

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

DAVILENE GIGO BENATO

**ANÁLISE DA REGENERAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS EM
LESÕES MODERADAS E GRAVES SOB AÇÃO DO LASER DE BAIXA
INTENSIDADE.**

SÃO CARLOS - SP

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

DAVILENE GIGO BENATO

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

**ANÁLISE DA REGENERAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS EM
LESÕES MODERADAS E GRAVES SOB AÇÃO DO LASER DE BAIXA
INTENSIDADE.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Fisioterapia.

Apoio Financeiro: FAPESP-Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo. Proc. N° 06/52931-4

SÃO CARLOS – SP

2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

G461ar

Gigo-Benato, Davilene.

Análise da regeneração do nervo isquiático de ratos em lesões moderadas e graves sob ação do laser de baixa intensidade / Davilene Gigo Benato. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

61 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Fisioterapia. 2. Laserterapia. 3. Axôtiotmese. 4. Neurotomia. 5. Função neuromuscular. 6. Metaloproteinase (MMP-2). I. Título.

CDD: 615.82 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE TESE DE Davilene Gigo Benato, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 17 DE MARÇO DE 2010.


BANCA EXAMINADORA:



**Nivaldo Antonio Parizotto
(UFSCar)**



**Ana Beatriz de Oliveira
(UFSCar)**



**Hermes Pretel
(UNESP)**



**Rosana Macher Teodori
(UNIMEP)**



**Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa
(UFSCar)**

Dedicatória

*Á Deus por colocar tudo em
minha vida no seu devido tempo e
lugar.*

*Aos meus familiares e amigos por
toda sua colaboração e carinho*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqui citados pela ajuda na realização dessa dissertação (ordem alfabética):

Ademar amigo marceneiro que construiu nosso “corredor” para a realização do *teste funcional*.

Aluna: Érika Harumi Tanaka, pela dedicação, força de vontade, disciplina, por me ajudar sempre nos experimentos mesmo na hora do almoço, feriados e festas. Ressalto aqui minha grande gratidão pela super ajuda. Não foi uma simples ajudante, mas sim, uma colaboradora.

Professoras Ana Beatriz de Oliveira e Anielle Cristhine de Medeiros Takahashi pela ajuda na utilização do software Matlab e por terem montado a rotina para nós, e lógico pelo grande companheirismo.

Carla Tim, sem essa maravilhosa pessoa não sei o que seria da minha tese. Obrigada do fundo do coração por todos os esforços que fez. Feriados importantes foram perdidos para me ajudar. Obrigada parceira.

Colegas de laboratório: Carla, Charles Taciro, Elaine, Jaqueline, Livia, Poliani, Natália, Renan, Vivian Cury. Obrigada por sempre me darem uma forcinha nas horas de dificuldade.

Colegas de laboratório Plasticidade Muscular (vizinhos): Carolina, Cristina, Christiani, Esperanza, Gabriel, João, Marcela, Sabrina, Paula, Teresa e Thiago. Obrigada por toda a ajuda e paciência que sempre tiveram comigo, vocês são realmente muito amigos.

FAPESP por me subsidiar por esses anos e me apoiar na pesquisa com a reserva técnica.

Profa. Heloísa Selistre, por me ceder seu laboratório de fisiologia (UFSCar) e sua estrutura para alguns procedimentos.

Profa. Juanita Anders por me receber tão bem em seu laboratório no *Department of Anatomy, Physiology and Genetics Uniformed Services University of the Health Sciences*. Agradeço todas as discussões e ensinamentos que contribuíram muito para o enriquecimento desse trabalho.

Secretárias da pós-graduação Kelly e Cris, por sempre me darem uma mãozinha nas questões burocráticas da Universidade.

Ms. Livia Ribeiro de Assis pelas análises da zimografia e ajuda no processo de coleta de material para análise dos grupos da axoniotmese.

Fisiot. Marcela, obrigada pela sua disponibilidade para sempre me ajudar, pelo processamento e análises dos músculos e ajuda em geral dentro do laboratório.

Profa. Marisa, por ceder seu laboratório de Fisiologia-UFSCar e seus equipamentos, assim como seu pessoal para me auxiliar.

Profa. Marise do laboratório de Fisiologia-UFSCar, por ter cortado e corado todos os nervos em historesina.

Prof. Milton Benato (Mirtão), pelas ajudas das traduções e versões de inglês.

Prof. Doutor Nivaldo Antonio Parizotto por me acolher em seu laboratório com tanta alegria e me acompanhar nessa trajetória .

Profa Tania de Fátima Salvini por me ceder o espaço do seu laboratório, pelas orientações e análises dos músculos. Principalmente pelo apoio de “mãe”.

A técnica de laboratório Teresa que sempre me ajudou a preparar soluções e dava dicas interessantes.

Doutor Thiago Luiz de Russo por ter me ajudado em todas as etapas de todo esse trabalho. A palavra “obrigada” é pouco por tudo que ele fez nessa tese. Sem ele, com certeza essa tese não teria sido finalizada. Obrigada também por ter sido tão companheiro e dedicado.

Xingia técnica da Profa. Juanita Anders no *Department of Anatomy, Physiology and Genetics Uniformed Services University of the Health Sciences*. Agradeço todos os ensinamentos, e discussões.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIACÕES	
RESUMO	<i>ix</i>
ABSTRACT	<i>x</i>
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Ação da Laserterapia no tecido nervoso	03
1.2. Ação do laser na regeneração do nervo	05
2. OBJETIVO	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Animais	12
3.2. Procedimentos Cirúrgicos	12
3.2.1. <i>Protocolo de lesão por esmagamento</i>	12
3.2.2. <i>Protocolo de lesão término-terminal</i>	13
3.3. A Laserterapia (Aplicação do Laser)	14
3.3.1. <i>Protocolo de Aplicação do Laser Pós- Axoniotmese</i>	14
3.3.2. <i>Protocolo de Aplicação do Laser Pós-Neurorrafia Termino-terminal</i>	15
3.4. Grupos Experimentais	15
3.5. Avaliação Funcional	16
3.6. Avaliação Morfológica e Imunofluorescência	17
3.7. Avaliação Morfométrica das Fibras Nervosas Regeneradas	18
3.8. Avaliação do Músculo	18
3.9. Análise zimográfica	19
3.9.1. <i>Dosagem de proteínas</i>	19
3.9.2. <i>Zimografia</i>	19
3.10. Avaliação Estatística dos Dados	20
4. RESULTADOS	21
4.1 Grupos com esmagamento do nervo	21
4.1.1. <i>Teste Funcional</i>	21
4.1.2. <i>Histologia dos músculos Tibiais Anteriores (TA)</i>	24
4.1.3. <i>Área de Secessão transversa (AST) das fibras musculares</i>	25
4.1.4. <i>Atividade total de matriz metaloproteinases (MMPs) no músculo TA</i>	25

4.1.5.	<i>Análise histológica do Nervo Ciático</i>	26
4.1.6.	<i>Análise Morfométrica do Nervo Ciático</i>	30
4.1.6.1.	<i>Número de Fibras por campo</i>	30
4.1.6.2.	<i>Área de secção transversa (AST) da mielina, axônio e fibras nervosas.</i>	30
4.1.7.	<i>Atividade total de matriz metaloproteinases (MMPs) no nervo ciático</i>	31
4.2.	Grupos neurorrafia Termino-Terminal	33
4.2.1.	<i>Teste Funcional</i>	33
4.2.2.	<i>Histologia dos músculos TA (Tibial Anterior)</i>	34
4.2.3.	<i>Área de secção transversa (AST) das fibras musculares</i>	36
4.2.4.	<i>Atividade total de matriz metaloproteinases (MMPs) no músculo TA</i>	36
4.2.5	<i>Histologia do nervo ciático</i>	37
4.2.5.1.	<i>Análise histológica do Nervo Ciático</i>	37
4.2.6.	<i>Área de secção transversa do nervo ciático</i>	41
4.2.6.1.	<i>Número de fibras nervosas</i>	41
4.2.6.2.	<i>Área de secção transversa (AST) de mielina, axônio e fibra nervosa.</i>	41
5.	DISCUSSÃO	43
6.	CONCLUSÃO	50
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
	<i>ANEXO 1. Atividades Realizadas No Período</i>	58
	<i>ANEXO 2. Artigo Submetido À Publicação-2010</i>	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Procedimento de lesão de esmagamento.	12
Figura 2.	Cirurgia Neurorrafia termino-terminal.	13
Figura 3.	Parâmetros de aplicação do laser.	14
Figura 4.	Análise funcional da marcha do rato.	16
Figura 5.	Resultado do teste funcional CR660nm.	22
Figura 6.	Resultado do teste funcional CR780nm.	22
Figura 7.	Cortes histológicos transversais do ventre dos músculos TA.	24
Figura 8.	Área de Secção Transversa (AST) dos músculos TA.	25
Figura 9.	Atividade total da MMP2 nos grupos CR.	26
Figura 10.	Cortes histológicos dos nervos axoniotmisados.	28
Figura 11.	Cortes histológicos dos nervos axoniotmisados com anti-S100.	29
Figura 12.	Número de fibras nervosas por campo microscópico dos nervos ciáticos nos diferentes grupos experimentais.	30
Figura 13.	Área de secção transversa de mielina, axônio e fibra nervosa em nervo ciático dos diferentes grupos experimentais.	31
Figura 14.	Atividade total da MMP-9 observada nos diferentes grupos experimentais.	32
Figura 15.	Atividade total da MMP-2 observada nos diferentes grupos experimentais.	33
Figura 16.	Índice funcional do nervo ciático nos diferentes grupos experimentais.	34
Figura 17.	Cortes histológicos transversais do ventre dos músculos TA.	35
Figura 18.	Área de Secção Transversa (AST) dos músculos TA dos diferentes grupos experimentais.	36
Figura 19.	Atividade total da MMP-2 observada nos diferentes grupos experimentais.	37
Figura 20.	Cortes histológicos dos nervos ciáticos, impregnados com tetróxido de ósmio.	39
Figura 21.	Cortes histológicos transversais dos nervos axoniotmisados marcados com anti-S100	40
Figura 22.	Número de fibras nervosas por campo microscópico dos nervos ciáticos nos diferentes grupos experimentais.	41
Figura 23.	Área de secção transversa da bainha de mielina, axônio e fibra nervosa em nervo ciático dos diferentes grupos experimentais.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1

