Aumento: 10.000X. **D.** Axoplasma (a) e bainha de mielina (seta) da fibra nervosa de calibre reduzido, fibras colágenas do endoneuro (*). Aumento: 15.000X.

As análises ao microscópio eletrônico de varredura das amostras do segmento no nervo isquiático lesado do grupo VI (nervo lesados e tratados com proteína P1 e o LBI) após 4 semanas do experimento mostraram uma densa organização das fibras nervosas de diâmetro reduzido e células de Schwann, porém com áreas de degeneração ainda presentes (figura 22A). Em maior aumento observa-se a relação entre várias células de Schwann com núcleo evidente e as fibras nervosas mielínicas de diâmetro reduzido, além das fibras colágenas do endoneuro em quantidade e organização similar aos grupos IV e V (figura 22B). A figura 22C revela detalhes de um agrupamento com 4 fibras mielínicas com diâmetros e formatos variados envolvidas pelo citoplasma da célula perineural e fibras colágenas do endoneuro. Em detalhe na figura 22D observa-se uma fibra nervosa mielínica

de diâmetro reduzido envolvida por muitas fibras colágenas do endoneuro e revelando o axoplasma com a rede de neurofilamentos.

5.5.2. Grupos experimentais analisados 8 semanas após a lesão nervosa

Figura 23 – MEV-AR - Grupo I, controle - 8 semanas

A. Fibras nervosas de tamanhos variados (setas) - Aumento: 1.000X. **B.** Fibras nervosas (setas) e citoplasma da célula de *Schwann* (*). Aumento 5.000X. **C.** Fibras colágenas do endoneuro com diferentes orientações e organizações (setas). Aumento: 7.500X. **D.** Neurofilamentos do axoplasma (a), fibras colágenas do endoneuro (seta) e citoplasma da célula de *Schwann* (*). Aumento:10.000X.

Após 8 semanas da manipulação dos animais, a análise da superfície do grupo I (controle) revelou a característica interna do nervo isquiático normal com grande densidade de fibras nervosas de diâmetros variadas e organização compacta (figura 23A). Em maior aumento foi possível observar a relação de proximidade dessas fibras com uma delas envolvida pelas células de *Schwann* (figura 23B). Na porção

lateral da fibra nervosa observa-se a organização das fibras colágenas da região do endoneuro que mantém uma relação íntima com a fibra e mostra diversas orientações (figura 23C). Na figura 23D foi possível observar a organização em forma de rede dos neurofilamentos presentes no axoplasma da fibra nervosa, além da célula de *Schwann* com núcleo evidente envolvendo a fibra e as fibras colágenas do endoneuro externamente a essas estruturas.

Figura 24 – MEV-AR - Grupo II, exposto - 8 semanas

A. Fibras nervosas (setas), células de *Schwann* (*). Aumento: 5.000X. **B.** Células de *Schwann* (*) e fibras colágenas do endoneuro (setas). Aumento: 10.000X. **C.** Lamelas mielínicas concêntricas (setas) envolvendo o axoplasma (a). Aumento: 10.000X. **D.** Axoplasma com rede de neurofilamentos (*) e mitocôndrias (setas). Aumento: 30.000X.

Decorridas 8 semanas da exposição nervosa a análise ao microscópio eletrônico de varredura do grupo II (nervo exposto) revelou organização normal e compacta das fibras nervosas de forma e tamanho variado, com a presença de componentes

internos como células da neuroglia e fibras colágenas do endoneuro (figura 24A). Em maior aumento foram notadas as células de *Schwann* e as fibras colágenas do endoneuro envolvendo as fibras nervosas (figura 24B) e as várias lamelas das bainhas de mielina ao redor do axoplasma das fibras nervosas que por sua vez também é envolvida pelo citoplasma da célula de Schwann (figura 24C). Em detalhe foi possível observar a rede de neurofilamentos do axoplasma contendo mitocôndrias e a grande quantidade de fibras colágenas que constitui o endoneuro (figura 24D).

Figura 25 – MEV-AR - Grupo III, lesado - 8 semanas

A. Pequenos grupamentos de fibras nervosas (setas) envolvidas por células perineurais. Aumento: 1.500X. **B.** Fibras nervosas (setas), núcleo das células de *Schwann* (cabeça de seta) e fibras colágenas do endoneuro (*). Aumento: 5.000X. **C.** Bainhas de mielina de pequena espessura (setas) e células perineurais (cabeça de seta). Aumento: 8.000X. **D.** Axoplasma (a) das fibras nervosas com poucos filamentos (setas). Aumento: 10.000X.

O **grupo III** (nervo lesado sem tratamento) após 8 semanas da lesão nervosa revelou aspecto geral de organização compacta com fibras mielínicas de calibres variados e células perineurais (figura 25A). Em maior aumento é possível observar agrupamentos de poucas fibras nervosas de diâmetros variados envolvidos pelas células perineurais e fibras colágenas do endoneuro, nesse período de análises nota-se menor espessura dessa camada de colágeno do endoneuro em comparação ao período anterior, além da maior organização desses grupamentos de fibras nervosas dada pela presença das células perineurais (figura 25B e 25C). O axoplasma de algumas fibras nervosas revela o seu interior contendo grande quantidade de neurofilamentos formando uma rede bem organizada e em outras fibras essa organização não se mostrou tão densa e desorganizada (figura 25D).

Figura 26 – MEV-AR - Grupo IV, LBI - 8 semanas

A. Fibras nervosas (seta) e núcleos das células perineurais (cabeça de seta). Aumento: 1.500X. **B.** Fibras mielínicas de calibre reduzido (setas) e fibras colágenas do endoneuro (*). Aumento: 5.000X. **C.** Fibras nervosas com bainhas de mielina delgadas (setas) ao redor do núcleo da célula de *Schwann* (*). Aumento: 7.000X. **D.** Fibra nervosa mielínica de tamanho reduzido em meio as fibras colágenas do endoneuro (seta) revelando a textura da lâmina basal da célula de *Schwann* (*). Aumento: 25.000X.

Na oitava semana pós-operatória o **grupo IV** (lesado tratado com LBI) mostrou uma densa organização da morfologia interna do nervo isquiático contendo células perineurais e fibras mielínicas de diversos tamanhos organizadas em pequenos grupamentos (figura 26A). Na figura 26B observa-se uma região com fibras mielínicas de diversos calibres que já não evidencia a característica de grupamento de poucas fibras de uma forma tão clara como observado no grupo III e nos grupos lesados e tratados após 4 semanas da lesão. No entanto, ainda são observadas fibras mielínicas com calibre reduzido e principalmente com a bainha de mielina de menos espessa (figura 26C). O axoplasma dessas fibras nervosas revela

neurofilamentos que formam rede com características semelhantes aos grupos não lesados (figuras 26B e 26C). Em detalhe uma fibra nervosa mielínica apresenta-se em meio à várias fibras colágenas do endoneuro e revela o aspecto rugoso da lâmina basal da célula de *Schwann* (figura 26D).

Figura 27 – MEV-AR - Grupo V, proteína P1 - 8 semanas

A. Fibras nervosas (*) e espaçamento entre elas (seta). Aumento: 1.500X. **B.** Espaço entre as fibras nervosas (setas), células de *Schwann* (*) e fibras colágenas do endoneuro (cabeça de seta). Aumento: 5.000X. **C.** Citoplasma da célula de *Schwann* (setas) ao redor das fibras nervosas. Aumento: 10.000X. **D.** Axoplasma das fibras nervosas (*) com várias lamelas de mielina (cabeças de seta) e as fibras colágenas do endoneuro (setas). Aumento: 25.000X.

A análise ao microscópio eletrônico de varredura após 8 semanas da lesão nervosa do **grupo V** (nervos lesados que receberam a aplicação da proteína P1) revelou grupamentos de fibras nervosas e seu componentes íntegros com formatos e diâmetros variados porém com a presença de espaços entre elas, no entanto

nesse grupo foram ainda observados agrupamentos de fibras nervosas em pequenos feixes porém com a presença menos evidente das células perineurais, a qualidade das fibras nervosas desse grupo se assemelha as observadas nos grupos I e II (figura 27A). Na figura 27B foram notados os espaços entre os grupamentos de fibras nervosas e a presença de fibras colágenas do endoneuro e as células de *Schwann*, porém nesse caso as fibras nervosas apresentaram calibre maior e principalmente maior espessura da bainha de mielina em comparação ao mesmo grupo no período anterior de análise e também aos grupos III e IV após 8 semanas da lesão nervosa. Em maior aumento um grupamento de fibras nervosas mielínicas mostrou características normais quanto as fibras e as célula de *Schwann* que as envolve, e nesse caso o axoplasma apresenta-se denso com muitos neurofilamentos assemelhando-se as grupos não lesados (figura 27C). Em detalhe a fibra nervosa mielínica revelou a bainha de mielina com suas diversas lamelas, axoplasma contendo uma densa rede de neurofilamentos, o citoplasma da célula de *Schwann* envolvendo a fibra que por sua vez é envolvida pelas fibras colágenas do endoneuro (figura 27D).

Figura 28 – MEV-AR – Grupo VI, LBI e proteína P1 - 8 semanas

A. Grupamento de fibras nervosas (*) de vários diâmetros. Aumento: 3.000X. **B.** Espaço entre os grupamentos de fibras nervosas (*) e fibras colágenas do endoneuro (setas). Aumento: 10.000X. **C.** Relação das fibras mielínicas (setas) com a célula de *Schwann* com núcleo evidente (*). Aumento: 15.000X. **D.** Lamelas de mielina (setas), axoplasma (a) e as fibras colágenas do endoneuro (cabeça de seta). Aumento: 15.000X.

Na oitava semana pós-operatória, a análise da superfície criofraturada ao microscópio eletrônico de varredura do **grupo VI** (nervo lesado que recebeu a aplicação da proteína P1 e a irradiação do LBI) revelou a organização das fibras nervosas divididas em feixes com características semelhantes às observadas no grupo V, contendo fibras nervosas de vários diâmetros e formatos, presença de pequeno espaçamento entre as fibras que nesse caso foi menor que aqueles do grupo V e pequenos grupamentos de fibras nervosas não tão evidentes como os grupos lesados e analisados após 4 semanas e os grupos III e IV avaliados após 8 semanas (figura 28A). Em maior aumento observam-se os grupamentos de fibras nervosas com características normais e o pequeno espaçamento entre eles, além da

presença das fibras colágenas do endoneuro com características similares aos grupos não lesados (figura 28B). Em detalhe foi possível observar a relação das fibras mielínicas com as células de *Schwann* cujo núcleo tem a dimensão similar ao diâmetro da fibra nervosa que ela envolve (figura 28C); e a organização da bainha de mielina com diversas lamelas concêntricas, envolvendo um denso axoplasma constituído da rede de neurofilamentos e grande quantidade de fibras colágenas na região do endoneuro (figura 28D).

5.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

5.6.1 Grupos experimentais analisados 4 semanas após a lesão nervosa

Figura 29 – MET - Grupo I, controle - 4 semanas

A. Conjunto de fibras mielínicas (fm) e amielínicas (fa). Aumento: 2.000X. **B.** Axoplasma das fibras mielínicas (*) contendo mitocôndrias (setas). Aumento: 6.000X. **C.** Núcleo (n) da célula de *Schwann* envolvendo uma fibra nervosa mielínica (fm). Aumento: 20.000X. **D.** Citoplasma da célula de *Schwann* (cs), fibras colágenas do endoneuro (c) e axoplasma da fibra nervosa (*). Aumento: 40.000X.

Após 4 semanas da manipulação dos animais o **grupo I** (controle) revela o aspecto normal do nervo isquiático, em que não foram observadas alterações, com a presença de fibras nervosas mielínicas e amielínicas de vários diâmetros organizadas em grupamentos tendo a maior parte das fibras mielínicas com espessas bainhas de mielina (figura 29A). Em maior aumento foi observado o conteúdo axoplasmático das fibras nervosas mielínicas e amielínicas, revelando a

presença de mitocôndrias e neurofilamentos. Na região periférica das fibras notou-se as fibras colágenas sem alterações por toda a região do endoneuro (figura 29B). Na figura 29C, com aumento ainda maior, verificou-se o núcleo da célula de *Schwann* cujo citoplasma envolve uma fibra mielínica, na região adjacente notou-se novamente as fibras colágenas que constituem o endoneuro e a algumas fibras nervosas amielínicas. A figura 29D mostra em detalhe uma parte da lâmina citoplasmática da célula de *Schwann*, as fibras colágenas do endoneuro na área adjacente, além de parte da bainha de mielina de uma fibra nervosa e seu conteúdo axoplasmático onde estão presentes neurofilamentos e mitocôndrias.

Figura 30 – MET - Grupo II, exposto - 4 semanas

A. Grupamento de fibras mielínicas (fm) e poucas fibras amielínicas (setas). Aumento 2.000X. **B.** Notam-se as bainhas de mielina (bm) e o axoplasma (a) contendo mitocôndrias (setas) das fibras mielínicas. Aumento 6.000X. **C.** Citoplasma da Célula de *Schwann* (sc) e o seu núcleo volumoso (c). Aumento 6.000X. **D.** Grupamento de fibras amielínicas (setas) e as fibras colágenas (*) do endoneuro. Aumento 7.500X.

O **grupo II** (nervo exposto) revelou após 4 semanas grande quantidade de fibras mielínicas de variados tamanhos e formato predominantemente arredondado, algumas fibras amielínicas foram observadas separadas em feixes, essas fibras apresentaram diâmetros e formas variadas (figura 30A). Em maior aumento o conteúdo do axoplasma das fibras mielínicas, contendo várias mitocôndrias e a rede neurofilamentos (figura 30B), além das características do citoplasma células de *Schwann* ao redor de uma fibra nervosa mielínica e seu conteúdo no qual são observadas organelas e o seu núcleo volumoso, foi notada ainda a densa quantidade de fibras colágenas preenchendo a região do endoneuro entre as fibras nervosas (figura 30C). Na figura 30D observa-se um grupamento de fibras nervosas amielínicas ao redor de fibras nervosas mielínicas de grande diâmetro, novamente está presentes uma densa quantidade de fibras colágenas na região do endoneuro.

Figura 31 – MET - Grupo III, lesado - 4 semanas

A. Fibras nervosas mielínicas de diâmetro reduzido tendendo a se organizar em pequenos feixes (setas), *debris* de mielina na área de degeneração *Walleriana* (d). Aumento: 2.000X. **B.** Abundante quantidade de fibras colágenas do endoneuro (*), macrófago formando uma célula espumosa (seta). Aumento: 3.000X. **C.** Mastócito (mc) contendo grânulos internos eletrondensos, restos da lâmina basal da célula de *Schwann* (setas). Aumento: 7.500X. **D.** Restos da lâmina basal da célula de *Schwann* (lb), fibras colágenas do endoneuro (*) e fibra nervosa com delgada bainha de mielina (seta). Aumento 10.000X.

Decorridas 4 semanas da lesão, o nervo isquiático dos animais do **grupo III** (lesão nervosa sem tratamento) mostrou o aspecto geral (figuras 31A e 31B) com uma grande redução na quantidade e tamanho de fibras nervosas, presença de áreas de degeneração *Walleriana* com *debris* de mielina, aumento na quantidade de colágeno na região do endoneuro que tomou o espaço previamente ocupado pelos componentes fisiológicos do nervo. Além disso, notou-se a característica inicial de agrupamento de fibras nervosas em pequenos feixes realizado por células perineurais e a presença células espumosas, que são macrófagos ativos cujo

citoplasma contém vacúolos preenchidos por lipídeos. Na figura 31C observou-se na região do endoneuro entre as fibras nervosas, a presença de um mastócito, uma célula globulosa do tecido conjuntivo que desempenha importante função nas reações imunes, alérgicas, na inflamação, e na expulsão de parasitas. Em maior aumento foi possível observar estruturas lineares que representam os restos das lâminas basal das células de *Schwann* que envolviam as fibras nervosas que foram degeneradas, essas estruturas lineares estão envoltas por fibras colágenas da região do endoneuro, além da presença de fibras nervosas com delgadas bainhas de mielina que sugere a remielinização das mesmas (figura 31D).

Figura 32 – MET - Grupo IV, LBI - 4 semanas

A. Pequenos agrupamentos de fibras nervosas de pequeno calibre (setas) e áreas de fibras colágenas (*). Aumento: 2.000X. **B.** Área de degeneração de fibras nervosas (*) células perineurais formando feixes de fibras nervosas (seta), célula de *Schwann* reativa envolvendo fibras amielínicas (cabeça de seta). Aumento: 5.000X. **C.** Mastócito (seta) próximo de um capilar (*). Aumento: 2.000X. **D.** Bainha de mielina (*) e mitocôndrias (setas). Aumento: 30.000X.

