

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

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 notada 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.

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).

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.

Difícilmente a regeneração axonal no SNC será solucionada sem que primeiro haja uma compreensão dos mecanismos da regeneração bem sucedida dos nervos 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 axonoteme, 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 (neurotmese) 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.,

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

2013²). Outras metodologias não cirúrgicas comumente estudadas incluem a irradiação com laser de baixa intensidade e a aplicação de fatores de crescimento (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;

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.

FANCY et al., 2012). Enquanto ainda não existem terapias que melhorem a 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 neurotme 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 axonotme parcial, o LBI (650 nm, 5 mW) antecipou a melhora funcional e elevou os níveis da proteína 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 neurotmesa (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

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.

da MMP-9, da proteína TNF- α moduladora da inflamação podendo, dessa forma, ajudar na recuperação nervosa após o esmagamento (ALCANTRA et al., 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 14^o 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 calvaria 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 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*

- 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 Microscop (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.; KORİYAMA, 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.