10

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChRs	Receptores de acetilcolina .
AST:	Área de Secção Transversa.
BCA:	Ácido bicinconínico.
CR:	<i>Crush</i> = esmagamento.
GaAlAs:	Arseneto de Gálio e Alumínio.
IFC:	Índice Funcional do Ciático.
J:	Joule.
J/cm²:	Joule Por Centímetro Quadrado.
JNM:	Junção Neuro Muscular.
MEC:	Matriz Extracelular.
M.:	Músculo.
MMPs:	Metaloproteinases de Matriz.
mW:	Mili Watts.
Nm:	Nanômetros.
N:	Normal.
PO:	pós-operatório.
TA:	Tibial Anterior.
TGF- β1:	Fator de Crescimento Transformador Beta 1.
TIMP:	Inibidores Teciduais das Metaloproteinases.
TNF α:	Fator de Necrose Tumoral Alfa..
TT:	Neurorrafia Termino-Terminal.

RESUMO

O objetivo do estudo foi analisar a ação dos lasers de baixa intensidade (GaAlAs) com diferentes comprimentos de ondas (660 e 780 nm), em diferentes densidades de energia (10 J/cm², 60 J/cm² e 120 J/cm²) na regeneração do nervo ciático do rato após lesões moderadas (axoniotmese) e graves (neurotmese). Para tal, 128 ratos Wistar (275 g) foram divididos em 16 grupos: Para axoniotmese: Normal (N); axoniotmese (CR); axoniotmese irradiado com laser 660 nm com 10 J/cm² (CR660 10J); CR660 60J; CR660 120J; CR780 10J; CR780 60J; CR780 120J. Para neurotmese: N; neurotmese (TT); TT660 10J; TT660 60J; TT660 120J; TT780 10J; TT780 60J; TT780 120J. A estimulação a laser foi realizada com potência fixa de 40 mW e área do feixe de 4,0 mm². O laser foi aplicado durante 10 dias consecutivos, a partir do primeiro dia do pós-operatório nos nervos com axoniotmese e neurotmese. Entretanto, para os grupos neurotmese foi acrescido de mais um mês de aplicação em dias alternados. Os músculos tibiais anteriores (TA) e os nervos ciáticos foram avaliados após 28 (axoniotmese) e 84 dias (neurotmese) após a cirurgia. Para investigar a área de secção transversa (AST) das fibras musculares, axônios, mielina e fibra nervosa; número de fibras nervosas foi feita morfometria. A atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 foi realizada para observar o remodelamento da matriz. O índice funcional do nervo ciático foi para avaliar a função. A imunofluorescência com anticorpo S-100 foi utilizada para a observar a bainha de mielina e células de Schwann. Os dados foram submetidos a testes de homogeneidade e normalidade. Os testes Anova one-way seguido por Tukey e Kruskal-Wallis seguido por Newman-Keuls foram usados em amostras paramétricas e não paramétricas, respectivamente. Um nível de significância de 5% foi adotado. Os resultados deste estudo mostram que os grupos axoniotmese irradiados com lasers 660 nm 10 e 60 J/cm², 780 nm 10 e 120 J/cm² apresentaram AST da fibra nervosa e da mielina semelhante aos valores normais. O laser 660 nm, independente da densidade de energia utilizada, acelerou a recuperação da atrofia muscular e aumentou a atividade da MMP-2 nos nervos ciáticos dos grupos axoniotmese. Ele também reduziu a atividade da MMP-9 nos nervos e da MMP-2 nos músculos. Todos os animais submetidos à axoniotmese recuperaram a função normal após 28 dias de lesão. Em relação aos grupos neurotmese, foram observados valores superiores de AST da bainha de mielina e de fibra nervosa no grupo TT660 120J comparado ao TT. Valores de AST das fibras musculares foram superiores ao TT nos grupos TT660 60 e 120J e TT780 10J. Estes parâmetros de laser também foram eficientes em promover a diminuição da atividade de MMP-2 nos músculos TA. Todos os grupos submetidos à neurotmese não recuperaram totalmente a função após 84 dias de lesão. Com base no objetivo proposto podemos concluir

que a laserterapia, em determinados protocolos de aplicação, mostrou-se efetiva na recuperação do nervo, evitou a atrofia do muscular e atuou no remodelamento da matriz extracelular do músculo e do nervo periférico via regulação das MMPs.

Palavras Chave: Axoniotmese, Neurotmese, regeneração do nervo ciático, Laser terapia de baixa intensidade.

ABSTRACT

Peripheral nerves are frequently target of traumatic injuries and their functional recovery is generally incomplete. The aim of the present study was to evaluate the effects of 660 or 780 nm low-level laser therapy (LLLT) GaAlAs using different energy densities (10, 60 and 120 J/cm²) on nerve sciatic recovery after severe (neurotmesis) or moderate (axonotmesis) injuries in rat. One hundred and twenty eight Wistar male rats (275g) were divided into 16 groups, and they were performed as follow: For axonotmesis: Normal (N); axonotmesis (CR); axonotmesis and 660 nm LLLT with 10 J/cm² irradiation (CR660 10J); CR660 60J; CR660 120J; CR780 10J; CR780 60J; CR780 120J. For neurotmesis: N; neurotmesis (TT); TT660 10J; TT660 60J; TT660 120J; TT780 10J; TT780 60J; TT780 120J. The LLLT irradiation was performed using a fix potence of 40 mW and a spot area of 4 mm². Nerves submitted to axonotmesis or neurotmesis were irradiated with LLLT daily during 10 consecutive days starting on the first post-operative. However, neurotmesis groups received additionally one month of LLLT applied every other day. Tibialis anterior (TA) muscles and sciatic nerve were evaluated 28 (axonotmesis) and 84 (neurotmesis) after surgery. The follow analyses were performed: muscle fiber, axon, myelin and nerve fiber cross-sectional area (CSA); matrix metalloproteinases (MMP) 2 and 9 activities; sciatic functional index; S-100 immunofluorescence. Data were submitted to homogeneity and normality tests. Anova one-way followed by Tukey tests and Kruskal-Wallis followed by Newman-Keuls tests were performed when data was parametric or non-parametric, respectively. Significance level was set at 5%. The results of the present study showed that groups irradiated with 660 nm LLLT with 10 or 60 J/cm², and 780 nm 10 or 120 J/cm² showed normal values of nerve fiber and myelin CSA. The 660 nm LLLT, regardless the energy density used, accelerated muscle fiber recovery and increased the MMP-2 activity in nerve. Furthermore, it also decreased the MMP-9 and MMP-2 activities in nerves and muscles respectively. All axotomized animals recovery normal levels of function on the 28 day after surgery. Regarding neurotmesis groups, TT660 120J presented higher values of myelin and nerve fiber CSA compared to TT. Superior values of muscle fiber CSA were observed in TT660 60 e 120J e TT780 10J compared to TT. These LLLT parameters were also efficient to decrease MMP-2 activity in TA muscles. All groups submitted to neurotmesis did not recover normal function after 84 days of injury. Based on the proposed objective, it is possible to conclude that LLLT, considering specific protocols

of application, recovered nerves effectively, avoided muscle fiber atrophy and acted on the muscle and nerve extracellular matrix remodeling via MMPs regulation.

1. INTRODUÇÃO

As lesões nervosas periféricas são ocorrências clínicas comuns que afetam principalmente os nervos que percorrem os membros periféricos (EVANS et al., 2005) causando muita incapacidade (GIGO BENATO et al., 2005). Segundo um estudo realizado nos EUA, 50 mil sujeitos sofrem lesões traumáticas nos nervos a cada ano (MILESI et al., 2000 ; EVANS et al., 2001). Num estudo brasileiro, de 456 casos analisados, 45% das lesões nervosas periféricas eram do tipo axoniotmese, 41% neurotmese e 14 % neuropraxia. (KOUYOUMDJIAN et al., 2006).