Após 4 semanas, as características morfológicas do **grupo IV** (nervo lesado tratado com LBI) revelaram um aspecto geral semelhante ao observado no grupo III, uma vez que as fibras nervosas tem menor diâmetro e surgiram entre elas grandes espaços ocupados por fibras colágenas no endoneuro (figura 32A). Essas grandes áreas preenchidas por fibras colágenas apareceram devido à degeneração das fibras nervosas após o esmagamento nervoso, as poucas fibras mielínicas que restaram estavam envolvidas pelas células perineurais formando pequenos feixes, notou-se ainda a presença de células de Schwann reativas envolvendo fibras nervosas amielínicas de pequeno calibre (figura 32B). Nesse grupo também foram observados mastócitos entre as fibras nervosas na região do endoneuro (figura 32C). Em detalhe foram notadas as características morfológicas das bainhas de mielina das fibras íntegras, com suas várias lamelas, e as mitocôndrias presentes no axoplasma de fibras a mielínicas e do citoplasma da célula de *Schwann* (figura 32D).

Figura 33 – MET - Grupo V, proteína P1 - 4 semanas

A. Agrupamentos de fibras mielínicas (*) e amielínicas (setas). Aumento: 2.000X. **B.** Mastócito (mc) entre as fibras nervosas e uma fibra em fase de remielinização (*). Aumento: 5.000X. **C.** Fibra mielínica (fm) e amielínica (setas), colágeno do endoneuro (c), célula de *Schwann* (cs) e área de remielinização (*) Aumento: 10.000X. **D.** Lamelas da bainha de mielina (setas), região do axoplasma (*) e fibras colágenas do endoneuro (c). Aumento: 75.000X.

No **grupo V** (nervo lesado tratado com proteína P1), a morfologia ultraestrutural mostrou após 4 semanas a presença de fibras nervosas mielínicas e amielínicas de menor diâmetro e densidade comparadas aos grupo I e II; organizadas em pequenos feixes de fibras nervosas, essa organização pareceu mais evidente nesse grupo em comparação aos grupos III e IV (figura 33A). Nesse grupo também estavam presentes células inflamatórias na região do endoneuro, como é o caso do mastócito observado na figura 33B. Em maior aumento observaram-se características das fibras mielínicas e amielínicas com seu conteúdo axoplasmático contendo organelas e neurofilamentos, além das células de *Schwann* que envolvem

com essas fibras nervosas, no endoneuro estava presente uma grande quantidade de fibras colágenas, foi notada ainda uma área de mielinização com uma delgada bainha de mielina ao redor de axônio e por sua vez envolvida pela célula de *Schwann* que é que desempenha o papel de mielinização (figura 33C). Em detalhe a bainha de mielina revelou suas lamelas concêntricas envolvendo o axoplasma com neurofilamentos, na região do endoneuro estavam presentes fibras colágenas com orientação paralela à fibras nervosa (figura 33D).

Figura 34 – MET - Grupo VI, LBI e proteína P1 - 4 semanas

A. Grupamento de fibras mielínicas (*) e amielínicas (setas) envolvidas pelas células perineurais (cabeça de seta). Aumento: 2.000X. **B.** Fibras mielínicas (fm) e amielínicas (setas) envolvidas pelo citoplasma das células de *Schwann* (*) e colágeno do endoneuro (c). Aumento: 10.000X. **C.** Axônio sendo remielinizado pela célula de Schwann (cs), lamelas de mielina (setas). Aumento: 25.000X. **D.** Lamelas de mielina (setas) e mitocôndria na região do axoplasma (*). Aumento: 75.000X.

Na quarta semana pós-operatória do **grupo VI** (nervo lesado tratado com LBI e proteína P1), o aspecto geral mostrou muitas fibras nervosas mielínicas com pequena variação de diâmetro, e poucas fibras amielínicas; a densidade e o tamanho das fibras foram semelhantes às aquelas anteriormente observadas no grupo IV, no entanto, o citoplasma das células perineurais, responsáveis pela organização das fibras nervosas em fase de recuperação em pequenos feixes, estava mais evidente nesse grupo (figura 34A). Em maior aumento, as fibras nervosas de pequeno calibre se revelaram envolvidas pelo citoplasma da célula de *Schwann* e o endoneuro estava preenchido por fibras colágenas na área deixada pelas fibras degeneradas (figura 34B). Em detalhe uma área de remielinização de uma fibra nervosa foi observada, lamelas de mielina estavam sendo depositadas ao redor de um axônio pela célula de *Schwann* (figura 34C). Na figura 34D notam-se as lamelas de mielina ao redor do axoplasma contendo neurofilamentos e uma mitocôndria.

5.6.2 Grupos Experimentais Analisados 8 semanas após a lesão nervosa

Figura 35 – MET - Grupo I, controle - 8 semanas

A. Aspecto geral do nervo isquiático com fibras mielínicas (fm), grupamentos de fibras amielínicas (fa) e células de *Schwann* com núcleo evidente (*). Aumento: 2.000X. **B.** Mitocôndrias (setas) presentes no axoplasma das fibras nervosas e fibras colágenas do endoneuro (*). Aumento: 10.000X. **C.** Mitocôndria (cabeça de seta) presentes no axoplasma da fibra mielínica e no citoplasma da células de *Schwann* (seta), grupamentos de fibras colágenas do endoneuro (c). Aumento: 20.000X. **D.** Lamelas da bainha de mielina (*), fibras colágenas no endoneuro (c) e mitocôndrias do axoplasma (setas). Aumento: 40.000X.

Após 8 semanas da manipulação dos animais, o grupo controle mostrou características similares àsquelas observadas no grupo controle analisado após 4 semanas. Na figura 35A estavam presentes os grupamentos das fibras mielínicas e amielínicas de variados tamanhos e formas bem como a presença de células de *Schwann*. Em maior aumento verificou-se no axoplasma das fibras nervosas a existência da rede de neurofilamentos e de mitocôndrias, além da presença de feixes de fibras colágenas na região do endoneuro (figura 35B). Ainda em maior

aumento notaram-se maiores detalhes das fibras mielínicas, do grupamento de fibras amielínicas, da região do endoneuro contendo fibras colágenas e do citoplasma das células de *Schwann* com a presença de mitocôndrias (figura 35C). A figura 35D revelaram os detalhes das lamelas da bainha de mielina, do axoplasma da fibra mielínica e dos feixes de fibras colágenas do endoneuro.

Figura 36 – MET - Grupo II, exposto - 8 semanas

A. Aspecto geral com fibras mielínicas (fm), grupamentos das fibras amielínicas (seta) e as células de *Schwann* (cs). Aumento: 2.000X. **B.** Fibras amielínicas (fa) entre as fibras mielínicas, fibras colágenas do endoneuro (c) e mitocôndrias (setas) (fm). Aumento: 10.000X. **C.** Grupamento de fibras amielínicas (fa) ao lado de fibras mielínicas (fm), envolta por fibras colágenas do endoneuro (*). Aumento: 15.000X. **D.** Bainha de mielina (bm) e as mitocôndrias (setas) da região do axoplasma. Aumento: 30.000X.

Decorridas 8 semanas da exposição do nervo isquiático o aspecto geral do grupo II (nervo exposto) apresentou fibras mielínicas de grande diâmetro povoando de forma densa da área do nervo isquiático com fibras amielínicas entre elas, foi

possível notar o citoplasma das células de Schwann ao redor das fibras nervosas e o inchaço das bainhas de mielina (figura 36A). Em maior aumento foi possível observar um grupamento de fibras amielínicas entre fibras mielínicas de grande diâmetro, além da presença das fibras colágenas que constitui o endoneuro e algumas mitocôndrias presentes nas fibras nervosas e no citoplasma da célula de *Schwann* (figura 36B). Na figura 36C observou-se mais um grupamento de fibras amielínicas que nesse caso ficaram adjacentes às fibras mielínicas de menor calibre em quando comparados àqueles observados na figura 36B, nesse caso também se observa grande quantidade de fibras colágenas do endoneuro. Em detalhe foram notadas as características da bainha de mielina com suas lamelas e do axoplasma das fibras nervosas contendo mitocôndrias (figura 36D).

Figura 37 – MET - Grupo III, lesado - 8 semanas

A. Fibras mielinicas (fm) e amielinicas (setas), organizadas em pequenos feixes pelo citoplasma das células perineurais (cabeça de seta). Aumento: 3.000X. **B.** Área de degeneração *Walleriana* (*) entre as fibras mielinicas (fm) íntegras. Aumento: 3.000X. **C.** Área de degeneração com debris de mielina (setas). Aumento: 12.000X. **D.** Fibras colágenas na região do endoneuro (c) entre as fibras mielinicas (fm), lâmina basal remanescente das células de *Schwann* (seta). Aumento: 12.000X.

No **grupo III** (nervo lesado sem tratamento) na oitava semana pós-operatória ainda foram observados os espaços entre as fibras nervosas correspondentes à área do endoneuro preenchidas por fibras colágenas, persistindo a presença de muitas células perineurais que organizam as fibras nervosas em pequenos feixes, no entanto o tamanho e a quantidade dessas fibras nervosas foi maior em comparação ao mesmo grupo analisado após 4 semanas da lesão (figura 37A). Ainda foram notadas algumas áreas de degeneração *Walleriana* contendo *debris* de mielina das fibras nervosas entre fibras íntegras (figura 37B). Em maior aumento notou-se a presença de *debris* de mielina em algumas áreas de degeneração, grande quantidade de fibras colágenas na região do endoneuro e estruturas lineares que

representam os remanescentes da lâmina basal das células de *Schwann* (figuras 37C e 37D). Os fascículos contendo poucas fibras só surgiram após 8 semanas no grupo III sugerindo um atraso na recuperação em comparação aos grupos que receberam tratamento.

Figura 38 – MET - Grupo IV, LBI - 8 semanas

A. Fibras mielínicas (fm) e amielínicas (seta) organizadas em feixes, fibras colágenas do endoneuro (*). Aumento: 3.000X. **B.** Fibroblasto reativo (*) adjacente à fibras mielínicas (fm) e fibras colágenas do endoneuro (c). Aumento: 7.500X. **C.** Célula espumosa (seta) com *debris* de mielina (*) no interior dos seus vacúolos. Aumento: 6.000X. **D.** Restos do citoplasma e lâmina basal da célula de *Schwann* em formato espiral (setas) e áreas de degeneração *Walleriana* adjacente (*). Aumento: 6.000X.

Decorridas 8 semanas da lesão nervosa o **grupo IV** (nervo lesado tratado com LBI) revelou no seu aspecto geral a presença de fibras nervosas mielínicas e amielínicas de diâmetros variados ainda organizados em agrupamentos com pequeno números de fibras, o diâmetro e a quantidade de fibras nesse grupo foi

superior em comparação ao grupo IV analisado após 4 semanas da lesão nervosa (figura 38A). Em meio às fibras nervosas e ao colágeno do endoneuro foi observado um fibroblasto reativo devido a degeneração (figura 38B). Em maior aumento verificaram-se *debris* de mielina no interior de um macrófago ativo (célula espumosa) rodeada por fibras mielínicas e amielínicas íntegras (figura 38C). Em outra região do nervo isquiático a sobra da degeneração das fibras nervosas resultou em uma estrutura de lâmina basal da célula de *Schwann* com formato de espiral, em meio a áreas de degeneração *Walleriana* ao redor dessa estrutura (figura 38D).

Figura 39 - MET - Grupo V, proteína P1- 8 semanas

A. Fibras nervosa mielínicas (fm) e amielínicas (fa), nota-se uma área de degeneração (seta). Aumento: 2.500X. **B.** Grupamento de fibras amielínicas (setas) envolvidas por células de *Schwann* com núcleo (n) evidente. Aumento: 5.000X. **C.** Grupamento de fibras amielínicas com axoplasma (*) contendo mitocôndrias (seta) e fibras colágenas do endoneuro (c). Aumento: 20.000X. **D.** Detalhe uma fibra mielínica com a sua bainha (*) e citoplasma da célula de *Schwann* (cs). Aumento: 50.000X.

Após 8 semanas da lesão nervosa no nervo isquiático do **grupo V** (nervo lesado tratado com proteína P1), revela de maneira geral uma melhora morfológica em comparação ao mesmo grupo analisado após 4 semanas e aos demais grupos lesados analisados após 8 semanas, com maior organização dos componentes internos do nervo isquiático. Na figura 39A verifica-se a presença de numerosas fibras amielínicas e mielínicas de diâmetros variados, uma região de degeneração *Walleriana* que foi pouco frequente e com menor amplitude, não foi mais notada a organização das fibras nervosas em pequenos feixes pelas células perineurais. Em maior aumento estavam presentes grande quantidade de fibras amielínicas envolvidas pelas lâminas plasmática das células de *Schwann* com núcleos evidentes (figura 39B). A figura 39C relevou detalhes das fibras amielínicas e seu conteúdo axoplasmático contendo redes de neurofilamentos e mitocôndrias, e fibras colágenas da região do endoneuro. Em detalhe foram notadas as lamelas de uma espessa bainha de mielina bem organizadas e parte do citoplasma da célula de *Schwann* ao seu redor (figura 39D).

Figura 40 – MET - Grupo VI, LBI e proteína P1 - 8 semanas

A. Aspecto geral das fibras mielínicas (fm) e amielínicas (setas). Aumento: 2.000X. **B.** Fibras mielínicas (fm), amielínicas (setas), células de *Schwann* (cs) e fibras colágenas (c). Aumento: 12.000X. **C.** Bainha de mielina sendo envolvida pela célula de *Schwann* (seta), neurofilamentos do axoplasma (*) e as fibras colágenas do endoneuro (c). Aumento: 20.000X. **D.** Lamelas da bainha de mielina (setas), citoplasma da célula de *Schwann* (*) e fibras colágenas do endoneuro (c). Aumento: 50.000X.

O **grupo VI** (nervo lesado tratado com LBI e proteína P1), na oitava semana pós-operatória, revelou aspecto geral do nervo isquiático com fibras mielínicas e amielínicas de diâmetro variado semelhante às características observadas no grupo V após 8 semanas, mais uma vez as células perineurais foram evidentes (figura 40A). Em maior aumento as fibras nervosas mielínicas e amielínicas de vários tamanhos revelaram axoplasma contendo neurofilamentos e mitocôndrias, a presença das células de *Schwann* com núcleo evidente e fibras colágenas na região do endoneuro (figura 40B). A figura 40C mostrou detalhes da fibra mielínica com sua bainha de mielina envolvendo o axoplasma e sendo envolvida pelo citoplasma da

célula de *Schwann*, além da presença de fibras colágenas na região do endoneuro. As lamelas da bainha de mielina ficaram evidentes na figura 40D, puderam ainda ser observadas as fibras colágenas do endoneuro e o citoplasma da célula de *Schwann*. O grupo VI revelou melhora em relação ao mesmo grupo analisado após 4 semanas com características de maior mielinização e boa organização endoneural.

6 DISCUSSÃO

A importância do presente trabalho se revela na dificuldade e falta da plena compreensão dos mecanismos que levam a regeneração axonal pós-lesão, que há muito tempo tem sido o alvo de pesquisas da neurologia, neurociência e medicina regenerativa (FERGUSON; SON, 2011). Além disso, essas pesquisas poderão fornecer o entendimento de problemas semelhantes no sistema nervoso central, devido à compreensão dos mecanismos que regem a regeneração bem sucedida dos nervos periféricos (KIRYU-SEO; KIYAMA, 2011).

Os nossos resultados demonstram os dados obtidos experimentalmente empregando os métodos das análises morfológica, quantitativa, morfométrica, imunohistoquímica e ultraestrutural, comparando com os relatos destacados na literatura. Para melhor organização e entendimento a discussão foi feita em tópicos com o intuito de ilustrar a obtenção dos resultados.

6.1 Análise morfológica, quantitativa e morfométrica

Após 4 e 8 semanas da manipulação os animais os grupos I (controle) e II (nervo exposto) apresentaram características morfológicas, quantitativas e morfométricas normais, contendo fibras mielínicas de diversos calibres distribuídos por toda a área de secção transversa do nervo isquiático assemelham-se com os relatos publicados anteriormente por Oliveira et al., (2001). Os nossos dados sugerem que a manipulação do nervo isquiático, como proposto nesse estudo, não interferiu significativamente nos resultados obtidos com os tratamentos realizados. Os dados dos grupos lesados (III-lesado, IV-LBI, V-P1 e VI-LBI e P1) revelaram alterações das características morfológicas que foram dependentes dos protocolos aplicados e dos períodos de análise.

O grupo III (lesado sem tratamento) revelou modificação das características morfológicas com perda na quantidade, densidade e tamanho das fibras nervosas. Esses dados foram confirmados pelas análises quantitativas e morfométricas que revelaram a redução da densidade e espessura da bainha de mielina e dos diâmetros das fibras nervosas. Este aspecto confirma as observações dos trabalhos de Fancy et al. (2012) e Wood et al. (2001) de que o esmagamento nervoso resulta na desmielinização das fibras e a consequente falha na remielinização levando à degeneração axonal. A gravidade desse tipo de lesão é diretamente proporcional à

carga aplicada, sabe-se que a carga de 15 Kg é altamente nociva (OLIVEIRA et al., 2001).

Essas informações permitem esclarecer a diminuição da densidade de mielina e das fibras nervosas constatadas no presente estudo devido ao esmagamento nervoso, nas quais a falta da remielinização de algumas fibras lesadas levam a degeneração e consequente diminuição do número de fibras e da densidade de mielina. A carga de 15 Kg se mostrou ideal na avaliação da recuperação axonal devido a sua alta capacidade destrutiva permitindo avaliar as alterações obtidas pelos tratamentos propostos.

Dubový (2001) afirma que a regeneração axonal pós-esmagamento é lenta, porém mais rápida e mais bem sucedida que a regeneração após a desconexão total do nervo. Muratori et al. (2012) explicam que a recuperação axonal espontânea após 8 semanas do esmagamento, não levou ao retorno das características normais das fibras, esse fato deverá ocorrer na por volta da vigésima quarta semana e mesmo assim pode não atingir os parâmetros pré-lesão idênticos.

Os nossos resultados revelaram que após 8 semanas da lesão nervosa no grupo III (lesado e sem tratamento), cuja melhora ocorreu apenas devido à recuperação espontânea, foi notada uma melhora no quadro morfológico da lesão nervosa, no entanto essa recuperação não atingiu características normais, pois as características das amostras desse grupo foram diferentes do grupo controle. É provável que um período de análise mais longo, como realizado por Muratori et al. (2012) resultasse em uma melhora mais significativa desse quadro.

O grupo IV (laser de baixa intensidade - LBI) apresentou características morfológicas superiores em comparação ao grupo III, porém inferiores aos grupos I (controle) e II (exposto) após 4 semanas e 8 semanas, esses dados não foram confirmados pelas análises quantitativas, embora tenha ocorrido uma tendência de melhora das densidades de mielina e de capilares em relação ao grupo III (lesado). As análises morfométricas revelaram melhoras em relação aos diâmetros das fibras nervosas e diâmetros axonais além da espessura da bainha de mielina.

Os autores de outros estudos (ROCHKIND et al., 2007a; ROCHKIND, 2009; YAZDANI et al., 2012) relataram que o laser de baixa intensidade aplicado sobre as lesões nervosas melhora o crescimento axonal, a mielinização e a recuperação dos neuritos.

Passados 21 dias do esmagamento do nervo mediano de ratos irradiado com LBI (904nm, 9J/cm²) Santos et al., (2012) notaram fibras mielínicas maiores e aumento significativo na espessura das sua bainhas de mielina, porém não foi observado aumento significativo no diâmetro mínimo das fibras nervosas nem no número de capilares sanguíneos. No nervo isquiático esmagado Câmara et al., (2011) reportaram aumento no número de axônios e com maior diâmetro utilizando o LBI (904nm, 4J/cm²). Na secção nervosa (neurotome) o LBI (660nm, 50J/cm²) aumentou a densidade de fibras nervosas e o diâmetros axonal (MEDALHA et al., 2012) outro protocolo (660nm, 4J/cm²; 26,3mW) resultou no aumento da área das bainhas de mielina (REIS et al., 2009).

Quanto à aplicação do laser de baixa intensidade sobre os nervos periféricos lesados foi identificada uma ampla variação dos parâmetros físicos, mas que de uma forma geral levaram a melhora da lesão. Os nossos resultados revelaram melhora na morfometria tais como o aumento dos diâmetros das fibras nervosas e os axônios e da bainha de mielina estando de acordo com os relatos anteriores (CÂMARA et al., 2011; MEDALHA et al., 2012; REIS et al. 2009; ROCHKIND et al., 2007a; ROCHKIND, 2009; SANTOS et al., 2012; YAZDANI et al., 2012) mesmo que os parâmetros físicos do LBI utilizados no presente estudo tenham sido diferentes. Os capilares sanguíneos não foram alterados com o nosso protocolo de irradiação com o laser assim como ocorreu no estudo de Santos et al. (2012). Sugerindo dessa forma que o LBI é capaz de melhorar os aspectos morfológicos e morfométricos das fibras nervosas lesadas, mas não consegue alterar o número e a densidade de capilares sanguíneos.

O grupo V (proteína do látex natural – proteína P1) após 4 semanas da lesão mostrou as melhores características morfológicas entre os grupos tratados, na análise quantitativa foi notada uma tendência de melhora após 4 semanas que não foi significativa, e na análise morfométrica esse foi o grupo com os melhores resultados de recuperação dos calibres nervosos e axonais além da espessura da bainha de mielina. Após 8 semanas a morfologia, a quantificação e os dados morfométricos do grupo V foram similares ao grupo controle.

A proteína P1 foi efetiva em vários estudos regenerativos com animais e em estudos clínicos com humanos (GANGA et al., 2012). Entre esses estudos destacam-se o sucesso no tratamento de úlceras cutâneas em coelhos

(MENDONÇA et al., 2010; MRUÉ et al., 2004) e em camundongos (ANDRADE et al., 2011); recuperação de alvéolo dental de ratos pós-exodontia; (BALABANIAN et al., 2006); inguinoplastia laparotômica em cães (ANDRADE et al., 2009); ampliação vesical em coelhos (DOMINGOS et al., 2009); defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos (ISSA et al., 2010; ISSA et al., 2012). Nos estudos clínicos a proteína P1 se mostrou segura em relação ao desencadeamento da resposta de hipersensibilidade em úlceras cutâneas (FRADE et al., 2011) e atuou como um fator indutor da cicatrização, promovendo a transformação do microambiente das úlceras venosas crônicas e a posterior reepitelização (FRADE et al., 2012). Especificamente sobre o nervo isquiático de ratos seccionado, um neurotubo contendo a proteína P1 melhorou a regeneração do nervo, a condução do impulso nervoso e a marcha funcional (GANGA et al., 2012).

Os nossos resultados também demonstraram a melhora na recuperação do nervo isquiático assim como ocorreu em todos os casos mencionados, e tal como ocorreu no estudo de Ganga et al., (2012) podemos correlacionar a melhora funcional e da condução do impulso nervoso com as melhoras observadas nas análises quantitativa e morfométrica, uma vez que esses parâmetros se correlacionam com o resultado funcional da recuperação nervosa (RAIMONDO et al., 2009).

O grupo VI (laser de baixa intensidade e proteína P1) após 4 semanas da lesão nervosa apresentava características morfológicas, quantitativas e morfométricas similares ao grupo IV (LBI) e após 8 semanas as características desse grupo foram semelhantes ao grupo V (proteína P1). Sugerindo assim que o LBI nesse caso atrasou ou inferiu na recuperação inicial desse grupo devido ao protocolo de irradiação que durou duas semanas.

Os grupos que receberam a aplicação da proteína P1 associada (grupo VI) ou não (grupo V) ao laser de baixa intensidade revelaram aumento significativo na densidade de capilares sanguíneos após 8 semanas da lesão nervosa.

Outros estudos já havia demonstrado o grande potencial angiogênico dessa proteína (ANDRADE et al., 2011; BALABANIAN et al., 2006; MENDONÇA et al., 2010; SAMPAIO et al., 2010). O esmagamento do nervo periférico induz modificações patológicas dos capilares nervosos, diminuindo o fluxo sanguíneo e a tensão de oxigênio, resultando em isquemia e hipóxia (JANG; CHO; CHOI, 2012). A

angiogênese é crucial para o reparo de feridas e revascularização de tecidos isquêmicos, porque supre os tecidos com vários nutrientes e também atua na liberação dos metabólitos (MENDONÇA et al., 2010). Esses fatos tornam promissor o uso da proteína P1 no reparo das lesões de nervos periféricos, uma vez que ela pode restabelecer a nutrição e aumentar o fluxo de metabólicos e fatores de crescimento.

A análise quantitativa que avaliou a densidade de mielina presente no nervo por meio da contagem de *pixels*, essa forma de avaliação não é usual nos estudos de recuperação de nervos periféricos. Assim não foram encontrados estudos com o qual pudéssemos realizar as comparações com os nossos resultados. A vantagem desse tipo de análise está na obtenção de dados de maneira rápida, reprodutível e inteligível, e assim podendo ajudar e/ou complementar o entendimento dos dados morfométricos.

A razão-G é um parâmetro muito utilizado como um índice funcional e estrutural da mielinização axonal. Com base na velocidade de condução de fibras, o valor teórico de 0,6 é considerado o valor ótimo (de CAMPOS et al., 2013⁶; CHOMIAK e HU, 2009; RUSHTON, 1951). Os estudos que avaliaram a razão-G das fibras nervosas lesadas revelam que esse valor mostrou pequena variação (FELIX et al., 2013; MURATORI et al., 2012; SANTOS et al., 2012). Mazzer et al., (2008) obtiveram razão-G de 0,53 no nervo isquiático normal.

Os dados relativos à razão-G no presente estudo estão de acordo com os dados dos trabalhos de Mazzer et al. (2008); Muratori et al. (2012) e Santos et al. (2012). Devido a pequena amplitude de variação independente da lesão ou tratamento (aproximadamente 0,10) e valor médio desse parâmetro semelhante ao reportado por Mazzer et al. (2008).

6.2 NGF – Fator de crescimento de nervo

O NGF é um fator neurotrófico que promove a proliferação, sobrevivência, proteção e diferenciação de neurônios e oligodendrócitos; modula a reparação de axônios lesados e regula as estruturas-chave das proteínas que constituem a mielina. (ACOSTA et al., 2013; LI et al., 2012; YANG et al., 2012). As células de

⁶ de CAMPOS, D.; HECK, L.; JOTZ, G. P.; XAVIER, L. L. Degree of myelination (g-ratio) of the human recurrent laryngeal nerve. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, 2013.

Schwann são responsáveis pela liberação do NGF após a lesão nervosa, e em aproximadamente 3 semanas os seus níveis começam a diminuir (CHANG et al., 2009).

Os nossos resultados revelaram as características proliferativas, diferenciadoras, moduladoras e reguladoras da regeneração nervosa realizada pelo NGF, pois em todos os grupos lesados (III-lesado, IV-LBI, V-P1 e VI-LBI e P1) foram notadas imunomarcações positivas desse fator, principalmente após 4 semanas da lesão, corroborando assim com o pico de expressão de 3 semanas pós-lesão relatada por Chang et al., (2009). O grupo III (lesado) ainda apresentava uma notável marcação do NGF após 8 semanas da lesão sugerindo o atraso da ação desse fator; e por outro lado o grupo V (proteína P1) analisado após 4 semanas apresentou marcação mais leve em comparação aos outros grupos lesados nesse mesmo período sugerindo a aceleração da ação do NGF, em que esse fator pode ter atuado em períodos anteriores.

A irradiação de culturas de células de *Schwann* com o LBI (810 nm, 50mW – 1 e 4 J/cm²) estimulou a proliferação dessas células e elevou a expressão do gene do NGF (YAZDANI et al., 2012). No presente estudo, foi observado o aumento da imunomarcação do NGF após a lesão nervosa nos animais que receberam irradiação do LBI (grupo IV), mesmo com parâmetros físicos diferentes daqueles utilizados por Yazdani et al., (2012), porém esse aumento foi também observado no grupo III, cujos animais foram lesados e não receberam tratamento, assim não podemos afirmar que o aumento da marcação desse fator foi devido apenas a ação do LBI. Observou-se ainda que após 4 semanas a imunomarcação nos animais que receberam o LBI foi levemente menor em comparação aos animais apenas lesados, o que também sugere, assim como ocorreu com o grupo V (P1), que o LBI pode ter acelerado a recuperação do esmagamento nervoso, tal como foi observado nas análises morfológicas e morfométricas anteriormente.

Muitos estudos relatam a capacidade do NGF em induzir e mediar a angiogênese em condições patológicas e fisiológicas devido a sua ação sobre as células endoteliais (LECH et al., 2010; MELONI et al., 2010; PARK et al., 2007; RAHBEEK et al., 2005; URZUA et al., 2012; WANG et al., 2011). Já foi reportado que as células endoteliais sintetizam NGF (ZETTLER et al., 1996 apud LECH et al., 2010) e que esse fator é capaz de mediar a ação do VEGF, fator de crescimento do

endotélio vascular (KIM, Y. et al., 2013; URZUA et al., 2012). Esses estudos ajudam a elucidar a marcação positiva do NGF observada nos capilares sanguíneos dos nossos resultados, mostrando que esse fator pode auxiliar na recuperação da vascularização além do tecido nervoso propriamente dito.

6.3 VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é uma citocina que atua na formação de novos capilares a partir de vasos pré-existentes (YEN et al., 2011). A angiogênese repara a isquemia, auxiliando na regeneração dos nervos, o VEGF e o receptor VEGFR2 são os principais moduladores angiogênicos, que desempenham papéis essenciais na regulação da neoformação vascular nas fases pós-isquêmicas iniciais (YANG et al., 2012). O VEGF pode exercer efeitos não-angiogênicos em vários tipos de células incluindo as células nervosas (GIACCA; ZACCHIGNA, 2012).

No presente estudo o VEGF foi marcado em todos os grupos independente da lesão e/ou tratamento; porém parece que esse fator ficou estimulado pela lesão do tecido nervoso, estando de acordo com os relatos de Yang et al., 2012 e Yen et al., 2011. Após 4 semanas da lesão nervosa os grupos III (lesado) e IV (LBI) apresentaram fraca marcação entre as fibras nervosas e nas células perineurais, e os grupos V (P1) e VI (LBI e P1) mostraram as mais intensas marcações do VEGF em comparação aos demais grupos do estudo, localizadas entre as fibras nervosas e nas células endoteliais. Na oitava semana pós-operatória os grupos I (controle), II (exposto), III (lesado) e IV (LBI) revelaram imunomarcações do VEGF semelhantes e os grupos V (P1) e VI (LBI e P1) ainda apresentavam marcações intensas principalmente nas células endoteliais.

Esses dados suportam a análise quantitativa dos vasos sanguíneos, no qual após 8 semanas da lesão nervosa foram observados aumentos na densidade capilar nos grupos V (P1) e VI (LBI e P1), cujos animais receberam a proteína P1. Entre as ações dessa proteína está a reconhecida capacidade de neoformação de vasos sanguíneos (ANDRADE et al., 2011; BALABANIAN et al., 2006; MENDONÇA et al., 2010; SAMPAIO et al., 2010), que pode estar relacionada ao aumento da expressão do VEGF em ambos períodos analisados.

O LBI (660nm e 9J/cm²) também influencia na angiogênese no nervo isquiático lesado elevando a expressão do VEGF e do NGF após 2 semanas (HSIEH et al.,

2012). No entanto não foi notado aumento de capilares no grupo IV (LBI) nos períodos analisados nesse estudo.

O VEGF impregnado em isoenxertos usado no tratamento das lacunas nervosas aumentou o número de axônios (ROVAK et al., 2004). Esses resultados confirmam o relato de Giacca e Zacchigna (2012) em que o VEGF não atua exclusivamente sobre as células endoteliais, assim como ocorre com o NGF que pode atuar sobre outras células e não apenas do sistema nervoso.

6.4 Análise tridimensional da superfície – microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-AR)

Os resultados da microscopia eletrônica de varredura de alta resolução revelam que os grupos não lesados (grupos I-controle e II-exposto) apresentaram características normais nos dois períodos analisados. O grupo III (lesado) mostrou alterações após 4 semanas, tais como a redução do número e tamanho das fibras nervosas, um grande aumento das fibras colágenas do endoneuro e presença de áreas de degeneração. Na oitava semana pós-lesão foram observados pequenos grupamentos de fibras nervosas de calibre nervoso e bainha de mielina reduzida, nesse período havia menor quantidade de fibras colágenas e ocorreu aumento no número e nas dimensões das fibras nervosas. Os grupos tratados (grupos IV-LBI, V-P1 e VI-LBI e P1) mostraram melhores características quando comparados ao grupo III (lesado). Na quarta semana pós-lesão todos os grupos tratados apresentaram pequenos grupamentos de fibras nervosas com dimensões reduzidas e aumento das fibras colágenas do endoneuro, porém a quantidade dessas fibras colágenas foi menor em comparação ao grupo III (lesado). Após 8 semanas os grupos V (P1) e VI (LBI e P1) revelaram melhoras morfológicas em comparação ao período anterior, com uma organização mais compacta das fibras nervosas que apresentavam maiores dimensões. O grupo IV (LBI) apresentou características similares ao grupo III (lesado). Esses dados sugerem que a aplicação da proteína P1 associada ou não ao LBI resultou em melhorias das características morfológicas em longo prazo.