A gravidade do dano nervoso pode variar muito em relação às dimensões do evento traumático (LUNDBORG, 2000). O tempo de recuperação varia de acordo com a extensão da lesão, tanto na axoniotmese quanto na neurotmese (LUNDBORG, 2000). Em lesões graves em que há a ruptura total no nervo, como na neurotmese, é necessária a intervenção cirúrgica (SEDDON et al., 1943 ; SUNDERLAND 1978; LUNDBORG, 2000). Na lesão do tipo axoniotmese, mesmo com a preservação dos tubos endoneurais, se a compressão for muito extensa, as fibras axonais demoram um tempo considerável para crescer (SEDDON et al., 1943 ; SUNDERLAND 1978), e quanto mais tardio o restabelecimento das conexões neuromusculares, mais atrofia muscular se desenvolve. Com isso, prolonga-se o tempo para restabelecer a função neuromuscular (RCHKIND, GEUNA & SAINBERG, 2009,b). Contudo, além do tipo da lesão (axoniotmese ou neurotmese), é importante considerar também sua extensão e o tipo de intervenção cirúrgica. Essas três características interferem no prognóstico de recuperação pós-lesão nervosa periférica (GIGO-BENATO et al., 2005).

Além das alterações ocorridas no nervo, outro tecido que é bastante afetado após uma lesão nervosa periférica é o músculo esquelético. A inervação é um fator crítico para a integridade funcional e estrutural do músculo (ISHIDO, KAMI & MITSUHIKO, 2004; KOSTROMINOVA, 2005). A lesão do nervo causa uma profunda perda de massa e capacidade de geração de força do músculo (BILLINGTON & CARLSON, 1996; DOW, 2004). As lesões nervosas periféricas podem causar muitas modificações na estrutura, metabolismo e expressão gênica do músculo esquelético. Uma mudança importante que ocorre quando músculos tornam-se desnervados é o aumento de receptores de acetilcolina (AChR) no sarcolema. Os receptores de acetilcolina são normalmente expressos na junção neuromuscular em músculos inervados. Entretanto, a

desnervação causa aumento e proliferação de AChRs extrajuncionais. Alguns autores vêem isso como um tipo de “sinal” que causa brotamentos de novos axônios dos nervos e também como uma forma de preparação para a formação de uma nova junção neuromuscular (LIEBER, 2002).

O músculo quando é desnervado, ocorre um remodelamento da matriz extracelular (Demestre et al, 2005) e as metaloproteinases de matriz (MMPs) tem um papel importante nas modificações dessa matriz extracelular (SCHOSER & BLOTTNER, 1999; AHTIKOSKI et al., 2004; DEMESTRE et al., 2005). As MMPs são uma família de enzimas proteolíticas zinco-dependentes que podem ser sintetizadas e secretadas por células presentes no músculo esquelético, como as células de Schwann, axônios, células satélites e fibroblastos (CARMELI 2004). As funções das MMPs no músculo desnervado ainda não são bem esclarecidas e apenas alguns estudos investigaram seu papel nas doenças neuromusculares (KHERIF et al., 1998; SCHOSER & BLOTTNER, 1999; KOSKINEN et al., 2000; SCHOSER, BLOTTNER & STUERENBURG, 2002; AHTIKOSKI et al, 2004; DEMESTRE et al., 2005). Em músculos normais de camundongo, a MMP-2 e a 9 foram localizadas na junção neuromuscular (JNM), em células de Schwann e no perineuro de nervos intramusculares (KHERIF et al., 1998). Entretanto, depois da lesão por esmagamento, as MMPs permanecem presentes na JNM (KHERIF et al., 1998, DEMESTRE et al., 2005) mas também podem ser encontradas ao redor de fibras musculares, capilares, na matriz extracelular ou em células mononucleadas (DEMESTRE et al., 2005).

Dentre as metaloproteinases de matriz a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B) são enzimas chaves no processo de remodelamento da matriz extracelular no músculo esquelético durante mudanças de demanda de atividade e respostas frente a lesões (CARMELI et al., 2004). Ambas são conhecidas por degradar a forma não fibrilar de colágeno tipo IV, desnaturar colágenos intersticiais, assim como a matriz extracelular (AHTIKOSKI et al., 2004).

O remodelamento da matriz extracelular no nervo também é importante para compreender o processo de reestruturação do nervo pós-lesão. Apesar das MMPs serem muito estudadas, ainda não está claro e definido quais são os papéis que cada uma desempenha no sistema nervoso (C.I. PLATT et al., 2003). Estudos sugerem que a MMP-2 e MMP-9 estão envolvidas na facilitação do crescimento axonal ao longo da matriz do nervo após axoniotmese (C.I. PLATT et al., 2003; HEINE et al. ,2004.).

Autores questionam que a MMP-2 possa degradar colágeno, principalmente o tipo IV, que é rico no segmento distal do nervo pós-esmagamento. Eles acreditam que essa degradação do

colágeno possa criar canais pelos quais os brotos axonais possam crescer. O aumento da atividade da MMP2 está intimamente relacionado ao aumento do fator de necrose tumoral (TNF α) que é secretado pela célula de Schwann, após uma lesão do nervo (SHUBAYEV & MYERS, 2000; SIEBERT et al., 2001). Já a alta atividade da MMP-9 é mais encontrada no segundo e terceiro dia pós-lesão, quando ocorre infiltração de macrófagos no nervo lesado. Estes macrófagos (juntamente com as células de Schwann) são responsáveis pela eliminação de mielina e outros detritos na região nervosa distal à lesão. O aumento no início da MMP-9 pode ajudar a quebrar a barreira sangue- nervo e, assim, facilitar a infiltração de macrófagos do sangue para o tecido nervoso. (LA FLEUR ET AL., 1996, C.I. PLATT ET AL., 2003). A barreira sangue nervo impede seletivamente a passagem de substâncias para o espaço extracelular que envolve as fibras nervosas no endoneuro, limitando a penetração de macromoléculas e controlando a passagem de íons para o espaço endoneural, protegendo as fibras nervosas de vários agentes nocivos (CAVANAGH, 1990). Outra possível hipótese é que os macrófagos residentes possam ser ativados após esmagamento do nervo, contribuindo para estimular a atividade MMP-9 (C.I. Platt et al., 2003).

A regeneração nervosa periférica já é um fato fundamentado e, por esta razão, pesquisas são realizadas no intuito de detalhar os fatores, mecanismos, terapêuticos e técnicas designadas à restauração nervosa (CRISCI & FERREIRA, 2002). Todavia, a recuperação funcional é muito relativa entre um paciente e outro sendo raramente completa (AZZE & MATTAR, 2000) e nem sempre satisfatória (SUNDERLAND, 1978; LUNDBORG, 2000). Portanto, se dá muita importância ao tratamento de recuperação no pós-operatório, com a finalidade de garantir a todos os pacientes a suficiente restauração da função neuromuscular.

Partindo dessa necessidade de restabelecer a função neuromuscular, o processo de reabilitação conta com várias terapias físicas, tais como, laser de baixa intensidade, ultrassom, estimulação elétrica, entre outros, na tentativa de influenciar positivamente a melhora da função (GIGO-BENATO et al., 2005).

1.1. Ação da Laserterapia no tecido nervoso

A laserterapia na regeneração do nervo recebeu uma crescente atenção por volta de 20 anos atrás (ROCHKIND & OUAKNINE, 1992; ANDERS et al., 2004). Porém, a ação do laser no

sistema nervoso ainda não está bem definida, mas durante a última década grandes avanços ocorreram para a compreensão dos efeitos celulares e moleculares da aplicação do laser nos tecidos biológicos (TURNER & HODE, 2003).

Com base nos resultados obtidos até hoje, principalmente estudos *in vitro*, várias teorias foram desenvolvidas para explicar as alterações que a laserterapia exerce, como por exemplo, mudanças nas estruturas biológicas, tais como o aumento de síntese de ATP ou (GAGLIARDI, ATLANTE & PASSARELLA, 1997; AMAT et al., 2005) a proliferação celular (KREISLER et al., 2003)

Estudos *in vitro* mostraram que a laserterapia induz o crescimento massivo de neuritos em neurônios em cultura. (WU et al., 19870; 2009 ;WOLLMAN, ROCHKIND & SIMANTOV, 1996). A laserterapia parece acelerar o crescimento precoce das células nervosas. As células irradiadas com o laser já crescem 24 horas após seu cultivo. Na primeira semana essas células irradiadas podem conter alto número de neurônios, com um citoplasma grande, fibras neuronais ramificadas, interligadas e formando redes. Esse padrão de crescimento das células cultivadas e irradiadas mostra-se acelerado ao se comparar com o normal. O desenvolvimento padrão é que esses neurônios crescem e se tornam grandes somente após várias semanas em cultura. (ROCHKIND et al., 2009 a).