Os estudos de Gershenbaum e Roisen (1980); Ushiki e Ide (1987) analisaram as características ultraestruturais dos nervos periféricos ao microscópio eletrônico de varredura preocupando-se especialmente com os aspectos da superfície externa das fibras nervosas mielínicas; Ushiki e Ide (1988) das fibras amielínicas; Moss e

Lewkowics (1981); Ushiki e Ide (1986) das estruturas internas nos nervos, como é o caso das fibras colágenas do endoneuro, e Kumagai et al. (1990); Ushiki, Hayashi e Ide (1990); das células de *Schwann*. Sendo assim diferentes das nossas análises, que foram focadas nas características internas das fibras nervosas após criofratura e as suas relações com os demais componentes nervosos, comparando ainda o tecido normal com o lesado por esmagamento, além dos tratamentos com o laser de baixa intensidade e a proteína purificada do látex natural.

A arquitetura da lâmina basal (lâmina densa) da célula de *Schwann* revela aparência esponjosa com pequenas escavações e um material fino e filamentosos embebido nessa substância (USHIKI; HAYSHI; IDE, 1990; WATANABE, 1998). A lâmina basal da célula de *Schwann* também revelou superfície com textura esponjosa nas nossas observações ao MEV-AR.

O colágeno do endoneuro do nervo isquiático normal foi descrito por Moss e Lewkowics (1981) revelando uma densa organização que envolve hermeticamente a fibra nervosa com orientação longitudinal. Após a lesão por esmagamento essas fibras ficam organizadas e agrupadas em feixes que perdem a uniformidade e com o tempo retornam às características pré-lesão. Entretanto Ushiki e Ide (1986) e Watanabe (1998) descreveram que as fibras colágenas do endoneuro estão organizadas em duas camadas distintas; uma externa com grupamentos de feixes longitudinais e densos de fibras colágenas que não envolvem toda a extensão externa da fibra nervosa e outra interna com fibras delgadas com diversas orientações e organização não densa. Dessa forma as fibras colágenas do endoneuro não envolvem as fibras nervosas hermeticamente, essa descrição se assemelha aos mesmos aspectos reportados anteriormente por Moss e Lewkowics (1981) como características de fibras nervosas lesadas. Os nossos resultados corroboram com os estudos de Ushiki e Ide (1988) e Watanabe (1998), pois as fibras colágenas do endoneuro do grupo controle apresentam essa dupla organização em diferentes camadas.

Após o esmagamento do nervo isquiático Gershenbaum e Roisen (1980) e Moss e Lewkowics (1981) notaram um aumento da quantidade de fibras colágenas do endoneuro. Os dados do presente estudo corroboram com essas afirmações, uma vez que em todos os grupos lesados foi observado um grande aumento da quantidade das fibras colágenas no endoneuro, principalmente após 4 semanas da

lesão. Na oitava semana, a quantidade de fibras colágenas do endoneuro tendeu a diminuir dando lugar a maior número de fibras nervosas com maiores dimensões além das células de *Schwann* reativas que se apresentam em grande número.

6.5 Análise ultraestrutural – microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise ultraestrutural revelou que os animais dos grupos não lesados (grupos I-controle e II-exposto) apresentaram características normais. Após 4 semanas, nos grupos lesados (grupos III-lesado, IV-LBI, V-P1 e VI-LBI e P1) foram evidentes as perdas das fibras nervosas cujo espaço deixado foi ocupado por fibras colágenas; foram observadas áreas de degeneração *Walleriana*, presenças de células espumosas e a redução da bainha de mielina e do diâmetro das fibras nervosas. Os grupos tratados (IV-LBI, V-P1 e VI-LBI e P1) mostraram características distintas do grupo III (lesado), como uma maior densidade de fibras nervosas com maior espessura da bainha de mielina além de frequentes áreas de mielinização nos grupos V (P1) e VI (LBI e P1). Os grupos IV (LBI) e VI (LBI e P1), que receberam o LBI, apresentam aspectos similares e inferiores ao grupo V, ainda assim não foi possível eleger o melhor tratamento nesse período.

Na oitava semana, o grupo III (lesado) continha áreas de degeneração e muitas fibras colágenas no endoneuro, porém as fibras nervosas estavam em maior número e diâmetro em comparação ao período anterior. O grupo IV (LBI) foi similar ao grupo III (lesado), porém contendo fibras de maior diâmetro e não sendo notadas áreas de degeneração frequentes assim como o endoneuro repleto de fibras colágenas. Os grupos V (P1) e VI (LBI e P1) revelam características morfológicas similares aos grupos não lesados, com grande quantidade de fibras nervosas e células de *Schwann*. O espaço das fibras colágenas no endoneuro diminuiu sendo ocupado por fibras nervosas com maior diâmetro e em maior densidade.

Esses resultados ultraestruturais corroboram com os resultados previamente analisados e discutidos nas análises quantitativa e morfológica obtidos pelo microscópio de luz e ao microscópio eletrônico de varredura de alta resolução, uma vez que características similares foram observadas em todas essas análises. Dentre esses aspectos semelhantes destacam-se, a redução do número e dimensões das fibras nervosas, presença de áreas de degeneração, aumento das fibras colágenas

do endoneuro e das células de *Schwann* reativas que foram diferentes entre os grupos dependendo do protocolo aplicado e do período de análise.

Os remanescentes em formato linear do citoplasma das células de *Schwann* observadas no presente estudo são conhecidas de estudos anteriores (IDE et al., 1983; IDE; KATO, 1990) como restos da lâmina basal da célula de *Schwann* que servem como uma base de sustentação para o crescimento das novas fibras nervosas após a lesão por esmagamento (IDE et al., 1983; IDE; KATO, 1990). As fibras crescem preferencialmente através desses túbulos vazios mantidos após o esmagamento nervoso (IDE et al., 1983). Pudemos constatar no nosso estudo esses restos da lâmina basal da célula de *Schwann*, principalmente nos grupos analisados após a lesão em forma de estruturas lineares e em alguns casos em espiral.

Os nossos resultados evidenciaram agrupamentos de poucas fibras nervosas contendo com dimensões reduzidas envolvidas por numerosas células perineurais, principalmente após 4 semanas nos grupos lesados, persistindo nos grupos III (lesado) e IV (LBI) após 8 semanas. Tal como descrito anteriormente por Felix et al. (2013); Hashimoto et al. (2002); Ishikawa et al. (2006); Mligiliche et al. (2003) e Zhao et al. (2011) mostrando assim a regeneração nervosa pelo tecido conjuntivo. Os grupos V (P1) e VI (LBI e P1) após 8 semanas da lesão não revelaram esses aspectos de forma clara sugerindo um avanço nos estágios de recuperação em comparação aos outros grupos lesados.

Esses pequenos grupamentos de fibras nervosas também foram evidentes após 4 semanas nas análises ao microscópio eletrônico de varredura de alta resolução. No período de 8 semanas pós-lesão os grupo III (lesado) e IV (LBI) ainda apresentavam claramente essa característica. A diminuição do diâmetro das fibras nervosas foi frequente em todos os grupos analisados pela microscopia eletrônica de transmissão após 4 e 8 semanas da lesão.

Muitos axônios regenerados foram observados após 3 meses da lesão por congelamento do nervo óptico (MURAKAMI; IDE; KANAYA, 1989). Após 2 e 4 meses de uma ressecção nervosa com a colocação de uma esponja de quitosana notaram-se muitos axônios bem mielinizados (ISHIKAWA et al., 2006). As fibras nervosas aumentam de diâmetro quanto maior for o tempo de recuperação (HASHIMOTO et al., 2002; ISHIKAWA et al., 2006), alcançando características normais após 21 meses da lesão por ressecção nervosa (HASHIMOTO et al., 2002).

Esses relatos mostram a tempo-dependência na recuperação de nervos periféricos, que depende da gravidade e intensidade da lesão. Dessa forma uma lesão por ressecção leva mais tempo para regenerar em comparação à lesão por resfriamento ou esmagamento, devido à perda da integridade do tecido e a necessidade de uso de um guia artificial de crescimento, já no esmagamento nervoso parte do tecido nervoso não é danificado, mantendo o peri e o epineuro que são importantes para guiar o crescimento axonal de forma natural. O aumento do diâmetro das fibras com base no tempo também foi observado comparando-se os dados obtidos após 4 semanas com os dados correspondentes analisados após 8 semanas.

A remielinização após lesão das fibras nervosas lesadas é caracterizada por finas camadas de mielina com contorno às vezes irregular contendo saliências (HANA-MITCHELL et al., 2008; MURAKAMI; IDE; KANAYA, 1989). Pudemos notar delgadas camadas de mielina com contornos irregulares em todos os grupos lesados e analisados após 4 semanas da lesão. Após 8 semanas essas características ainda estavam presentes nos grupos III (lesado) e IV (LBI). Os grupos V (P1) e VI (LBI e P1) apresentaram bainha de mielina mais homogênea e espessa, sugerindo um avanço nos estágios de remielinização.

As células espumosas são macrófagos ativos com acúmulos de lipídeos em seu citoplasma (BOVEN et al., 2006; LUQUE et al., 2013; SENGUPTA et al., 2013). Quando essas células surgem em lesões nervosas elas podem conter corpos semelhantes a mielina no interior dos seus vacúolos (NAKAJIMA et al., 2007). No nosso estudo também foram observadas células espumosas contendo restos das bainhas de mielina em decomposição no interior dos seus vacúolos em alguns grupos experimentais.

Os mastócitos são células do tecido conjuntivo que colaboram nas reações imunes e tem papel fundamental na inflamação e reações alérgicas (JUNQUEIA; CARNEIRO, 2004). Após 14 dias da lesão por ressecção nervosa Hashimoto et al., (2002) relataram a presença de mastócitos próximos dos axônios em regeneração. No presente estudo observamos mastócitos no nervo isquiático dos animais lesados após 4 semanas da lesão, não apresentando maior frequência em nenhum grupo específico. Os grupos que receberam a proteína P1, a irradiação com o laser de baixa intensidade ou que não receberam tratamento não revelaram maior frequência desse tipo de célula. Por esse motivo acredita-se que os mastócitos presentes se

relacionavam à inflamação, que tem papel fundamental na regeneração tecidual, ao invés da reação de hipersensibilidade principalmente à proteína P1. Após 8 semanas da lesão essas células não foram encontradas, provavelmente devido aos avanços dos estágios das reações inflamatórias.

6.6 Considerações Finais

Esse estudo analisou as características da regeneração nervosa empregando novas modalidades de tratamento, como é o caso do laser de baixa intensidade e da proteína do látex natural (P1), de forma original associou esses tratamentos realizando avaliações nos níveis morfológicos, morfométricos, imunohistoquímicos e ultraestruturais, obtendo dados promissores ainda não existentes na literatura. A importância desse trabalho se revela na tentativa de melhorar a recuperação obtida pelas técnicas clássicas de tratamento das lesões de nervos periféricos que normalmente incluem métodos cirúrgicos muito invasivos, que em alguns casos não atingem a recuperação plenamente satisfatória dessas lesões. A escolha do nervo isquiático foi devido à ampla gama de análises e dados existentes para esse nervo, além das vantagens relativas ao acesso e ao seu volume. Assim outras análises em diferentes níveis se mostram necessárias para reforçar e melhor elucidar os dados obtidos no presente estudo, que poderão ser realizados na sequência, mantendo a mesma linha de estudo e pesquisa.

7 CONCLUSÃO

- Os tratamentos com LBI e/ou proteína P1 resultaram na melhora das características morfológicas, quantitativas, morfométricas, e ultraestruturais na recuperação da lesão por esmagamento do nervo isquiático após 4 e 8 semanas;
- Após 4 semanas da lesão do nervo isquiático os dados quantitativos e morfológicos não permitiram os melhores aspectos de melhora entre os tratamentos aplicados;
- As reações de imunohistoquímica revelaram maior atividade dos fatores VEGF e NGF após 4 semanas da lesão nervosa, principalmente nos grupos lesados com ou sem tratamento;
- Após 8 semanas da lesão as características morfológicas, morfométricas e ultraestruturais dos grupos tratados estavam melhores e mais próximos dos grupos não lesados em comparação aos mesmos grupos comparados após 4 semanas da lesão nervosa, revelando a tempo-dependência na recuperação da lesão, pode ainda atribuir esse fato aos fatores de crescimento que atuaram em períodos anteriores;
- Após 8 semanas da lesão nervosa os dados quantitativos mostraram um aumento do número de capilares sanguíneos no nervo isquiático dos animais tratados tanto com a proteína P1, essa alteração pode estar relacionada com a ação do VEGF constatada nas análises imunohistoquímicas;

De uma forma geral a recuperação do nervo isquiático esmagado em longo prazo (8 semanas) foi melhor nos animais que receberam apenas a proteína do látex, dado o fato que a aplicação apenas do laser de baixa intensidade com os parâmetros propostos nesse estudo não alcançou os resultados similares, e a associação dos dois tratamentos não potencializou a recuperação, sugerindo que a melhora observada quando os dois tratamentos foram aplicados se refere principalmente a proteína P1.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- ALCÂNTARA, C. C.; GIGO-BENATO, D.; SALVINI, T. F.; OLIVEIRA, A. L.; ANDERS, J. J.; RUSSO, T. L. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute neural recovery and inflammation-related gene expression after crush injury in rat sciatic nerve. **Lasers Surg. Med.**, v. 45, n. 4, p. 246-252, 2013.
- ALVES DE SOUSA, L. C.; RIBEIRO DE TOLEDO PIZA, M.; COUTINHO-NETTO, J.; RUIZ, D. B.; SCHMIDT, V. B. Latex biomembrane: a new method to coat the open cavity in tympanomastoidectomies. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, v. 73, n. 3, p. 331-336, 2007.
- ANDRADE, L. C.; CENEVIVA, R.; COUTINHO-NETTO, J.; SILVA JÚNIOR ODE, C.; DOS SANTOS, J. S.; SUKEDA, D. H. Morphological features of utilization intraperitoneal double-sided prostheses in inguinoplasty in dogs. **Rev. Col. Bras Cir.**, v. 36, n. 5, p. 431-437, 2009.
- ANDRADE, T. A.; IYER, A.; DAS, P. K.; FOSS, N. T.; GARCIA, S. B.; COUTINHO-NETTO J.; JORDÃO-JR, A. A.; FRADE, M. A. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 44, n. 10, p.1036-1047, 2011.
- ARINO, H.; BRANDT, J.; DAHLIN, L. B. Implantation of Schwann cells in rat tendon autografts as a model for peripheral nerve repair: long term effects on functional recovery. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand. Surg.**, v. 42, n. 6, p. 281-285, 2008.
- BALABANIAN, C. A.; COUTINHO-NETTO, J.; LAMANO-CARVALHO, T. L.; LACERDA, S. A.; BRENTGANI, L. G. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **J. Oral. Sci.**, v. 48, n. 4, p. 201-205, 2006.
- BARBOSA, R. I.; MARCOLINO, A. M.; DE JESUS GUIRRO, R. R.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; DE CÁSSIA REGISTRO FONSECA, M. Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers Med. Sci.**, v. 25, n. 3, p. 423-430, 2010.
- BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers theory and practice**. New York: Churchill Livingstone, 1997. 259 p.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, Editora da Universidade de São Paulo, 1976. 256 p.
- BELCHIOR, A. C.; DOS REIS, F. A.; NICOLAU, R. A.; SILVA, I. S.; PERREIRA, D. M.; DE CARVALHO, T. Influence of laser (660 nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, n. 6, p. 893-899, 2009.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOVEN, L. A.; VAN MEURS, M.; VAN ZWAM, M.; WIERENGA-WOLF, A.; HINTZEN, R. Q.; BOOT, R. G.; AERTS, J. M.; AMOR, S.; NIEUWENHUIS, E. E.; LAMAN, J. D. Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. **Brain**, v. 129, n. pt2, p. 517-526, 2006.

BRUGNERA-JR, A.; PINHEIRO, A. L. B. **Lasers na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast Editora, 1998. 355 p.

BYRNES, K. R.; WAYNANT, R. W.; ILEV, I. K.; WU, X.; BARNA, L.; SMITH, K.; HECKERT, R.; GERST, H.; ANDERS, J. J. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. **Lasers Surg. Med.**, v. 36, n. 3, p. 171-185, 2005.

CÂMARA, C. N.; BRITO, M. V.; SILVEIRA, E. L.; SILVA, D. S.; SIMÕES, V. R.; PONTES, R. W. Histological analysis of low-intensity laser therapy effects in peripheral nerve regeneration in Wistar rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 26, n. 1, p. 12-18, 2011.

CHANG C. J. The effect of pulse-released nerve growth factor from genipin-crosslinked gelatin in schwann cell-seeded polycaprolactone conduits on large-gap peripheral nerve regeneration. **Tissue Eng. Part A**, v. 15, p. 547-557, 2009.

CHANG, W. D.; WU, J. H.; JIANG, J. A.; YEH, C. Y.; TSAI, C. T. Carpal tunnel syndrome treated with a diode laser: a controlled treatment of the transverse carpal ligament. **Photomed. Laser Surg.**, v. 26, n. 6, p. 551-557, 2008.

CHOMIAK, T.; HU, B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. **PLoS One.**, v. 4, n. 11, e. 7754, 2009.

COTE, M. P.; AMIN, A. A.; TOM, V. J.; HOULE, J. D. Peripheral nerve grafts support regeneration after spinal cord injury. **Neurotherapeutics.**, v. 8, n. 2, p. 294-303, 2011.

CRAWFORD, A. H.; CHAMBERS, C.; FRANKLIN, R. J. Remyelination: the true regeneration of the central nervous system. **J. Comp. Pathol.**, v. 149, n. 2-3, p. 242-254, 2013.

DOMINGOS, A. L.; TUCCI, S. J. R.; GARCIA, S. B.; DE BESSA, J. J. R.; COLOGNA, A. J.; MARTINS, A. C. Use of a latex biomembrane for bladder augmentation in a rabbit model: biocompatibility, clinical and histological outcomes. **Int. Braz. J. Urol.**, v. 35, n. 2, p. 217-224, 2009.

DOS REIS, F. A.; BELCHIOR, A. C.; DE CARVALHO PDE, T.; DA SILVA, B. A.; PEREIRA D. M.; SILVA, I. S.; NICOLAU, R. A. Effect of laser therapy (660 nm) on recovery of the sciatic nerve in rats after injury through neurotmesis followed by epineural anastomosis. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, n. 5, p. 741-747, 2009.

DUBOVÝ, P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. **Ann. Anat.**, v. 193, n. 4, p. 267-275, 2011.

- ELWAKIL, T. F.; ELAZZAZI, A.; SHOKEIR, H. Treatment of carpal tunnel syndrome by low-level laser versus open carpal tunnel release. **Lasers Med. Sci.**, v. 22, n. 4, p. 265-270, 2007.
- EVANS, G. R. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. **Anat. Rec.**, v. 263, n. 4, p. 396-404, 2001.
- FANCY, S. P.; CHAN, J. R.; BARANZINI, S. E.; FRANKLIN, R. J.; ROWITCH, D. H. Myelin regeneration: a recapitulation of development? **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 34, p. 21-43, 2011.
- FÉLIX, S. P.; PEREIRA LOPES, F. R.; MARQUES, S. A.; MARTINEZ, A. M. Comparison between suture and fibrin glue on repair by direct coaptation or tubulization of injured mouse sciatic nerve. **Microsurgery**, v. 33, n. 3, p. 468-477, 2013.
- FERGUSON, T. A.; SON, Y. J. Extrinsic and intrinsic determinants of nerve regeneration. **J. Tissue Eng.**, v. 2, n. 1, p. 2041731411418392, 2011.
- FRADE, M. A.; COUTINHO NETTO, J.; GOMES, F. G.; MAZZUCATO, E. L.; ANDRADE, T. A.; FOSS, N. T. Natural-biomembrane dressing and hypersensitivity. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 5, p. 885-891, 2011.
- FRADE, M. A.; ASSIS, R. V.; COUTINHO NETTO, J.; ANDRADE, T. A.; FOSS, N. T. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **An. Bras. Dermatol.**, v. 87, n. 1, p. 45-51, 2012.
- GANGA, M. V.; COUTINHO-NETTO, J.; COLLI, B. O.; MARQUES JUNIOR, W.; CATALÃO, C. H.; SANTANA, R. T.; OLTRAMARI, M. R.; CARRARO, K. T.; LACHAT, J. J.; LOPES, L. D. A. S. Sciatic nerve regeneration in rats by a nerve conduit engineering with a membrane derived from natural latex. **Acta Cir. Bras.**, v. 27, n. 12, p. 885-891, 2012.
- GARCEZ, V. F. **Influência do óxido nítrico na recuperação pós-lesão do nervo ciático de ratos**. 2004. 79 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.
- GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **J. Neuroinflammation**, v. 8, n. 111, p. 1-13, 2011.
- GERSHENBAUM, M. R.; ROISEN, F. J. The effects of dibutyl cyclic adenosine monophosphate on the degeneration and regeneration of crush-lesioned rat sciatic nerves. **Neuroscience**, v. 5, n. 9, p. 1565-1580, 1980.
- GIACCA, M.; ZACCHIGNA, S. VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond. **Gene Ther.**, v. 19, n. 6, p. 622-629, 2012.
- GIGO-BENATO, D.; RUSSO, T. L.; TANAKA, E. H.; ASSIS, L.; SALVINI, T. F.; PARIZOTTO, N. A. Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve. **Lasers Surg. Med.**, v. 42, n. 9, p. 673-682, 2010.

- GLENN, T. D.; TALBOT, W. S. Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 23, n. 6, p. 1041-1048, 2013.
- GOMES, L. E.; DALMARCO, E. M.; ANDRÉ, E. S. The brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, neurotrophin-3, and induced nitric oxide synthase expressions after low-level laser therapy in an axonotmesis experimental model. **Photomed. Laser Surg.**, v. 30, n. 11, p. 642-7, 2012.
- GOODMAN, J. D.; KAUFMAN, H. W. Effects of an Argon Laser on the Crystalline Properties and Rate of Dissolution in Acid of Tooth Enamel in the Presence of Sodium Fluoride, **J. Dent. Res.**, v. 56, n. 10, p. 1201-1207, 1977.
- HANNA-MITCHELL, A. T.; O'LEARY, D.; MOBARAK, M. S.; RAMER, M. S.; MCMAHON, S. B.; PRIESTLEY, J. V.; KOZLOVA, E. N.; ALDSKOGIUS, H.; DOCKERY, P.; FRAHER, J. P. The impact of neurotrophin-3 on the dorsal root transitional zone following injury. **Spinal Cord.**, v. 46, n. 12, p. 804-810, 2008.
- HASHIMOTO, T.; SUZUKI, Y.; KITADA, M.; KATAOKA, K.; WU, S.; SUZUKI, K.; ENDO, K.; NISHIMURA, Y.; IDE, C. Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons. **Exp. Brain. Res.**, v. 146, n. 3, p. 356-368, 2002.
- HASHMI, J. T.; HUANG, Y. Y.; OSMANI, B. Z.; SHARMA, S. K.; NAESER, M. A.; HAMBLIN, M. R. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. **PM. R.**, v. 12, p. s292-s305, 2010. Suppl. 2.
- HSIEH, Y. L.; CHOU, L. W.; CHANG, P. L.; YANG, C. C.; KAO, M. J.; HONG, C. Z. Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: possible involvements in hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α). **J. Comp. Neurol.**, v. 510, n. 13, p. 2903-2916, 2012.
- HUANG, J. K.; FANCY, S. P.; ZHAO, C.; ROWITCH, D. H., FFRENCH-CONSTANT, C.; FRANKLIN, R. J. Myelin regeneration in multiple sclerosis: targeting endogenous stem cells. **Neurotherapeutics.**, v. 8, n. 4, p. 650-658, 2011.
- IDE, C.; KATO, S. Peripheral nerve regeneration. **Neuroscience Res.**, p. 157-164, 1990. Suppl. 13.
- IDE, C.; TOHYAMA, K.; YOKOTA, R.; NITATORI, T.; ONODERA, S. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. **Brain Res.**, v. 12, n. 288, p. 61-75, 1983.
- IJKEMA-PAASSEN, J.; JANSEN, K.; GRAMSBERGEN, A.; MEEK, M.F. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. **Biomaterials.**, v. 25, n. 9, p. 1583-1592, 2004.
- ISHIKAWA, N.; SUZUKI, Y.; OHTA, M.; CHO, H.; SUZUKI, S.; DEZAWA, M.; IDE, C. Peripheral nerve regeneration through the space formed by a chitosan gel sponge. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 83, n. 1, p. 33-40, 2007.
- ISSA, J. P.; DEFINO, H. L.; NETTO, J. C.; VOLPON, J. B.; REGALO, S. C.; IYOMASA, M. M.; SIÉSSERE, S.; TIOSSI, R. Evaluation of rhBMP-2 and natural

latex as potential osteogenic proteins in critical size defects by histomorphometric methods. **Anat. Rec. (Hoboken)**, v. 293, n. 5, p. 794-801, 2010.

ISSA, J. P.; DEFINO, H. L.; PEREIRA, Y. C.; NETTO, J. C.; SEBALD, W.; BENTLEY, M. V.; IYOMASA, M. M.; ERVOLINO, E. Bone repair investigation using rhBMP-2 and angiogenic protein extracted from latex. **Microsc. Res. Tech.**, v. 75, n. 2, p. 145-152, 2012.

IYOMASA, M. M.; ISSA, J. P.; DE QUEIRÓZ TAVARES, M. L.; PEREIRA, Y. C.; STUANI, M. B.; MISHIMA, F.; COUTINHO-NETTO, J.; SEBALD, W. Influence of low-level laser associated with osteogenic proteins recombinant human BMP-2 and *Hevea brasiliensis* on bone repair in Wistar rats. **Microsc. Res. Tech.**, v. 75, n. 2, p. 117-125, 2012.

JANG, C. H.; CHO, Y. B.; CHOI, C. H. Effect of ginkgo biloba extract on recovery after facial nerve crush injury in the rat. **Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.**, v. 76, n. 12, p. 1823-1826, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488 p.

KIM, Y. S.; JO, D. H.; LEE, H.; KIM, J. H.; KIM, K. W.; KIM, J. H. Nerve growth factor-mediated vascular endothelial growth factor expression of astrocyte in retinal vascular development. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 431, n. 4, p. 740-745, 2013.

KIRYU-SEO, S.; KIYAMA, H. The nuclear events guiding successful nerve regeneration. **Front. Mol. Neurosci.**, v. 4, a. 53, p. 1-11, 2011.

KUMAGAI, K.; USHIKI, T.; TOHYAMA, K.; ARAKAWA, M.; IDE, C. Regenerating axons and their growth cones observed by scanning electron microscopy. **J Electron Microsc (Tokyo)**, v. 39, n. 2, p. 108-114, 1990.

LECHT, S.; ARIEN-ZAKAY, H.; WAGENSTEIN, Y.; INOUE, S.; MARCINKIEWICZ, C.; LELKES, P. I.; LAZAROVICI, P. Transient signaling of Erk1/2, Akt and PLCgamma induced by nerve growth factor in brain capillary endothelial cells. **Vascul. Pharmacol.**, v. 53, n. 3-4, p. 107-114, 2010.

LI, B. H.; KIM, S. M.; YOO, S. B.; KIM, M. J.; JAHNG, J. W.; LEE, J. H. Recombinant human nerve growth factor (rhNGF- β) gene transfer promotes regeneration of crush-injured mental nerve in rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 113, n. 3, p. e26-34, 2012.

LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair. A review. **Acta Orthop. Scand.**, v. 58, n. 2, p. 145-169, 1987.

LUQUE, M. C.; GUTIERREZ, P. S.; DEBBAS, V.; MARTINS, W. K.; PUECH-LEAO, P.; PORTO, G.; COELHO, V.; BOUMSELL, L.; KALIL, J.; STOLF, B. Phage Display Identification of CD100 in Human Atherosclerotic Plaque Macrophages and Foam Cells. **PLoS One**, v. 8, n. 9, e. 75772, 2013.

MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v. 187, p. 492-494, 1960.

- MARTINEZ DE ALBORNOZ, P.; DELGADO, P. J.; FORRIOL, F.; MAFFULLI, N. Non-surgical therapies for peripheral nerve injury. **Br. Med. Bull.**, v. 100, p. 73-100, 2011.
- MAZZER, P. Y.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N.; FAZAN, V. P. Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats. **J. Neurosci. Methods.**, v. 172, n. 2, p. 249-258, 2008.
- MEDALHA, C. C.; DI GANGI, G. C.; BARBOSA, C. B.; FERNANDES, M.; AGUIAR, O.; FALOPPA, F.; LEITE, V. M.; RENNO, A. C. Low-level laser therapy improves repair following complete resection of the sciatic nerve in rats. **Lasers Med. Sci.**, v. 27, n. 3, p. 629-635, 2012.
- MEEK, M. F.; VAREJÃO, A. S.; GEUNA, S. Use of skeletal muscle tissue in peripheral nerve repair: review of the literature. **Tissue Eng.**, v. 10, n. 7-8, p. 1027-1036, 2004.
- MELONI, M.; CAPORALI, A.; GRAIANI, G.; LAGRASTA, C.; KATARE, R.; VAN LINTHOUT, S.; SPILLMANN, F.; CAMPESI, I.; MADEDDU, P.; QUAINI, F.; EMANUELI, C. Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction. **Circ. Res.**, v. 106, n. 7, p. 1275-1284, 2010.
- MENDONÇA, R. J.; MAURÍCIO, V. B.; TEIXEIRA L. de B.; LACHAT, J. J.; COUTINHO-NETTO, J. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytother. Res.**, v. 24, n. 5, p. 764-768, 2010.
- MILORO, M.; HALKIAS, L. E.; MALLERY, S.; TRAVERS, S.; RASHID, R. G. Low-level laser effect on neural regeneration in Gore-Tex tubes. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 93, n. 1, p. 27-34, 2002.
- MIYASHITA, E.; FONSECA, A. S. **Odontologia estética**. São Paulo: Artes Médicas, 2004. 788 p.
- MLIGILICHE, N. L.; TABATA, Y.; KITADA, M.; ENDOH, K.; OKAMATO, K.; FUJIMOTO, E.; IDE, C. Poly lactic acid-caprolactone copolymer tube with a denatured skeletal muscle segment inside as a guide for peripheral nerve regeneration: a morphological and electrophysiological evaluation of the regenerated nerves. **Anat. Sci. Int.**, v. 78, n. 3, p. 156-161, 2003.
- MOSS, T. H.; LEWKOWICZ, S. J. A comparative scanning electron-microscopical study of endoneurial collagen around normal mouse nerve fibres, nerve fibres following crush injury and nerve fibres of the dystonic mouse mutant (dt/dt). **Cell Tissue Res.**, v. 220, n. 4, p. 881-887, 1981.
- MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese bioossitética de Látex estudo experimental em cães**. 1996. 114 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Anatomia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.
- MRUÉ, F.; COUTINHO-NETTO, J.; CENEVIVA, R.; LACHAT, J. J.; THOMAZINI, J. A.; TAMBELINI, H. Evaluation of The Biocompatibility of a New Biomembrane. **Materials Res.**, v. 7. n. 2, p. 277-283, 2004.

- MURAKAMI, M.; IDE, C.; KANAYA, H. Regeneration in the rat optic nerve after cold injury. **J. Neurosurg.**, v. 71, n. 2, p. 254-265, 1989.
- MURATORI, L.; RONCHI, G.; RAIMONDO, S.; GIACOBINI-ROBECCHI, M. G.; FORNARO, M.; GEUNA, S. Can regenerated nerve fibers return to normal size? A long-term post-traumatic study of the rat median nerve crush injury model. **Microsurgery.**, v. 32, n. 5, p. 383-387, 2012.
- NAKAJIMA, K.; IKEDA, M.; YAGYU, K.; NAKAJIMA, H.; MATSUMOTO, M.; SEIKE, M.; KODAMA, H. Xanthoma tissue-extracted LDL density substances are the main inducer of myelin-like bodies and ceroid granules in foam cells. **Med. Mol. Morphol.**, v. 40, n. 1, p. 40-45, 2007.
- OLIVEIRA, E. F.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; SELLI, M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. **J. Reconstr. Microsurg.**, v. 17, n. 1, p. 69-75, 2001.
- PACHIONI, C. A. S. **Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização.** 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- PARK, J.; LIM, E.; BACK, S.; NA, H.; PARK, Y.; SUN, K. Nerve regeneration following spinal cord injury using matrix metalloproteinase-sensitive, hyaluronic acid-based biomimetic hydrogel scaffold containing brain-derived neurotrophic factor. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 93, n. 3, p. 1091-1099, 2010.
- PARK, M. J.; KWAK, H. J.; LEE, H. C.; YOO, D. H.; PARK, I. C.; KIM, M. S.; LEE S. H.; RHEE, C. H.; HONG, S. I. Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and AP-2 transcription factor. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 42, p. 30485-30496, 2007.
- PATODIA, S.; RAIVICH, G. Role of transcription factors in peripheral nerve regeneration. **Front. Mol. Neurosci.**, v. 5, a. 8, p. 1-15, 2012.
- RAHBK, U. L.; DISSING, S.; THOMASSEN, C.; HANSEN, A. J.; TRITSARIS, K. Nerve growth factor activates aorta endothelial cells causing PI3K/Akt- and ERK-dependent migration. **Pflugers. Arch.**, v. 450, n. 5, p. 355-361, 2005.
- RAIMONDO, S.; FORNARO, M.; DI SCIPIO, F.; RONCHI, G.; GIACOBINI-ROBECCHI, M. G.; GEUNA, S. Chapter 5: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part II-morphological techniques. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 87, p. 81-103, 2009.
- RAIMONDO, S.; FORNARO, M.; TOS, P.; BATTISTON, B.; GIACOBINI-ROBECCHI, M. G.; GEUNA, S. Perspectives in regeneration and tissue engineering of peripheral nerves. **Ann. Anat.**, v. 193, n. 4, p. 334-340, 2011.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy, **J. Cell Biol.**, v. 17, p. 208, 1963.