Outro possível mecanismo de ação do laser no tecido nervoso é a ação neuroprotetora, que facilita o processo de regeneração das fibras nervosas. A aplicação da laserterapia após lesão do nervo inibe a atividade do óxido nítrico (um agente neurotóxico) e aumenta a expressão do fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (LEUNG et al., 2003). Uma fascinante hipótese é que a laserterapia possa guiar os cones de crescimento neuronal *in vitro*, talvez devido à sua interação com a proteína citoplasmática, e particularmente, a um aumento da proliferação em direção a margem do axônio (EHRLICHER et al., 2002). Além disso, há demonstração experimental que a irradiação a laser seja capaz de estimular a proliferação das células de Schwann de ratas *in vivo* apontando para outro mecanismo de efeito direto no crescimento do axônio. Essa evidência comprova que a laserterapia exerce um efeito de regeneração nervosa periférica (VAN BREUGEL & BAR, 1993). Considerando a presença de um número adequado de células de Schwann como sendo um fator importante no sucesso da regeneração nervosa, a laserterapia desempenha uma ação gliotrófica que representa uma forte indicação a favor de seu uso no pós-traumático ou pós-cirúrgico na reparação nervosa periférica (GEUNA et al., 2003).

Além do laser terapêutico exercer ação direta nos componentes neurais, ele auxilia na função dos músculos desnervados que podem ser restaurados parcialmente num grau muito considerável, se o tratamento for iniciado logo após a lesão do nervo (ROCHKIND et al., 2009 a, b,c,d).

1.2. Ação do laser na regeneração do nervo

Por mais que existam vários estudos *in vitro* que investiguem a real efetividade da laserterapia na regeneração do nervo ainda existem muitas controvérsias (GIGO-BENATO, GEUNA & ROCHKIND, 2005; ANDERS, GEUNA & ROCHKIND, 2004) sobre a escolha do melhor protocolo de tratamento (tipo de comprimento de onda e densidade de energia) para cada tipo de lesão nervosa periférica. A laserterapia tem demonstrado ser efetiva na aceleração da recuperação da função neuromuscular. Numa recente revisão crítica da literatura (GIGO-BENATO, GEUNA & ROCHKIND, 2005; ANDERS, GEUNA & ROCHKIND, 2004), mostrou-se que mais de 80 % dos estudos experimentais, conduzidos até hoje sobre o uso da laserterapia na promoção da regeneração nervosa periférica, levam a uma positiva recuperação nervosa após axoniotmese e após cirurgia reparadora. As características de cada artigo estão apresentadas em uma tabela atualizada com os estudos relacionados ao tema (Tabela 1).

Os estudos publicados na década de 80 se basearam no uso do modelo de axoniotmese (ROCHKIND et al., 1988; ROCHKIND & OUAKNINE, 1992). Esses estudos concluíram que a laserterapia foi efetiva na recuperação nervosa. Os efeitos desta laserterapia foram medidos em um curto espaço de tempo, ou seja, dentro de dias e minutos assim como em longo prazo por vários dias e meses (ROCHKIND et al., 1986; ROCHKIND et al., 1987 a,b; ROCHKIND & OUAKNINE, 1992). No modelo experimental em curto prazo, foi aplicado o laser diretamente no nervo ainda exposto (ROCHKIND, BARR-NEA & VOLGER, 1990; ROCHKIND & OUAKNINE, 1992). Os comprimentos de onda 540 nm, 632 nm e 780 nm foram os que produziram os melhores efeitos. Já no modelo a longo prazo, o nervo ciático foi estimulado diretamente. Os autores encontraram, segundo a atividade eletrofisiológica, uma redução da atividade após a lesão de esmagamento nos nervos não irradiados, mas o uso da laserterapia (comprimento de onda de 632.8 nm, densidade de energia de 10 J/cm²) melhorou o potencial de ação após a lesão por esmagamento no período a longo prazo (ROCHKIND et al., 1987a,b; ROCHKIND & OUAKNINE, 1992). A aplicação da laserterapia após lesão por esmagamento aumentou o crescimento axonal, acelerando a recuperação do nervo ciático (ROCHKIND et al., 1987a ; ROCHKIND et al., 1987b; ROCHKIND & OUAKNINE, 1992).

Existem trabalhos que mostram que se o laser for aplicado tanto no segmento da medula espinhal correspondente ao nervo, quando no nervo lesado, o tempo e a qualidade da recuperação nervosa são melhores do que aqueles grupos que só receberam irradiação no nervo (ROCHKIND et al., 2001; SHAMIR et al., 2001; LEUNG et al., 2002; LUCAS et al., 2002, WU et al., 2009). Estudos demonstram a aplicação de laser na medula e no nervo é eficiente para a indução de proliferação de astrócitos e oligodendrócitos, com isso, levando a uma diminuição das mudanças degenerativas no nervo. Isto sugere um aumento do metabolismo nos neurônios, quando submetidos à influência do tratamento a laser e melhora a habilidade de produção de mielina (ROCHKIND, BARR-NEA & VOLGER, 1990). A laserterapia aplicada na medula também tem sido estudada e mostrou uma grande perspectiva nas lesões medulares. Um estudo verificou que a aplicação transcutânea de laser 810 nm durante 14 dias consecutivos ($1,589 \text{ J/cm}^2$ ao dia) sobre a medula espinhal levou a um maior número de axônios e melhora da função neuromuscular em animais com lesão medular, em comparação ao grupo que não recebeu o tratamento (WU et al., 2009).

Estudos experimentais usaram a laserterapia após lesão de esmagamento, demonstraram que a laserterapia promove a regeneração nervosa (KHULLAR et al., 1995; SHIN et al., 2003), nervo fibular (HAMILTON, KEVEN & RAY, 1992), e facial (ANDERS et al., 1993). Khullar (1995) e seus autores, aplicaram transcutaneamente o laser 820nm (48 J/cm^2), por 28 dias, iniciado a partir do primeiro dia do pós-operatório, mostraram que, ocorreu uma aceleração na recuperação ,nos animais tratados em comparação aos não tratados. Um resultado similar foi obtido num estudo o qual utilizou o laser de comprimento de onda de 630 nm (emissão de irradiação contínua) com aplicação transcutânea a partir do primeiro dia do pós-operatório, num período de somente cinco dias, em lesão por axoniotmese no nervo ciático (SHIN et al., 2003). Esses resultados sugerem que a laserterapia é mais efetiva quando aplicada logo após o período pós-traumático. Um estudo conduzido por Hamilton, Keven e Ray (1992) os quais irradiaram (laser 632.8 nm, $3,52 \text{ J/cm}^2$, aplicação transcutânea) o nervo fibular esmagado de coelho já a partir do primeiro dia pós-lesão, durante 15 dias, demonstrou uma melhora significativa na recuperação do potencial de ação em comparação com o grupo não tratado.

Anders e colaboradores (1993) realizaram um o estudo mais completo comparando diferentes comprimentos de onda de laser (361 nm, 470 nm, 514 nm, 632.8 nm, 1061 nm) sobre a regeneração do nervo facial. Os resultados desse estudo confirmaram todos os estudos anteriores

que demonstraram que a fototerapia aplicada transcutaneamente, diariamente, a partir do primeiro dia do pós-operatório, leva a um significativo aumento da velocidade de regeneração dos axônios nos nervos faciais em comparação aos animais não tratados. (ANDERS et al., 1993; ANDERS, GEUNA & ROCHKIND, 2004). Neste estudo, todos os comprimentos de onda foram efetivos na estimulação da regeneração após lesão nervosa, mas o melhor resultado foi obtido pelo laser de comprimento de onda de 632,8 nm.

Um estudo (BAGIS et al., 2003) não encontrou nenhum efeito da laserterapia na recuperação nervosa periférica. Os nervos ciáticos dos ratos receberam esmagamento bilateral, um dos lados foi estimulado com laser de comprimento de onda de 904 nm, com diferentes densidades de energia (0,31 J/cm² e 19 J/cm²), e o outro nervo serviu como controle da lesão. A eletrofisiologia e a morfologia destes nervos não mostraram diferenças significantes entre lesão e lesão mais irradiação. Entretanto, é difícil dizer que o resultado desse estudo seja fortemente confiável, pois é difícil considerar resultados negativos usando o lado contra lateral “não tratado” como controle. Principalmente se considerarmos que a laserterapia pode exercer efeitos sistêmicos, além da ação da regeneração nervosa, (ROCHKIND et al., 1989), contudo o uso do lado contralateral é inapropriado nesse contexto.

Seis estudos experimentais contribuíram com novas e importantes informações no que diz respeito aos resultados obtidos sobre modelo de lesão de neurotme e tratamento com o laser.