ROCHKIND, S.; LEIDER-TREJO, L.; NISSAN, M.; SHAMIR, M. H.; KHARENKO, O.; ALON, M. Efficacy of 780-nm laser phototherapy on peripheral nerve regeneration after neurotube reconstruction procedure (double-blind randomized study). **Photomed. Laser Surg.**, v. 25, n. 3, p. 137-143, 2007a.

ROCHKIND, S.; DRORY, V.; ALON, M.; NISSAN, M.; OUAKNINE, G. E. Laser phototherapy (780 nm), a new modality in treatment of long-term incomplete peripheral nerve injury: a randomized double-blind placebo-controlled study. **Photomed Laser Surg.**, v. 25, n. 5, p. 436-442, 2007b.

ROCHKIND, S. Phototherapy in peripheral nerve regeneration: from basic science to clinical study. **Neurosurg. Focus**, v. 26, p. e:8, 2009.

ROVAK, J. M.; MUNGARA, A. K.; AYDIN, M. A.; CEDERNA, P. S. Effects of vascular endothelial growth factor on nerve regeneration in acellular nerve grafts. **J. Reconstr. Microsurg.**, v. 20, n. 1, p. 53-58, 2004.

RUSHTON, W. A. A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. **J. Physiol.**, v. 115, n. 1, p. 101-122, 1951.

SAMPAIO, R. B.; MENDONCA, R. J.; SIMIONI, A. R.; COSTA, R. A.; SIQUEIRA, R. C.; CORREA, V. M.; TEDESCO, A. C.; HADDAD, A.; COUTINHO NETTO, J.; JORGE, R. Rabbit retinal neovascularization induced by latex angiogenic-derived fraction: an experimental model. **Curr. Eye Res.**, v. 35, n. 1, p. 56-62, 2010.

SANTOS, A. P.; SUAID, C. A.; XAVIER, M.; YAMANE, F. Functional and morphometric differences between the early and delayed use of phototherapy in crushed median nerves of rats. **Lasers Med. Sci.**, v. 27, n. 2, p. 479-486, 2012.

SENGUPTA, B.; NARASIMHULU, C. A.; PARTHASARATHY, S. Novel technique for generating macrophage foam cells for in vitro reverse cholesterol transport studies. **J. Lipid. Res.**, v. 54, n. 12, p. 3358-3372, 2013.

SHEN, C. C.; YANG, Y. C.; LIU, B. S. Large-area irradiated low-level laser effect in a biodegradable nerve guide conduit on neural regeneration of peripheral nerve injury in rats. **Injury**, v. 41, n. 8, p. 803-813, 2011.

SHIN, D. H.; LEE, E.; HYUN, J. K.; LEE, S. J.; CHANG, Y. P.; KIM, J. W.; CHOI, Y. S.; KWON, B. S. Growth-associated protein-43 is elevated in the injured rat sciatic nerve after low power laser irradiation. **Neurosci. Lett.**, v. 344, n. 2, p. 71-74, 2003.

TANAKA, K. High resolution scanning electron microscopy of the cell. **Biol. Cell.**, v. 65, p. 89-98, 1989.

URZUA, U.; TAPIA, V.; GERALDO, M. P.; SELMAN, A.; VEGA, M.; ROMERO, C. Nerve growth factor stimulates cellular proliferation of human epithelial ovarian cancer. **Horm. Metab. Res.**, v. 44, n. 9, p. 656-661, 2012.

USHIKI, T.; HAYASHI, S.; IDE, C. The filamentous meshwork in the Schwann cell basement membrane as revealed by transmission and scanning electron microscopy. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 53, n. 5, p. 523-530, 1990.

- USHIKI, T.; IDE, C. Autonomic nerve networks in the rat exocrine pancreas as revealed by scanning and transmission electron microscopy. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 51, n. 1, p. 71-81, 1988.
- USHIKI, T.; IDE, C. Scanning electron microscopic studies of the myelinated nerve fibres of the mouse sciatic nerve with special reference to the Schwann cell cytoplasmic network external to the myelin sheath. **J. Neurocytol.**, v. 16, n. 6, p. 737-747, 1987.
- USHIKI, T.; IDE, C. Three-dimensional architecture of the endoneurium with special reference to the collagen fibril arrangement in relation to nerve fibers. **Arch. Histol. Jpn.**, v. 49, n. 5, p. 553-563, 1986.
- WANG, W. X.; HU, X. Y.; XIE, X. J.; LIU, X. B.; WU, R. R.; WANG, Y. P.; GAO, F.; WANG, J. A. Nerve growth factor induces cord formation of mesenchymal stem cell by promoting proliferation and activating the PI3K/Akt signaling pathway. **Acta. Pharmacol. Sin.**, v. 32, n. 12, p. 1483-1490, 2011.
- WATANABE, I. **Scanning electron microscopy atlas of cells and tissues of the oral cavity**. São Paulo: ICB/SBIB, Publicação FAPESP e CNPQ, 1998.196 p.
- WATANABE, I.; KORIYAMA, Y.; YAMADA, E. High-resolution scanning electron microscopic study of the mouse submandibular salivary gland. **Acta Anat.**, v. 143, p. 59-66, 1992.
- WATANABE, I.; YAMADA, E. Fine structure of lamellated nerve endings found in rat gingiva. **Arch. Hist. Jap.**, v. 46, p. 173-182, 1983.
- WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Applications of solutions containing lead and barium. **J. Biophys. Cytol.**, v. 4, n. 6, p. 727-730, 1958.
- WOOD, M. D.; KEMP, S. W.; WEBER, C.; BORSCHER, G. H.; GORDON, T. Outcome measures of peripheral nerve regeneration. **Ann. Anat.**, v. 193, n. 4, p. 321-333, 2011.
- WU, X.; DMITRIEV, A. E.; CARDOSO, M. J.; VIERS-COSTELLO, A. G.; BORKE, R. C.; STREETER, J.; ANDERS, J. J. 810 nm Wavelength Light: An Effective Therapy for Transected or Contused Rat Spinal Cord. **Lasers Surg. Med.**, v. 41, p. 36-41, 2009.
- XIAO, L.; TSUTSUI, T. Human dental mesenchymal stem cells and neural regeneration. **Hum. Cell.**, v. 26, n. 3, p. 91-96, 2013.
- YANG, Z. X.; CHEN, P. D.; YU, H. B.; LUO, W. S.; WU, Y. G.; PI, M.; PENG, J. H.; LIU, Y. F.; ZHANG, S. Y.; GOU, Y. H. Research advances in treatment of cerebral ischemic injury by acupuncture of conception and governor vessels to promote nerve regeneration. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.**, v. 10, n. 1, p. 19-24, 2012.
- YAZDANI, S. O.; GOLESTANEH, A. F.; SHAFIEE, A.; HAFIZI, M.; OMRANI, H. A.; SOLEIMANI, M. Effects of low level laser therapy on proliferation and neurotrophic factor gene expression of human schwann cells in vitro. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 107, p. 9-13, 2012.

YEN, P.; FINLEY, S. D.; ENGEL-STEFANINI, M. O.; POPEL, A. S. A two-compartment model of VEGF distribution in the mouse. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e. 27514 , 2011.

YOUNG, C.; MILLER, E.; NICKLOUS, D. M.; HOFFMAN, J. R. Nerve growth factor and neurotrophin-3 affect functional recovery following peripheral nerve injury differently. **Restor. Neurol. Neurosci.**, v. 18, n. 4, p. 167-175, 2001.

YU, W.; NAIM, J. O.; MCGOWAN, M.; IPPOLITO, K.; LANZAFAME, R. J. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. **Photochem. Photobiol.**, v. 66, n. 6, p. 866-871, 1997.

ZETTLER, C.; BRIDGES, D. C.; ZHOU, X. F.; RUSH, R. A. Detection of increased tissue concentrations of nerve growth factor with an improved extraction procedure. **J. Neurosci. Res.**, v. 46, p. 581–594, 1996.

ZHAO, J.; YU, H.; XU, Y.; BAI, Y. Experimental study on regeneration of sciatic nerve injury with physical therapy. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.**, v. 25, n. 1, p. 107-111, 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE – Artigo referente à presente tese publicado na revista “Biomed Research International”

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2013, Article ID 597863, 11 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/597863>

Research Article

Application of a Low-Level Laser Therapy and the Purified Protein from Natural Latex (*Hevea brasiliensis*) in the Controlled Crush Injury of the Sciatic Nerve of Rats: A Morphological, Quantitative, and Ultrastructural Study

Fernando José Dias,¹ João Paulo Mardegan Issa,² Mamie Mizusaki Iyomasa,² Joaquim Coutinho-Netto,³ Ricardo Alexandre Junqueira Calzzani,^{2,4} Daniela Mizusaki Iyomasa,² Luiz Gustavo Sousa,² Sonia Regina Yokomizo de Almeida,¹ Diego Pulzatto Cury,¹ and Ii-sei Watanabe¹

¹ Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, 2415 Avenida Professor Lineu Prestes, 05508-900 Sao Paulo, SP, Brazil

² Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology, Faculty of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, S/N Avenida do Café, 14040-904 Ribeirao Preto, SP, Brazil

³ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, 3900 Avenida Bandeirantes, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil

⁴ Dental School, University of La Frontera, 1145 Avenida Francisco Salazar, 01145 Temuco, Chile

Correspondence should be addressed to Ii-sei Watanabe; watanabe@icb.usp.br

Received 10 April 2013; Revised 5 June 2013; Accepted 5 June 2013

Academic Editor: Richard Tucker

Copyright © 2013 Fernando José Dias et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This study analyzed the effects of a low-level laser therapy (LLLT, 15 J/cm², 780 nm wavelength) and the natural latex protein (PI, 0.1%) in sciatic nerve after crush injury (15 Kgf, axonotmesis) in rats. Sixty rats (male, 250 g) were allocated into the 6 groups ($n = 10$): CG—control group; EG—nerve exposed; IG—injured nerve without treatment; LG—crushed nerve treated with LLLT; PG—injured nerve treated with PI; and LPG—injured nerve treated with LLLT and PI. After 4 or 8 weeks, the nerve samples were processed for morphological, histological quantification and ultrastructural analysis. After 4 weeks, the myelin density and morphological characteristics improved in groups LG, PG, and LPG compared to IG. After 8 weeks, PG, and LPG were similar to CG and the capillary density was higher in the LG, PG, and LPG. In the ultrastructural analysis the PG and LPG had characteristics that were similar to the CG. The application of LLLT and/or PI improved the recovery from the nerve crush injury, and in the long term, the PI protein was the better treatment used, since only the application of LLLT has not reached the same results, and these treatments applied together did not potentiate the recovery.

1. Introduction

Peripheral nerves are extensions from neurons that are located in columns and spinal cord ganglia, and the peripheral portions are dependent on the continuity and integrity of the central portions [1].

Approximately 4.5% of injuries to soft tissue and 5% of open wounds in the extremities that are due to accidents

result in an impairment of peripheral nerves that requires surgical repair [2]. The treatment of peripheral nerve injuries remains a challenge, despite advances in the understanding of nerve regeneration in microsurgical techniques, and the functional recovery from postperipheral nerve repair remains unsatisfactory [3, 4]. The consequences include injury and retrograde axonal degeneration of neurons followed by a very slow regeneration [4]. Nerve regeneration can

be studied using several experimental models, but the crush model is advantageous because it does not involve section and suture variables [5].

Many studies that have evaluated the low-level laser therapy (LLLT) as a treatment for peripheral nerve injury have observed several changes that are obtained with this therapy [6], such as improvement in function, neuromuscular activity, and evocation [7–11]; thus, it reduces neuropathic pain [12], accelerates migration, cell growth, and nerve fiber sprouting in cell cultures [8], changes the activity of nerve cells, induces the upregulation of several neurotrophic growth factors and extracellular matrix proteins that support neurite outgrowth [13], and stimulates Schwann cell proliferation and the expression of NGF [14]. Specifically, in the crush model using the LLLT (660 and 780 nm wavelength, 10 and 60 J/cm²), which is irradiated on the sciatic nerve of rats, treatment restored the myelin sheath and cross-sectional area of the nerve [15]. These data became the basis for clinical research evaluating the effectiveness of LLLT treatment in patients suffering from lesions on peripheral nerves [10].

A new protein derived from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*), named P1 protein, was identified at the Laboratory of Neurochemistry of Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo [16]. This protein stimulates angiogenic activity, cell adhesion, extracellular matrix formation, substitution, and tissue regeneration as well as improves wound healing in skin tissue, the pericardium, esophagus, abdominal wall, tympanum, blood vessels, and connective tissue of eye without producing signs of hypersensitivity [17, 18]. In addition to these results, the P1 protein also acted on dermal ulcers, increasing vascular permeability and improving the healing process [18], and the retina, where it increased neovascularization [19]. In mineralized tissues, the P1 protein facilitates the reconstitution of bone defects by vascularizing the collagen matrix [20]. To simulate clinical conditions in rats, a biomembrane containing the P1 protein was used as a neurotube (axonal growth guide) in a study of sciatic nerve resection. This material improved the quality of nerve regeneration, nerve impulse conduction, and the functional gait of the animals [21].

Thus, the present study aims to evaluate the effects of the LLLT along with the new biomaterial, the P1 protein, in the treatment of controlled nerve crush injury using morphological, quantitative, and ultrastructural analyses.

2. Material and Methods

2.1. Animals. Sixty Wistar rats (♂, 250–300 g) were allocated into six groups ($n = 10$). Animals were housed in polyethylene boxes with 5 animals each in rooms with controlled temperature (22–24°C) and dark/light cycles of 12 h. They were fed with chow and water *ad libitum* and were not subjected to unnecessary stress. The study protocol was approved by the local Ethics Committee (Protocol no. 078/2010) according to international laws of animal use.

2.2. Nerve Injury. Animals were anesthetized with ketamine and xylazine at dosages of 75 and 10 mg/kg, respectively, and

TABLE 1: Low-level laser therapy parameters.

Power	30 mW
Intensity	0.75 W/cm ²
Energy density	15 J/cm ²
Wavelength	780 nm
Application time (per point)	20 s
Point of irradiation	3
Laser wave type	Continuous wave (CW)
Beam direction	Perpendicular to skin
Energy (per point)	0.6 J
Spot area	0.04 cm ²
Sessions/frequency of irradiation	6/48 h

after the left sciatic nerve was exposed, they were positioned on a stainless steel base coupled to a EMIC universal testing machine (EMIC-DL2000, Paraná, Brazil). The left sciatic nerve crush was performed according to the method of a previous study [22]. The site of injury was standardized based on two bone processes from the iliac crest easy to locate (upper and inferior ventral spine). The skin incision (2 cm approximately) was made perpendicularly and 2 cm toward the middle region between these points, then the muscle fascia was ruptured over the region of anterior belly of the biceps femoris and gluteus maximus, and these muscles were divulsed, not requiring incision, and finally the nerve was exposed to injury. To collect the nerve samples we followed the same anatomical references. The weight applied on the sciatic nerve was a constant force of 15 kgf for 10 minutes, crushing a circular area of approximately 0.28 cm² (0.6 cm diameter) totaling 5.2 MPa. After the injury, the nerve was repositioned, the skin was sutured, and antiseptic, anti-inflammatory, and antibiotic medications were applied to prevent further complications.

2.3. Low-Level Laser Therapy—LLLT. The Twin Laser apparatus (MM Optics, São Carlos, Brazil) apparatus was used for laser irradiation. The application of LLLT was performed in a transcutaneous way in order to simulate clinical use. Three points of application were chosen following the path of the sciatic nerve for better distribution of energy. The application sites were determined by the scar on the skin related to surgical access to the sciatic nerve. The three points were 1 point proximal to the lesion area, 1 point in the damaged area, taking care to move the scar pulling up the skin, so interference will not occur in the scar tissue absorption and scattering of LLLT, and finally 1 point distal region of the scar. During the laser application, a contention was used to immobilize the animals to avoid the use of local or general anesthesia. The parameters for laser irradiation are listed in Table 1.

2.4. Natural Protein from Latex (*Hevea brasiliensis*)—P1 Protein. The vehicle used to deliver the P1 protein from *Hevea brasiliensis* was the hyaluronic acid [23]. The hyaluronic acid (Nikkol, Japan), isolated from gram-negative bacteria, was used at a final concentration of 1% with the 0.1% P1 protein.

FIGURE 1: Myelin density quantification: (a) original sciatic nerve photomicrograph; (b) photomicrograph of the sciatic nerve with the peripheral and blood capillaries areas cleared; (c) photomicrograph in binary (black and white) used during quantification.

The mixture was inserted using a micropipette (100 μL) *in situ* after injury and just before the suture. Hyaluronic acid and P1 protein were provided by the Laboratory of Neurochemistry, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo.

2.5. Experimental Groups. The current study evaluated six groups ($n = 10$) at four ($n = 5$) and eight weeks ($n = 5$) after the injury, and the protocols for each group are described below.

Control group (CG) animals were anesthetized and kept lying in a lateral position for 10 minutes. For the exposed group (EG), the sciatic nerve was exposed and positioned on the lesion support for 10 minutes. In the injured group (IG), the sciatic nerve was exposed and crushed. The LLLT group (LG) had the sciatic nerve exposed and crushed, and then the animals were submitted to the LLLT irradiation protocol. For the protein group (PG), the sciatic nerve was exposed and crushed, and then the P1 protein was applied on the lesion site. In the laser and protein group (LPG), the sciatic nerve was exposed and crushed, the P1 protein was applied on the injury site, and then the animals were submitted to the laser protocol.

2.6. Samples Processing and Analyses. Four or 8 weeks following the nerve injury, the animals were anesthetized (ketamine and xylazine at dosages of 75 and 10 mg/kg, resp.) and subjected to intracardiac perfusion with a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1M sodium phosphate buffer [24]. To process the sciatic nerve samples for morphological analysis by light microscopy, the samples were embedded in "Leica Histo-resin," cut with glass knives (3 μm), mounted on slides, and stained with neutral red and black Sudan to visualize the myelin sheaths of nerve fibers. The histological analyses were performed using a DM4000B Leica microscope with the EC3 Leica

camera. To process the nerve samples for analysis using transmission electron microscopy, the samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 2 hours, post-fixed in 1% OsO_4 at 4°C for 2 h, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, and embedded in Spurr resin. Finally, ultrathin sections (90 nm) were mounted on 200 mesh grids, counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a JEOL 1010 electron microscope operating at 80 kV at the Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo.

2.7. Quantitative Analysis. The quantitative histological analysis of the myelin consisted of quantifying the number of pixels. In the original images (Figure 1(a)), the external and the capillaries areas have been erased (Figure 1(b)) using the software Photoshop CS, and this procedure was necessary since this dark staining in particular areas of the erythrocytes could be interpreted as myelin. The next step is to convert the cleaned images into binary form (black and white) (Figure 1(c)), which was performed using the ImageJ 1.45 s software, with the following commands "process/binary/make it binary," or if you prefer to use Photoshop CS software commands "image/adjust/threshold," in this case it is necessary to choose a threshold point (1–255), which once chosen, this value should be respected in all images analyzed; in this study the images were transformed into binary by Photoshop CS method with the threshold point of 128. The binary images in ImageJ software with the following command "plugins/analyze/area calculator" (area calculator plugin, free download at <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/area.html>, not included in original plugin pack of ImageJ) provide the area of the dark region in pixels² representing myelin; if the program was calibrated to the scale of the microscope used in the capture of the images, it is possible to obtain the same area in μm^2 . For the realization of area ratio of myelin (myelin area/nerve area) it was also necessary to measure the cross-sectional area of the sciatic nerve, which

FIGURE 2: Light microscopy morphology—(a) CG—4 weeks—normal bundles of nerve fibers (*) and blood capillaries (arrows) (mag: $\times 10$, bar: $100\ \mu\text{m}$). (b) EG—4 weeks—bundles of nerve fibers (*), blood capillaries (arrows), and the perineurium area (thin arrows) (mag: $\times 10$, bar: $100\ \mu\text{m}$). (c) IG—4 weeks—spaces (arrowheads) among nerve fibers (*) containing an amorphous substance and blood capillaries (arrow) (mag: $\times 10$, bar: $100\ \mu\text{m}$). (d) LG 4-weeks—bundles of nerve fibers (*) surrounded by spaces (arrowheads) and the perineurium (thin arrow) (magnification: $\times 10$ bar: $100\ \mu\text{m}$). (e) PG—weeks—the nerve fibers (*), the perineurium (thin arrows), and blood capillaries (arrows) are noted (mag: $\times 10$, bar: $100\ \mu\text{m}$). (f) LPG—4 weeks—reveals the bundles of nerve fibers (*), the space between the fibers (arrowheads) and capillaries (arrows) (mag: $\times 10$, bar: $100\ \mu\text{m}$). (g) CG—8 weeks—normal nerve fibers (*) divided into bundles by perineurium (thin arrow) and blood capillaries (arrows) (mag: $\times 10$, bar: $100\ \mu\text{m}$). (h) EG—8 weeks—bundles of nerve fibers (*), the perineurium region (thin arrows), and blood capillaries (arrows) (mag: $\times 10$, bar: $100\ \mu\text{m}$). (i) IG—8 weeks—nerve fibers (*), capillaries (arrows), the perineurium (thin arrows), and the spaces between the fibers (arrowhead) (mag: $\times 10$, bar: $100\ \mu\text{m}$). (j) LG—8 weeks—bundles of nerve fibers (*), the perineurium region (thin arrows), and blood capillaries (arrows) (mag: $\times 10$, bar: $100\ \mu\text{m}$). (k) PG—8 weeks—bundles of nerve fibers (*) and blood capillaries (arrows) similar to the CG (mag: $\times 10$, bar: $100\ \mu\text{m}$). (l) LPG—8 weeks—nerve fibers (*), the perineurium (thin arrows), and blood capillaries (arrows) similar to the CG (mag: $\times 10$, bar: $100\ \mu\text{m}$).

was obtained from the original images (Figure 1(a)) using the command “Polygon selections” encircling the region of the nerve and then the command “analyze/measure.” The ratio was obtained by dividing the first value obtained in relation to the cross-sectional area of the nerve; these data were compared between groups. For the analysis of capillary density, blood vessels were counted and then the ratio of vessels/nerve area ($\text{capillaries}/\text{mm}^2$) was compared among the groups. Statistical analysis of the quantitative analyses

was performed using the SPSS 17.0 software, employing an analysis of variance (ANOVA, $P < 0.05$).

3. Results

3.1. Morphological Analysis. Histological analysis after 4 weeks from the start of the experiment revealed normal morphology in the CG (Figure 2(a)) and EG (Figure 2(b))

without changes in the nerve fibers with different diameters, which were arranged for conjunctive wraps and the presence of capillaries of different sizes distributed through the cross-sectional area of the sciatic nerve. However, the IG (Figure 2(c)) had significant changes in morphologic characteristics, such as the loss of myelinated nerve fiber density, myelin fibers of reduced and uniform size, the appearance of spaces between nerve fibers containing an amorphous substance, disorganization of the perineural region, and changes in blood capillaries, which reflected structural changes of the sciatic nerve in that group. The other groups that were analyzed 4 weeks after nerve injury had marked morphological characteristics compared to the IG. The LG (Figure 2(d)) and LPG (Figure 2(f)) had similar morphological characteristics, in which the internal contents of the sciatic nerve were more organized and had reduced space between the nerve fibers compared to the IG; however, these groups still had a loss of nerve fiber density and altered perineural areas in this period of analysis. The PG (Figure 2(e)) had characteristics that were closer to the CG, with a better organization of the internal components of the sciatic nerve and a greater density of nerve fibers; however, the results still indicated a loss of quality in these characteristics compared to the control group samples.

Eight weeks after the nerve crush injury, the morphological characteristics of the CG (Figure 2(g)) and EG (Figure 2(h)) were normal, as observed in the previous period of analysis, and only a slight spacing of nerve fibers was observed in the EG. Again, the IG (Figure 2(i)) revealed density loss for nerve fibers, but in this period of analysis, the spaces between the fibers were no longer present and the internal organization was better compared with the IG samples observed 4 weeks after the injury. The LG (Figure 2(j)) had improved morphology compared with the IG after 8 weeks and with the LG after 4 weeks of nerve injury because the density and organization of nerve fibers were higher in this group. In this period of analysis, the PG (Figure 2(k)) and LPG (Figure 2(l)) revealed different characteristics, corresponding to the groups analyzed in the fourth postoperative week, and the observed features at 8 weeks resemble the characteristics of the CG and EG.

3.2. Ultrastructural Analysis—Transmission Electron Microscopy. In the fourth postoperative week, the CG had no alterations in the sciatic nerve, which contained both myelinated and unmyelinated nerve fibers of different sizes arranged in groups, and most of the fibers had thick myelin sheaths (Figure 3(a)). In the axoplasm, the mitochondria and neurofilaments could be observed, and collagen fibers were present in the endoneurial region. Additionally, the Schwann cells had a normal appearance and included nerve fibers (Figure 3(b)). The EG had normal characteristics, as myelin fibers of many diameters and shapes in separate bundles and few unmyelinated fibers were visible (Figure 3(c)). Myelinated nerve fibers were surrounded by Schwann cell cytoplasm. In the axoplasm of nerve fibers, neurofilaments and mitochondria were observed (Figure 3(d)). In the IG, myelin fibers were spaced (Figure 3(e)), as noted in the amorphous endoneurium areas. There were areas of degeneration of

nerve fibers and electron-dense structures in the shape of lines that corresponded to the residues of Schwann cells (Figure 3(f)). In the samples obtained from the LG, there were unmyelinated and myelinated fibers of varying diameters, with smaller spacing between the fibers compared to the IG; however, there were still visible characteristics of nerve degeneration (Figure 3(g)). The axoplasm encloses neurofilaments and mitochondria, and the Schwann cells surround nerve fibers. However, there were signs of degeneration, such as linear structures corresponding to the remains of Schwann cells (Figure 3(h)). The PG revealed myelinated and unmyelinated fibers with homogeneous diameters organized into bundles, and there were still regions of nerve degeneration but with smaller areas compared to the IG and LG (Figure 3(i)). The details of the myelin fiber revealed that it was surrounded by Schwann cell cytoplasm, containing mitochondria adjacent to the degenerated fibers (Figure 3(j)). In the LPG, there were many myelinated nerve fibers arranged in bundles and there was little variation in their diameters, and unmyelinated fibers were rarely observed (Figure 3(k)). In this group, areas of the degeneration of nerve fibers were observed in the midst of normal nerve fibers (Figure 3(l)).

Eight weeks after the injury, the CG had characteristics similar to those observed in the control group that was analyzed after four weeks, as the groups of myelinated and unmyelinated fibers were present in various sizes and shapes and Schwann cells were present surrounding the fibers (Figure 4(a)). The myelinated fibers adjacent to one group of unmyelinated fibers are shown in detail in the endoneurial area that contains collagen fibers and the cytoplasm of Schwann cells with mitochondria (Figure 4(b)). In the EG, myelin fibers and large amounts of unmyelinated fibers of varying diameters were present (Figure 4(c)). In the axoplasm of unmyelinated and myelinated fibers, neurofilaments and mitochondria were revealed, and the lamellar organization of the myelin sheath was also observed (Figure 4(d)). Characteristics of degeneration were not observed in these first two groups during this analysis period. The IG presented the presence of nerve fibers that were closer to each other compared to the IG 4 weeks after the injury; however, the presence of large areas of nerve fibers degeneration located between intact fibers was visible (Figure 4(e)). Myelin debris could be observed in the areas of nerve fiber degeneration (Figure 4(f)). In the LG, one could observe that the myelinated nerve fibers and unmyelinated diameters and shapes were arranged in bundles, with large spaces between nerve fibers and structures of the linear remnants of Schwann cells (Figure 4(g)). Additionally, the myelin debris in an area of degeneration was surrounded by intact myelinated and unmyelinated fibers (Figure 4(h)). The PG had numerous unmyelinated and myelinated fibers of varying diameters, with few areas of degeneration between the intact fibers (Figure 4(i)). A more detailed view of the myelinated fiber the sheath revealed normal characteristics around the axoplasm, enveloped by a Schwann cell, and collagen fibers were observed in the endoneurial region (Figure 4(j)). The LPG revealed the presence of myelinated and unmyelinated fibers that were arranged in bundles and regions of nerve degeneration with the Schwann cell cytoplasm having a dense

FIGURE 3: Transmission electron microscopy after 4 weeks of nerve injury: (a) CG—normal myelinated (M) and unmyelinated (arrows) fibers (mag: $\times 6,000$). (b) CG—detailed image of the Schwann cell nucleus (N) involving a myelin nerve fiber (M) (mag: $\times 20,000$). (c) EG—grouping of myelinated fibers (M) and a few unmyelinated fibers (arrows) (mag: $\times 2,000$). (d) EG—detailed image of the axoplasm of the myelin fiber (*) with mitochondria (arrowheads) (mag: $\times 12,000$). (e) IG—area of degeneration of nerve fibers (thin arrows) below the capillary blood and spaces among the nerve fibers (**) (mag: $\times 3,000$). (f) IG—detailed image of the degenerating nerve fibers area (**), intact myelinated fibers (M), and linear structures that indicate Schwann cell degeneration (thin arrows) (mag: $\times 6,000$). (g) LG—myelinated fibers (M) and degenerated Schwann cells (thin arrow) (mag: $\times 2,500$). (h) LG—detailed image of the axoplasm of intact myelinated fibers (*) containing mitochondria (arrowheads) and remnants of Schwann cells (thin arrow) (mag: $\times 6,000$). (i) PG—myelinated (arrowheads) and unmyelinated fibers (arrows) amid areas of degeneration (thin arrows) (mag: $\times 1,800$). (j) PG—detailed image of myelinated fibers enveloped by Schwann cell cytoplasm containing mitochondria (arrows) and degeneration adjacent area (thin arrow) (mag: $\times 7,000$). (k) LPG—grouping of myelinated fibers (arrows) and adjacent fibroblasts (arrowheads) in the perineural region (mag: $\times 1,800$). (l) LPG—detailed image of a degenerated area among nerve fibers (**) adjacent to Schwann cells (arrows) (mag: $\times 5,600$).

appearance; additionally, some areas of fiber degeneration were still observable (Figure 4(k)). The grouping of myelinated and unmyelinated nerve fibers of various diameters could be observed in detail, and the axoplasm contained neurofilaments and mitochondria along with the presence of a Schwann cell with an evident nucleus (Figure 4(l)).

3.3. Quantitative Analyses. The histological quantification in the fourth postoperative week (Table 2) revealed that the ratio of the myelin/cross-sectional area of the sciatic nerve (Figure 5(a)) in the CG (60.28 ± 9.66) and EG (57.55 ± 11.86)

was statistically similar and higher than in the other groups. The myelin/cross-sectional area ratios of the LG (40.81 ± 13.07), PG (43.72 ± 14.83), and LPG (36.64 ± 8.32) were similar and had values significantly higher than the IG (32.37 ± 7.78), which was the group with the lowest value in this analysis period. The analysis of the blood capillary density data (number of capillaries/ mm^2) (Figure 5(b)) from the six study groups 4 weeks after the injury revealed no significant differences (CG— 86.03 ± 30.08 ; EG— 85.69 ± 22.07 ; IG— 75.45 ± 26.62 ; LG— 78.83 ± 39.67 ; PG— 77.80 ± 26.10 ; and LPG— 98.16 ± 20.87).

FIGURE 4: Transmission electron microscopy after 8 weeks of nerve injury: (a) CG—general view of the sciatic nerve fibers with myelin (M), groups of unmyelinated fibers (arrows), and Schwann cells with evident nucleus (N) (mag: $\times 3,000$). (b) CG—detailed image of mitochondria in the axoplasm of a myelinated fiber (arrow) and in the cytoplasm of Schwann cells (arrowhead) (mag: $\times 20,000$). (c) EG—myelinated fibers (M) and a grouping of unmyelinated fibers (arrows) (mag: $\times 3,000$). (d) EG—detailed image of the neurofilaments of the axoplasm (*) and the lamellae of myelin (arrows) (mag: $\times 30,000$). (e) IG—degenerated areas (**) among the intact myelin fibers (M) (mag: $\times 3,000$). (f) IG—Details of an area of degeneration of nerve fibers in the presence of myelin debris (thin arrows) (mag: $\times 5,000$). (g) LG—myelinated (arrows) and unmyelinated fibers (arrowheads) arranged in bundles (mag: $\times 2,500$). (h) LG—degenerated area of nerve fibers (**) containing myelin debris (thin arrows)—(mag: $\times 6,000$). (i) PG—grouping of myelinated (arrows) and unmyelinated (arrowheads) nerve fibers, and an area of degeneration (thin arrow) (mag: $\times 2,500$). (j) PG—detailed image of groupings of unmyelinated fibers with mitochondria (arrowheads) in axoplasm (*) and collagen fibers of the endoneurium (C) (mag: $\times 20,000$). (k) LPG—general view of bundles of myelinated fibers (arrows) and an area of degeneration (arrowheads) (mag: $\times 1,800$). (l) LPG—detailed image of a bundle of nerve fibers reveals myelinated and (M) unmyelinated fibers (arrowheads) and Schwann cells (S) (mag: $\times 5,600$).