No primeiro estudo a laserterapia no pós-operatório demonstrou ser efetiva na promoção da regeneração nervosa periférica, no caso de transecção completa e reparação término-terminal (SHAMIR et al., 2001). Esse estudo aplicou transcutaneamente o laser, com comprimento de onda de 780 nm, por 30 minutos, durante 21 dias consecutivos na região da cirurgia do nervo ciático, assim como na medula espinhal. A resposta somatossensorial positiva foi encontrada em 69% dos ratos irradiados em comparação com os 18 % dos ratos não irradiados. A avaliação com imunoistoquímica do grupo tratado com laser mostrou maior intensidade de crescimento axonal e melhor qualidade de regeneração, com um aumento do número de fibras nervosas de médio e grande diâmetro. Esta descoberta sugere que a laserterapia aumenta o processo regenerativo após a lesão completa e sutura término-lateral no nervo.

O segundo estudo utilizou a técnica término-terminal em coelhos da Nova Zelândia. Uma boa regeneração foi observada nos grupos tratados com laser, representada pelo maior calibre dos axônios dos nervos e uma espessa camada de bainha de mielina em comparação ao grupo não

tratado. Esse estudo utilizou comprimento de onda 901 nm com laser diodo (10 diodos, potência média de 2 mW de repetição de pulso) GaAlAs, irradiação foi feita a partir do primeiro dia do pós-operatório, por dez dias consecutivos (MOHAMMED, AL-MUSTAWFI & KAKA, 2007). Alguns pesquisadores acreditam que o laser possa auxiliar no processo cicatricial já no momento da cirurgia, ajudando unir os dois cotos e melhorando o prognóstico da função (MOHAMMED, AL-MUSTAWFI & KAKA, 2007; JOHNSON et al., 2007; O'NEILL et al., 2009).

O terceiro investigou os efeitos da laserterapia no pós-operatório do nervo alveolar inferior reparados com tubulização (tubo Gore-tex) em coelhos. O resultado demonstrou que a laserterapia promoveu a regeneração nervosa, ao longo do enxerto sintético, o qual serviu como uma ponte para a junção dos dois cotos. No local onde o nervo alveolar inferior foi reparado, foi aplicado o laser de 820-830 nm transcutaneamente com 29 J/cm², em um ponto, por quatro dias consecutivos, iniciado a partir do primeiro dia do pós-operatório, seguido de seis sessões adicionais, uma vez por semana por seis semanas. A investigação morfológica sobre a regeneração nervosa demonstrou que ocorreu uma melhora no diâmetro das fibras nervosas em comparação com o não tratado (MILORO et al., 2002).

No quarto estudo, ainda relacionado com tubulização [(tubo=ácido poliglicólico), (PGA Neurotube)], foi retirado um segmento do nervo ciático do rato (0,5 cm) e foi colocado o enxerto. O laser 780 nm (200 mW) foi aplicado 14 dias consecutivo, tanto na lesão distal, no tubo e proximal do nervo ciático, quanto na região correspondente ao nervo na medula espinhal (L3-L6). A eletrofisiologia após três meses de lesão mostrou que 70% dos animais irradiados tiveram resposta positiva. O teste funcional confirmou os resultados dos grupos irradiados com o laser que melhoraram sua função comparada com os não irradiados. Os animais tratados com laser mostram maior crescimento axonal em comparação com os não irradiados (ROCHKIND et al, 2009a;b;c;d).

O quinto estudo (GEUNA et al., 2003; GIGO-BENATO et al., 2004) foi sobre o efeito positivo da laserterapia na regeneração do nervo mediano de rato reparado com a neurorafia término-lateral no nervo ulnar intacto como doador. Após os ratos serem operados eles receberam a laserterapia por três semanas, três dias alternados, iniciadas a partir do primeiro dia do pós-operatório e foram comparados com o grupo operado com aplicação simulada (sham). Os lasers (808 nm e 905 nm) foram utilizados transcutaneamente, pontual no local da cirurgia, com densidade de energia 29 J/cm² e 40 J/cm² respectivamente. O resultado do estudo duplo cego

randomizado mostrou que a laserterapia induziu a uma significativa e rápida mielinização, regeneração das fibras nervosas e recuperação da massa muscular, resultando num significativo rápido aumento da função em comparação com o grupo controle.

No sexto estudo, Chen (2005) relatou a ocorrência de um efeito inibidor sobre a emissão do laser pulsado no comprimento de onda de 904 nm (densidade de energia aplicada: 2,33 a 15,5 J/cm²) no nervo ciático do rato. Esse efeito inibidor pode ser devido à utilização de um tubo de silicone de 10 milímetro de comprimento entre os cotos distais e proximais para a união dos cotos. O resultado negativo é de difícil interpretação, visto que foi obtido de um modelo experimental diferente dos outros em vários aspectos como o: 1) Uso de um tubo guia de silicone (o qual poderia interferir com a luz nesse comprimento de onda); 2) Uso de irradiação pulsada em alta frequência (5-20 KHz); 3) Iniciaram a laserterapia após a primeira semana da cirurgia; 4) Estimulação prolongada (por 2 meses); 5) e tamanho de enxerto muito grande. Portanto, neste resultado o protocolo de estimulação a laser não só foi ineficaz quanto impediu a recuperação nervosa, com isso, revelou impróprio o seu uso.

Como foi possível notar pela revisão da literatura, existem resultados conflitantes sobre o uso da laserterapia. Tais resultados podem ser resultantes de inúmeras variáveis técnicas (em particular o comprimento de onda, doses e tipos de irradiação) os quais se não forem adequadamente ajustados poderão reduzir o eventual sucesso do procedimento terapêutico (GIGO-BENATO, GEUNA & ROCHKIND, 2005).

Seguindo essa necessidade de estabelecer protocolos clínicos de aplicação da laserterapia ainda não testados. Este estudo teve a intenção continuar aprofundar a análise dessa irradiação sobre o nervo, focalizando especial atenção na escolha do tipo de comprimento de onda do laser, nos parâmetros de irradiação e também dois tipos de modelos experimentais de lesões nervosas (neurotme e axionotme), os quais são aspectos relevantes nas perspectivas de aplicação em pacientes. Podendo assim, acelerar o prognóstico de recuperação desse indivíduo.

Tabela 1. Principais características dos principais estudos.

Autor (País)	Ano	Tipo de nervo lesão/reparação	Modelo Experimental	Tipo de laser	Comprimento de Onda	Tempo de Emissão	Protocolo de tratamento	Formas de mensuração	Resultados Efeitos
Rochkind et al. (Israel)	1987b	esmagamento	n. ciático do rato	HeNe(contínuo)	632.8 nm	14 min	1º dia pós-op.,por 20 dias consec.(tot. = 20)	Eletrofisiológica morfológica	positivo
Rochkind et al. Israel	1987b	esmagamento	n. ciático do rato	HeNe(contínuo)	632.8 nm	7 min	1º dia pós-op.,por 20 dias consec.(tot. = 20)	Eletrofisiológica morfológica	positivo
Hamilton et al. (USA)	1992	esmagamento	n. fibular do coelho	HeNe	632.8 nm	9 min	1º dia pós-op.,por 15 dias consec.(tot. = 15)	eletrofisiológica	positivo
Anders et al. (USA)	1993	esmagamento	n. facial do rato	HeNe (contínuo)	632.8	90 min	1º dia pós-op.,por 7-9 dias consec.(tot.= 7-9)	morfológica	positivo
Khullar et al. (Noruega)	1995	esmagamento	n. ciático do rato	GaAlAs	820 nm	85 S	1º dia pós-op.,por 28 dias consec.(tot. = 28)	funcional eletrofisiológica morfológica	positivo
Shin et al. (Coreia)	2003	esmagamento	n. ciático do rato	Semicondutor (contínuo)	650 nm	5min	1º dia pós-op.,por 5 dias consec.(tot. = 5)	Funcional morfológica	positivo
Bagis et al. (Turquia)	2003	esmagamento	n. ciático do rato	GaAs (pulsado)	904 nm	15 min	1º dia pós-op.,por 7 dias consec.(tot. = 7)	Eletrofisiológica morfológica	nenhum
Shamir et al. (Israel)	2001	Neurorafia termino-terminal	n. ciático do rato	AsGaAl(contínuo)	780 nm	30 min	1º dia pós-op.,por 20 dias consec.(tot. = 21)	Eletrofisiológica morfológica	positivo
Miloro et al. (USA)	2002	Tubulização com Gore-Tex (8mm)(bilateral)	n. alveolar inferior do coelho	GaAlAs (contínuo)	820-830 nm	90 s	1º dia pós-op., por 4 dias consec, mais 1 dia por semana por 6 semanas (tot. = 10)	morfológica	positivo
Gigo-Benato et al. (Brasil-Itália)	2003	Neurorafia termino-lateral no nervo Ulnar	n. mediano do rato	InGa(Al)As (contínuo) InGaAs (pulsado)	808nm 905 nm	39s	1º dia pós-op., 3 dias por semana por 3 semanas (tot. = 9)	Funcional morfológica	positivo
Che net al.	2005	Tubulização tubo-silicone (10 mm)	n. ciático do rato	As GaAl (pulsado) GaAs (pulsado)	905 nm 904 nm	72 s 2min	Início 2ºsem pós-op por 7 sem dias alternados	Eletrofisiológica morfológica	negativo
Rochkind et al. (Israel)	2007	Tubulização PGA Neurotube (5 mm)	n.ciático do rato	(contínuo)	780 nm	5 min Por ponto (6 pontos) Total 30 min	14 dias consec .(tot. = 14)	funcional eletrofisiológica morfológica	positivo
Mohammed et al. (Iraqe)	2007	Neurorrafia termino-terminal	n. fibular coelhos da Nova Zelandia	GaAlAs diodo	901 nm	10 min	1º dia pós-op.,por 10 dias consec.(tot. = 11)	Morfologia Morfometria	Positivo
Wu et al. (Estados Unidos)	2009	Hemiseccção dorsal Contusão dorsal	Medula T9/10 ratos	diodo	810 nm	2,997 s	15 min após lesão por 14 dias consec.(tot. = 15)	Morfologia Marcação retrógrada Funcional Teste de campo aberto	Positivo

2. OBJETIVO

Analisar a regeneração do nevo isquiático de ratos, em lesões moderadas (axoniotmese) e graves (neurotmese) , sob ação do laser de baixa intensidade, com comprimentos de ondas de 660 nm e 780 nm, com potencia fixa de 40mW, em diferentes densidades de energia de 10 J/cm², 60 J/cm² e 120 J/cm².

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados ratos, albinos, Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos (275 g), num total de 128 animais divididos em 16 grupos. Os animais foram mantidos ao longo de todo o experimento em gaiolas individuais, com comida e água *ad libitum*, e ambiente com temperatura e luminosidade controlada. O experimento foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal UFSCar (Parecer nº 001/06).

3.2. Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram previamente pesados e submetidos à anestesia geral (quetamina 95 mg/kg e xilazina 12 mg/kg). Foi realizada a tricotomia e assepsia na face posterior do membro inferior direito dos animais. Foram posicionados em decúbito ventral. Em seguida, foi feito o afastamento dos músculos glúteo médio e mínimo para produzir uma abertura longitudinal na face posterior da coxa, com aproximadamente dois centímetros de comprimento, para visualização do nervo ciático.

3.2.1. Protocolo de lesão por esmagamento

Para criar uma lesão reproduzível e padronizada, foi utilizada uma pinça que exerceu uma força de 54 N por um período de 30 s, ao longo de 3 mm do comprimento do nervo ciático, 10 mm acima da sua bifurcação (BEER, STEURER & MEYER, 2001; VAREJÃO, 2004). A pinça era introduzida dentro da cavidade e era feita a pressão sem tracionar o nervo.

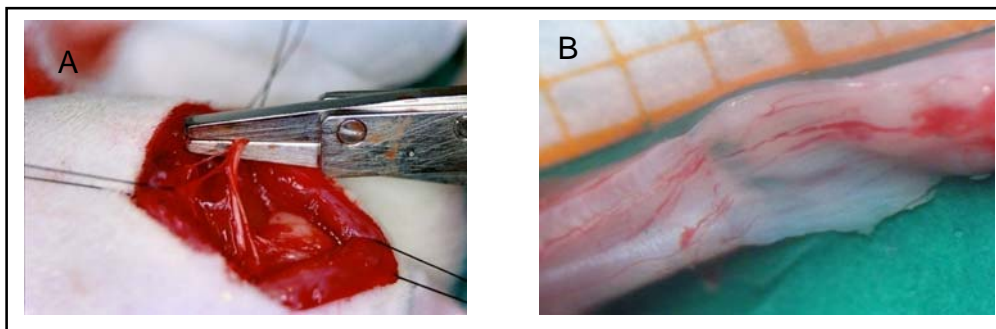


Figura 1. Procedimento de lesão de esmagamento. A) Pinça de Pressão padronizada 54N, esmagando o nervo ciático. Foto meramente ilustrativa, para exposição do nervo para a foto. B) Nervo ciático aproximadamente 30 segundos após esmagamento.

3.2.2. Protocolo de lesão término-terminal

O nervo ciático sofreu um corte transversal ao seu eixo e após a neurotmeze o coto proximal do nervo foi suturado ao coto distal com um fio de sutura monofilamento 8.0. A sutura foi realizada na região do epineuro dos nervos. Esse procedimento microcirúrgico foi realizado através da visualização por lupa cirúrgica com ampliação de quatro vezes.

Durante ambos os procedimentos cirúrgicos, o campo da cirurgia foi mantido úmido com solução fisiológica a 0,9 %. Após a lesão do nervo o músculo glúteo foi suturado com fio monofilamento de nylon 6.0 e a pele com fio de sutura 4.0. Após a cirurgia os animais foram colocados isoladamente em gaiolas e alimentados com comida e água *ad libitum*. Por quatro dias foi adicionado à água Paracetamol 750mg (13,5 mg/100 ml) para a redução da dor. Uma dose única de antibiótico terramicina (1mg/0,1mL) foi administrada para evitar complicações secundárias referentes a possíveis infecções.

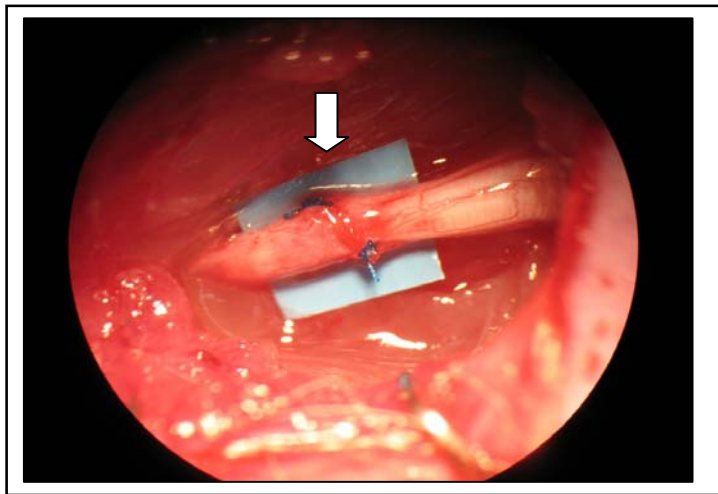


Figura 2. Cirurgia Neurorrafia termino-terminal. Foto ilustrativa da cirurgia, a sutura é somente na região epineural.

3.3. A Laserterapia (Aplicação do Laser)

A estimulação a laser foi realizada com o laser de baixa intensidade (GaAlAs e AsGaIn), devidamente calibrado e aplicado com emissão contínua transcutânea pontual, tanto o comprimento de 660 nm quanto o de 780 nm com potência fixa de 40 mW. A área do feixe era de 0,04 cm². O tempo de aplicação por ponto variou de acordo com a densidade de energia aplicada, ilustrada na figura 3.

Comprimento de Onda	Potência Fixa para todos	Densidade de energia	Energia total emitida por ponto	Tempo de emissão em minutos
660 nm	40 mW	10 J/cm ²	4 J	1/2
660 nm	40 mW	60 J/cm ²	24 J	1
660 nm	40 mW	120 J/cm ²	48 J	2
780 nm	40 mW	10 J/cm ²	4 J	1/2
780 nm	40 mW	60 J/cm ²	24 J	1
780 nm	40 mW	120 J/cm ²	48 J	2

Figura 3. Parâmetros de aplicação do laser. Energia por ponto = dose (J/cm²) x área do spot (cm²).

Para evitar variabilidade no manuseio, todos os animais operados foram estimulados manualmente tanto na aplicação simulada quanto na do laser. Os animais não foram anestesiados nos procedimentos terapêuticos. Um pano escuro era colocado no dorso do animal cobrindo sua face até o quadril, a mão do aplicador ficava posicionada sobre o pano, para imobilização do animal. Deste modo, era aplicado o laser na região da lesão.

3.3.1. Protocolo de Aplicação do Laser Pós-Axoniotmese

Aplicação foi realizada diariamente por 10 dias consecutivos, a partir do primeiro dia do pós-operatório, em dois pontos ao longo do nervo ciático (dois centímetros de distância entre eles), um na região mais proximal, e o outro ponto na região mais distal da lesão. Os ratos foram tricotomizados antes de todas as aplicações do laser. Os ratos não tiveram tratamento por 19 dias.

3.3.2. Protocolo de Aplicação do Laser Pós-Neurorrafia Término-terminal

Aplicação foi realizada diariamente por 10 dias consecutivos, a partir do primeiro dia do pós-operatório, em dois pontos ao longo do nervo ciático (dois centímetros de distância entre eles), um na região mais proximal, e o outro ponto na região mais distal da lesão.

Após o décimo primeiro dia foi iniciada a aplicação do laser em dias alternados por um mês. Depois do tratamento eles ficaram 43 dias sem aplicação do laser.

3.4. Grupos Experimentais

Os grupos experimentais foram chamados somente como “J” somente para abreviar o nome dos grupos apresentados e discutidos nesse trabalho. Portanto o “J” nos grupos representa J/cm^2 .