Data from the histological quantification 8 weeks after nerve injury are shown in Table 3, and analysis of the myelin/nerve area ratio (Figure 5(c)) revealed that the CG (47.85 ± 5.06), EG (40.60 ± 7.19), PG (43.04 ± 12.00), and LPG (43.19 ± 10.55) were statistically similar and had higher values of this parameter compared to the other groups. Thus, the LG (35.89 ± 14.25) had a lower value for this parameter compared to the previous group; however, it was higher than the IG (26.14 ± 11.61). The capillary density values (number of capillaries/ mm^2) (Figure 5(d)) 8 weeks after causing the nerve lesion revealed that the CG (99.22 ± 25.29), EG (87.60 ± 20.88), and IG (99.12 ± 22.56) were similar, as they had

the lowest values of this parameter. While the LG (116.59 ± 21.24) had significantly higher values compared to these three groups, its value was lower in comparison to the PG (135.35 ± 27.45) and LPG (140.84 ± 19.82), whose values were the highest among all six groups analyzed 8 weeks after nerve injury.

4. Discussion

The understanding of axonal regeneration has long been a subject of research in neuroscience and regenerative medicine [25]. The high incidence of these lesions and

FIGURE 5: (a) Chart 1—ratio myelin/nerve area, 4 weeks after injury. (b) Chart 2—ratio myelin/nerve area, 8 weeks after injury. (c) Chart 3—capillary density, 4 weeks after injury. (d) Chart 4—capillary density, 8 weeks after injury.

TABLE 2: Quantitative analyses 4 weeks after nerve injury.

Group	Nerve area (μm^2)	Myelin area (μm^2)	Ratio nerve/myelin area (%)	Capillaries/mm ²
CG	506260.29	301583.14	60.28	86.03
EG	528856.68	298976.71	57.55	85.69
IG	547529.84	208071.30	32.37	74.45
LG	530146.08	215996.44	40.81	78.83
PG	622473.35	247001.80	43.72	77.80
LPG	649142.59	217904.45	36.64	98.16

TABLE 3: Quantitative analyses 8 weeks after nerve injury.

Group	Nerve area (μm^2)	Myelin area (μm^2)	Ratio nerve/myelin area (%)	Capillaries/mm ²
CG	542780.48	258291.17	47.85	99.22
EG	601586.20	230101.07	40.60	87.60
IG	532432.67	136047.71	26.14	99.12
LG	474405.86	163314.33	35.89	116.59
PG	459164.22	186626.33	43.04	135.35
LPG	523248.26	225172.00	43.19	140.84

the lack of satisfactory results with surgical methods have increased the interest of researchers within interdisciplinary approaches [26]. Their studies have furthered the understanding of peripheral nerve recovery and similar problems in other regions of the nervous system [27].

The myelinated sciatic nerve had fibers of various diameters [28], and the exposure of the sciatic nerve (EG) did

not lead to changes at both 4 and 8 weeks after the nerve injury. The treatments resulted in the improvement of the sciatic nerve, especially in the eighth week after injury. A decrease in the amount of myelin due to nerve crush [29] was observed in our study. Different crushing loads applied on the nerve (0.1 kg to 15 kg) resulted in Wallerian degeneration, and the severity of this degeneration is directly proportional

to the applied load. Wallerian degeneration appears as large vacuoles, and during this process, endoneurial macrophages phagocytose and degenerate myelin [28]. An injury that leads to demyelination and failure to remyelinate consequently leads to axonal degeneration [29]. In the injured groups, Wallerian degeneration was also observed, with a loss of integrity of the internal constituents of nerves and a loss of myelin. The decrease in the densities of myelin and nerve fibers can be explained by the lack of remyelination, which generates axonal degeneration. The load of 15 kg was chosen due to its high capacity to damage of nerve fibers without disrupting the nerve layer envelopes, which causes an axonotmesis that rarely regenerates spontaneously up to 8 weeks after the nerve injury.

Axonal regeneration after nerve crush is slow; however, it is most successful when compared to axonal disconnection (neurotmesis) [30]. Even after 8 weeks, the spontaneous axonal recovery will not have the normal characteristics of fibers. This recovery occurs in approximately 24 weeks, and in many cases, it does not result in prelesion characteristics [31]. In this study, there was an improvement in the morphological and ultrastructural characteristics, even in animals that were not subjected to treatment (IG); however, this spontaneous recovery of the fibers until the 8th postoperative week did not restore preinjury features because the control group had a very distinct morphology from the IG.

The histological quantification assessed the total area of myelin in relation to the cross-sectional area of the sciatic nerve by quantifying pixels in digital images that were processed and transformed into a binary display (black and white). Density analysis using the quantification of myelin in pixels is unusual in studies of peripheral nerves; however, this type of analysis provided data about the recovery of this type of injury in a rapid, reproducible, and intelligible manner regarding the amount of myelin present in the nerve, which is dependent on the quality and speed of the pulse [29, 33, 34] and may become an interesting tool for this type of analysis. The density of blood capillaries is important because it relates to nutrition delivery and maintenance of tissue, particularly for repair after injury, and is crucial for the arrival of factors and nutrients that aid the recovery of this tissue [18].

Quantification revealed a histological improvement in sciatic nerve recovery after crush injury by employing treatments with LLLT and protein P1. After 4 weeks, the treated groups had improvement; however, it was not possible to choose the best treatment. After 8 weeks of injury, significant improvements were observed in the groups using the P1 protein (PG and LPG) and the results were close to the values of the control group. The morphometrics data also revealed that spontaneous regeneration was not achieved, as noted in the IG at 4 and 8 weeks after nerve damage, confirming the findings of Muratori et al. [32], who reported that after a period of 6 weeks, there was no spontaneous recovery and that the action of the treatments on the injured nerve was critical for obtaining the observed improvement.

The improvement in the morphological and morphometric characteristics following the use of LLLT after nerve crush was marked by a greater number of nerve fibers, myelinated fibers of larger diameter, and a higher amount

of Schwann cells [35, 36]. In the present study, there was also an observed decrease in the amount of myelin after crushing (15 kgf), which is comparable with the density of nerve fibers diminished as reported by and Oliveira et al. [28]. Based on these facts, we suggest the use of this therapy as a possible treatment for diseases and injuries that lead to a loss of myelin, for example, multiple sclerosis, which is prevalent in young adults and affects 2.5 million people [29, 37]. The number of capillaries present in injured nerves was not altered by irradiation with LLLT after 10 and 21 days [35]. Our results revealed no changes in the number of capillaries 4 weeks after the application of LLLT. The increased number of capillaries was observed only at 8 weeks after nerve injury. This result suggests that the change in the number of capillaries occurs after the first month of recovery from the application of LLLT.

The present study was the first to assess the ultrastructural and morphological changes that occur in a crushed nerve treated with the P1 protein. Thus, no data about the changes in injured tissue treated with this material were found in previously published studies. Our first observation reveals a very positive perspective on the use of this material for nerve crush injury because there were generally better recovery features obtained from using this protein.

The P1 protein showed great angiogenic potential in previous studies [17–19, 38]. In our study, 8 weeks after nerve injury, the treatments resulted in increased capillary density, with the highest values observed in the group that received the P1 protein (PG and PGL), suggesting that, in long term application, the P1 protein leads to increased vascularity of the region.

5. Conclusion

In conclusion, treatment with LLLT and the P1 protein resulted in the improvement of peripheral nerve trauma recovery 4 and 8 weeks after injury. At 8 weeks after injury, the characteristics of the treated groups were closer resembled to those observed in the control group. In addition to higher capillary density, this suggests that there is a time-dependent characteristic of this type of recovery. In long-term recovery (8 weeks), the animals that received only the P1 protein generally had better recovery of crushed nerve, given the fact that the only application of LLLT with these proposed parameters not achieved the same morphological and morphometric results, and the association of the two treatments did not potentiate the recovery, suggesting that the improvement observed when the 2 treatments were applied mainly refers to protein P1. More studies are needed to improve the understanding of the recovery in other levels of analysis.

Conflict of Interests

The authors certify that there is no conflict of interests with any financial organization regarding the material used and/or discussed in the paper.

Acknowledgment

The authors would like to thank FAPESP for financial support of this study.

References

- [1] G. Lundborg, "Nerve regeneration and repair: a review," *Acta Orthopaedica Scandinavica*, vol. 58, no. 2, pp. 145–169, 1987.
- [2] J. Ijckema-Paassen, K. Jansen, A. Gramsbergen, and M. F. Meek, "Transsection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation," *Biomaterials*, vol. 25, no. 9, pp. 1583–1592, 2004.
- [3] M. F. Meek, A. S. P. Varejão, and S. Geuna, "Use of skeletal muscle tissue in peripheral nerve repair: review of the literature," *Tissue Engineering*, vol. 10, no. 7–8, pp. 1027–1036, 2004.
- [4] C.-C. Shen, Y.-C. Yang, and B.-S. Liu, "Large-area irradiated low-level laser effect in a biodegradable nerve guide conduit on neural regeneration of peripheral nerve injury in rats," *Injury*, vol. 42, no. 8, pp. 803–813, 2011.
- [5] C. A. S. Pachioni, N. Mazzer, C. H. Barbieri et al., "Rats' ischiatic nerve injury caused by smashing: a vascularization study," *Acta Ortopedica Brasileira*, vol. 14, no. 4, pp. 203–207, 2006.
- [6] P. M. De Albornoz, P. J. Delgado, F. Forriol, and N. Maffulli, "Non-surgical therapies for peripheral nerve injury," *British Medical Bulletin*, vol. 100, no. 1, pp. 73–100, 2011.
- [7] S. Rochkind, L. Leider-Trejo, M. Nissan, M. H. Shamir, O. Kharenko, and M. Alon, "Efficacy of 780-nm laser phototherapy on peripheral nerve regeneration after neurotube reconstruction procedure (double-blind randomized study)," *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 25, no. 3, pp. 137–143, 2007.
- [8] S. Rochkind, "Phototherapy in peripheral nerve regeneration: from basic science to clinical study," *Neurosurgical Focus*, vol. 26, no. 2, article E8, 2009.
- [9] S. Rochkind, V. Drory, M. Alon, M. Nissan, and G. E. Ouaknine, "Laser phototherapy (780 nm), a new modality in treatment of long-term incomplete peripheral nerve injury: a randomized double-blind placebo-controlled study," *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 25, no. 5, pp. 436–442, 2007.
- [10] S. Rochkind, S. Geuna, and A. Shainberg, "Chapter 25: phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration," *International Review of Neurobiology*, vol. 87, pp. 445–464, 2009.
- [11] C. C. Medalha, G. C. Di Gangi, C. B. Barbosa et al., "Low-level laser therapy improves repair following complete resection of the sciatic nerve in rats," *Lasers in Medical Science*, vol. 27, no. 3, pp. 629–635, 2012.
- [12] A. Dakowicz, A. Kuryliszyn-Moskal, B. Kosztyla-Hojna, D. Moskal, and R. Latosiewicz, "Comparison of the long-term effectiveness of physiotherapy programs with low-level laser therapy and pulsed magnetic field in patients with carpal tunnel syndrome," *Advances in Medical Sciences*, vol. 56, no. 2, pp. 270–274, 2011.
- [13] K. R. Byrnes, R. W. Waynant, I. K. Ilev et al., "Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 36, no. 3, pp. 171–185, 2005.
- [14] S. O. Yazdani, A. F. Golestaneh, A. Shafiee, M. Hafizi, H.-A. G. Omrani, and M. Soleimani, "Effects of low level laser therapy on proliferation and neurotrophic factor gene expression of human schwann cells in vitro," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 107, no. 1, pp. 9–13, 2012.
- [15] D. Gigo-Benato, T. L. Russo, E. H. Tanaka, L. Assis, T. F. Salvini, and N. A. Parizotto, "Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 42, no. 9, pp. 673–682, 2010.
- [16] F. Mrué, *Replacement of the cervical esophagus by prosthesis biossintética Latex experimental study in dogs [Dissertation (Master's Degree Research)]*, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil, 1996.
- [17] C. A. C. A. Balabanian, J. Coutinho-Netto, T. L. Lamas-Carvalho, S. A. Lacerda, and L. G. Brentegani, "Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats," *Journal of Oral Science*, vol. 48, no. 4, pp. 201–205, 2006.
- [18] R. J. Mendonça, V. B. Maurício, L. De Bortolli Teixeira, J. J. Lachat, and J. Coutinho-Netto, "Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*," *Phytotherapy Research*, vol. 24, no. 5, pp. 764–768, 2010.
- [19] R. B. Sampaio, R. J. Mendonça, A. R. Simioni et al., "Rabbit retinal neovascularization induced by latex angiogenic-derived fraction: an experimental model," *Current Eye Research*, vol. 35, no. 1, pp. 56–62, 2010.
- [20] J. P. M. Issa, H. L. A. Defino, Y. C. L. Pereira et al., "Bone repair investigation using rhBMP-2 and angiogenic protein extracted from latex," *Microscopy Research and Technique*, vol. 75, no. 2, pp. 145–152, 2012.
- [21] M. V. M. Ganga, *Use of a membrane derived from natural latex (Hevea brasiliensis) in regenerating rat sciatic nerve [Dissertation (Master's Degree Research)]*, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil, 2010.
- [22] V. F. Garcez, *Influence of nitric oxide in the post-injury of the sciatic nerve in rats [Dissertation (Master's Degree Research)]*, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil, 2004.
- [23] J. Park, E. Lim, S. Back, H. Na, Y. Park, and K. Sun, "Nerve regeneration following spinal cord injury using matrix metalloproteinase-sensitive, hyaluronic acid-based biomimetic hydrogel scaffold containing brain-derived neurotrophic factor," *Journal of Biomedical Materials Research A*, vol. 93, no. 3, pp. 1091–1099, 2010.
- [24] I. Watanabe and E. Yamada, "The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingiva," *Archivum Histologicum Japonicum*, vol. 46, no. 2, pp. 173–182, 1983.
- [25] T. A. Ferguson and Y. J. Son, "Extrinsic and intrinsic determinants of nerve regeneration," *Journal of Tissue Engineering*, 2011.
- [26] S. Raimondo, M. Fornaro, P. Tos, B. Battiston, M. G. Giacobini-Robecchi, and S. Geuna, "Perspectives in regeneration and tissue engineering of peripheral nerves," *Annals of Anatomy*, vol. 193, no. 4, pp. 334–340, 2011.
- [27] S. Kiryu-Seo and H. Kiyama, "The nuclear events guiding successful nerve regeneration," *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 4, article 53, 2011.
- [28] E. F. Oliveira, N. Mazzer, C. H. Barbieri, and M. Selli, "Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study," *Journal of Reconstructive Microsurgery*, vol. 17, no. 1, pp. 69–75, 2001.
- [29] M. D. Wood, S. W. P. Kemp, C. Weber, G. H. Borschel, and T. Gordon, "Outcome measures of peripheral nerve regeneration," *Annals of Anatomy*, vol. 193, no. 4, pp. 321–333, 2011.
- [30] S. P. J. Fancy, J. R. Chan, S. E. Baranzini, R. J. M. Franklin, and D. H. Rowitch, "Myelin regeneration: a recapitulation of

development?" *Annual Review of Neuroscience*, vol. 34, pp. 21–43, 2011.

- [31] P. Dubový, "Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction," *Annals of Anatomy*, vol. 193, no. 4, pp. 267–275, 2011.
- [32] L. Muratori, G. Ronchi, S. Raimondo, M. G. Giacobini-Robecchi, M. Fornaro, and S. Geuna, "Can regenerated nerve fibers return to normal size? A long-term post-traumatic study of the rat median nerve crush injury model," *Microsurgery*, vol. 32, no. 5, pp. 383–387, 2012.
- [33] W. A. Rushton, "A theory of the effects of fibre size in medullated nerve," *The Journal of Physiology*, vol. 115, no. 1, pp. 101–122, 1951.
- [34] S. Geuna, S. Raimondo, G. Ronchi et al., "Chapter 3: histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration," *International Review of Neurobiology*, vol. 87, pp. 27–46, 2009.
- [35] A. P. Santos, C. A. Suaid, M. Xavier, and F. Yamane, "Functional and morphometric differences between the early and delayed use of phototherapy in crushed median nerves of rats," *Lasers in Medical Science*, vol. 27, no. 2, pp. 479–486, 2012.
- [36] C. N. D. S. Câmara, M. V. H. Brito, E. L. Silveira, D. S. G. Da Silva, V. R. F. Simões, and R. W. F. Pontes, "Histological analysis of low-intensity laser therapy effects in peripheral nerve regeneration in Wistar rats," *Acta Cirurgica Brasileira*, vol. 26, no. 1, pp. 12–18, 2011.
- [37] J. K. Huang, S. P. J. Fancy, C. Zhao, D. H. Rowitch, C. French-Constant, and R. J. M. Franklin, "Myelin regeneration in multiple sclerosis: targeting endogenous stem cells," *Neurotherapeutics*, vol. 8, no. 4, pp. 650–658, 2011.
- [38] L. C. de Andrade, R. Ceneviva, J. Coutinho-Netto, O. D. C. Silva Jr., J. S. dos Santos, and D. H. Sakeda, "Morphological features of utilization intraperitoneal double-sided prostheses in inguinoplasty in dogs," *Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgias*, vol. 36, no. 5, pp. 431–437, 2009.