Os grupos animais foram divididos em 16 e tiveram 8 animais por grupo (n:8):

Grupos experimentais:

1. Com lesão de esmagamento (Crush – CR) do nervo

1. a)	N		Normal
1. b)	Crush (CR)		axoniotmese
1. c)	CR 660	+	10 J/cm^2
1. d)	CR 660	+	60 J/cm^2
1. e)	CR 660	+	120 J/cm^2
1. f)	CR 780	+	10 J/cm^2
1. g)	CR 780	+	60 J/cm^2
1. h)	CR 780	+	120 J/cm^2

2. Com neurorrafia término-terminal

2. a)	N		Normal
2. b)	Término-Terminal (TT)		
2. c)	TT 660	+	10 J/cm^2
2. d)	TT 660	+	60 J/cm^2

2. e)	TT 660	+	120 J/cm ²
2. f)	TT 780	+	10 J/cm ²
2. g)	TT 780	+	60 J/cm ²
2. h)	TT 780	+	120 J/cm ²

3.5. Avaliação Funcional

A avaliação da recuperação nervosa calculada pelo índice funcional do ciático (SFI) que foi descrito por Bain, Mackinnon & Hunter (1989). Os animais foram treinados, três vezes seguidas, a caminhar em um corredor que mede 42 cm de comprimento e 8,2 cm de largura. Após o treino, um papel branco colocado no assoalho do corredor possibilitou o rato caminhar sobre ele e registrar suas pegadas das patas posteriores, previamente coradas com tinta de carimbo. As mensurações foram feitas pelo mesmo avaliador por meio de uma régua. Três medidas foram obtidas a partir das impressões destas patas (1) PL= distância do 3º dedo ao calcâneo; (2) TS = distância do 1º ao 5º dedo; (3) ITS = distância do 2º ao 4º dedo. Após todas as medidas feitas tanto na pata experimental (E) quanto na normal (N) o índice funcional do ciático foi calculado de acordo com a equação proposta por Bain, Mackinnon & Hunter (1989) :

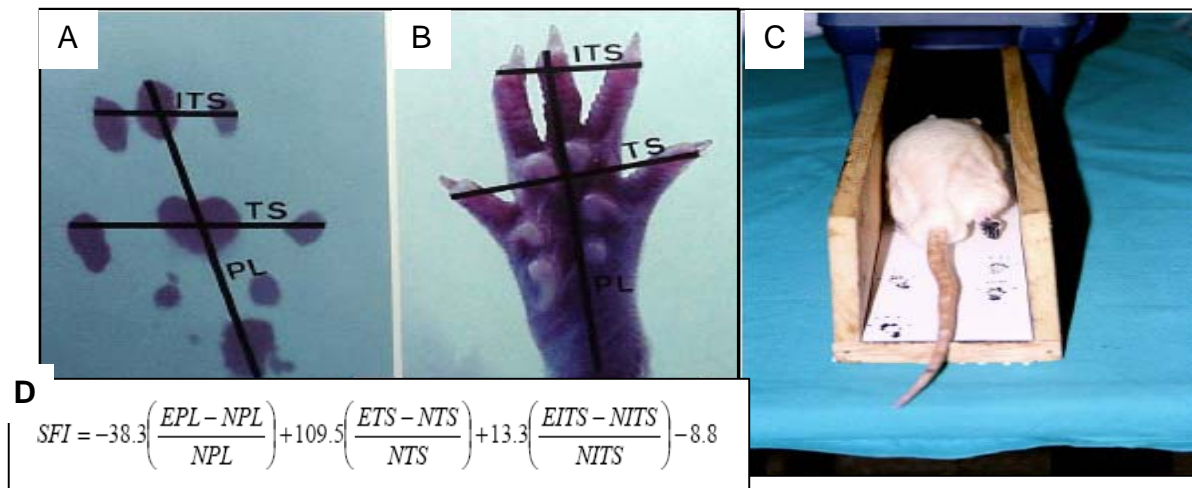


Figura 4. Análise funcional da marcha do rato. A) Marca de uma pata de rato, e como são feitas as medidas. B) Representação em uma pata natural de um animal. C) A execução do teste. D) Fórmula numérica para aquisição do índice funcional do ciático. Varejão et al., 2004

3.6. Avaliação Morfológica e Imunofluorescência

Após 30 dias (para os grupos axoniotmese) e 84 dias (para o grupo neurorrafia término-terminal) da intervenção cirúrgica, os nervos ciáticos reparados foram isolados e removidos dos animais sob anestesia total, assim como os músculos tibiais anteriores (TA), inervados pelo nervo ciático, analisados para avaliar a recuperação do trofismo muscular. Para o estudo com axoniotmese, quatro nervos foram imediatamente congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -86°C ; outros quatro foram usados para a análise morfológica. Após a dissecação dos tecidos os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico.

Já para o estudo com neurotmese, oito nervos foram usados para a análise morfológica e morfométrica.

Para a análise morfológica tem-se então: cada nervo (parte distal) foi dividido transversalmente em dois segmentos. Um foi fixado em glutaraldeído e incluído em resina, para análise morfométrica, o outro foi fixado em praformaldeído e incluído em parafina, para análise de imunofluorescência. Para a inclusão em historesina e em parafina, foram utilizados os procedimentos de rotina. Basicamente para a inclusão em parafina, os nervos foram fixados em formol 10% em uma hora e armazenados em álcool 70%, foram desidratados e posteriormente inclusos em parafina. Cortes transversais de $7\ \mu\text{m}$ de espessura, paralelos ao eixo transversal do nervo, foram feitos em um micrótomo da marca ANCAP. Para a inclusão em historesina os nervos foram fixados em glutaraldeído 25% durante sete horas e armazenados em tampão sacarose e azida sódica. Antes de serem inclusos em historesina os nervos foram impregnados com Tetróxido de ósmio á 2%. Posteriormente, os nervos foram cortados transversalmente com $3\ \mu\text{m}$ de espessura. Para a observação dos grupos esmagados os cortes foram corados com azul de toluidina.

Para análise de imunofluorescência, os cortes foram incubados por uma noite em solução contendo anticorpo anti-S100 (policlonal produzido em coelho, com lócus de reconhecimento da unidade monomérica para S-100 cálcio-englobando a proteína 21 KD bovina, diluição 1:800, Sigma, St Louis, MO, USA) capaz de identificar mielina e células de Schwann. Após lavagem em PBS, os cortes foram encubados por uma hora contendo o anticorpo secundário TRITC-conjugado IgG anti-coelho (diluição de 1:200, Dako). Os cortes foram montados para análise em microscópio

de fluorescência. As imagens foram obtidas no microscópio *Axiolab* (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e as fotos foram feitas no aumento da objetiva de 100x com a câmera *HRC Carl Zeiss AxioCam*.

3.7. Avaliação Morfométrica das Fibras Nervosas Regeneradas

Para análise morfométrica das fibras nervosas regeneradas, foi utilizado o método do *Systematic Random Sampling* e do *2D-Dissector* que foi descrito por Geuna, Gigo-Benato & Rodrigues (2004). As lâminas foram analisadas no microscópio *Olympus CBA-K*. As imagens foram feitas, a 100x com a câmera *Digital color SCC-131A Samsung* e capturadas com o programa *Honestech Tvr 2.5*.

Para a histomorfometria foram feitas 12 imagens por nervo, seguindo um rigoroso esquema de escolha do campo, depois essas imagens foram analisadas no programa: *Image J Launcher* versão 1.41 (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA / <http://rsb.info.nih.gov/ij>). As medidas realizadas foram: número de fibras nervosas por campo, área de secção transversa do axônio, da bainha de mielina e da fibra nervosa. Os dados numéricos foram analisados por meio do programa MATLAB.

3.8. Avaliação do Músculo

Os músculos TA direitos foram divididos em duas porções a partir do ventre muscular, um fragmentado proximal foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido para a zimografia. O fragmento distal foi congelado em isopentano pré resfriado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -86°C. Foram realizados cortes histológicos seriados (10 µm), na porção média do músculo, em micrótomo criostato a -25°C. Estes cortes foram corados com azul de toluidina (TB) para análise da área de secção transversa das fibras musculares. Os músculos foram corados com Trinômio de Masson para análise morfológica geral sobre a estrutura muscular entre os diferentes grupos.

A morfometria da área de secção transversa das fibras musculares foi medida em microscopia de luz, usando o software *Axion Vision* (Carl Zeiss). A área de secção transversa de duzentas fibras musculares, escolhidas aleatoriamente de cada músculo TA, foi mensurada a partir da imagem obtida da região central do ventre muscular.

3.9. Análise zimográfica

A zimografia é uma técnica que utiliza gelatina como substrato em gel de SDS-PAGE, permitindo verificar a atividade gelatinolítica de proteases teciduais. Neste caso, pretendemos observar a atividade de MMPs, que são fortemente ativas durante processos de adaptação muscular, sendo responsáveis, em grande parte, pelo processo de remodelamento do tecido conjuntivo do músculo e do nervo. Fragmentos musculares e nervos congelados (25 mg) foram lavados 3 a 4 vezes com salina gelada e incubados com o tampão de extração (ácido cacodílico 10 mM pH 5,0, NaCl 0,15 mM, ZnCl₂ 1 µM, CaCl₂ 20 mM, NaN₃ 1,5 mM e Triton X-100 0,01% [v/v]) a 4°C, com agitação contínua, durante 24 horas. As amostras foram então centrifugadas a 13000 rpm e o sobrenadante coletado.

3.9.1. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas dos nervos e dos músculos foi determinada utilizando-se o kit BCATM Protein Assays (Pierce), segundo instruções do fabricante. Esse método é baseado no ácido bicinconínico (BCA) para detecção colorimétrica e quantificação de proteínas totais. Foi construída uma curva padrão baseada nas concentrações de 25 µg/ml a 2000 µg/ml de BCA. As absorbâncias da curva padrão e das amostras de interesse foram lidas a 562 nm e a concentração protéica foi estimada a partir delas.

3.9.2. Zimografia

O extrato tecidual foi então testado quanto à presença de atividade gelatinolítica, conforme descrito por Cleutjens et al (1995). Duplicatas de amostras foram eletroforisadas em gel de SDS-PAGE com gelatina (100 mg/ml). Após a eletroforese, o gel foi lavado 2 vezes durante 30 minutos em solução 2,5 % de Triton X-100 para remoção do SDS. Em seguida, separaram-se as duplicatas, cortando-se o gel. Uma metade do gel foi incubada em tampão de substrato (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, CaCl₂ 5 mM e NaN₃ 0,02%). A outra metade foi incubada no mesmo tampão contendo EDTA (15 mM), para verificar se a protease é um metaloprotease, uma vez que o EDTA inibe sua atividade. Ambas as metades foram incubadas a 37° C, durante 24 horas. Após este tempo, o gel foi corado com Coomassie Blue por 30 minutos, descorado com ácido acético:metanol:água (1:4:5) para visualização das bandas de atividade. Para documentação, o gel foi fotografado e as bandas de atividade foram analisadas quanto sua densitometria no software Gene Tool da Syngene.

3.10. Avaliação Estatística dos Dados

Os dados foram submetidos aos testes de Levene e Shapiro-Wilk para avaliar a homogeneidade e normalidade das amostras, respectivamente. Para dados paramétricos, os testes Anova *one-way* seguido por Tukey foram utilizados para identificar e localizar as diferenças, respectivamente. Para dados não paramétricos, Kruskal-Wallis seguido por Newman-Keuls foram utilizados. Um nível de significância de 5% foi adotado.

4. RESULTADOS

4.1. Grupos com esmagamento do nervo

4.1.1. Teste Funcional

As figuras 5 e 6 mostram os resultados da avaliação funcional da recuperação pós-traumática do nervo ciático dos grupos que foram operados com a técnica de esmagamento, calculada por meio do índice funcional do ciático. No momento pré-cirúrgico, todos os grupos estavam normais e seus valores foram semelhantes e próximos à zero. No primeiro dia após a cirurgia, como era esperado, ocorreu uma queda significativa do índice de todos os grupos experimentais. Os índices se mantiveram baixos até o 12º dia, após esse período os grupos aproximaram-se dos níveis considerados normais. Portanto a análise estatística ANOVA mostrou a diferença mais evidente no momento pré-cirurgia, que foi quando os nervos ainda estavam normais, em comparação com o pós-cirúrgico e a pré-eutanásia. Todas as avaliações entre os grupos, em todos os momentos estudados, não detectaram mudanças entre os sete grupos ($p > 0,05$).

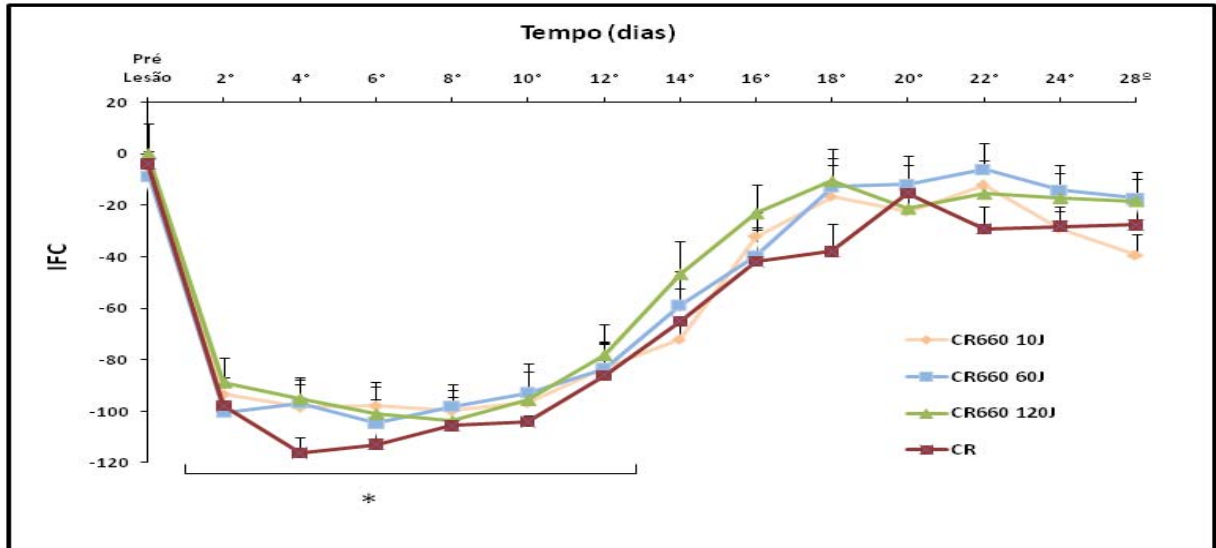


Figura 5. Resultado do teste funcional CR660nm. Análise funcional da marcha, dos grupos dos nervos esmagados e tratados com o laser 660 nm. CR crush. Medidas realizadas antes da lesão do nervo, e em dias alternados. * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os números de 2° ao 28° são os dias que foram realizados o teste funcional pós-lesão. Valores normais entre 0 á -20. $J = J/cm^2$.

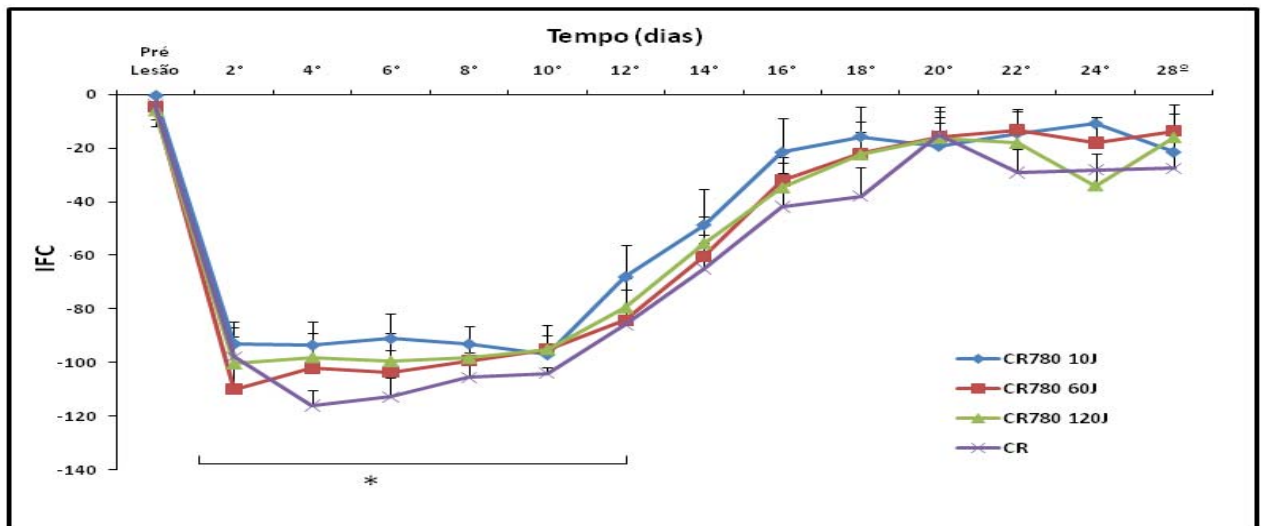


Figura 6. Resultado do teste funcional CR780nm Análise funcional da marcha, dos grupos dos nervos esmagados e tratados com o laser 780 nm. CR controle lesado. Medidas realizadas antes da lesão do nervo, e em dias alternados. * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os números de 2° ao 28° são os dias que foram realizados o teste funcional pós-lesão. Valores normais entre 0 á -20. $J = J/cm^2$.

4.1.2. Histologia dos músculos Tibiais Anteriores (TA)

A análise histológica por Tricrômio de Masson dos músculos TA mostrou uma atrofia das fibras musculares dos grupos CR e CR780 10, 60 e 120J comparados ao grupo N e CR660 10, 60 e 120J (Fig. 7). Esta atrofia pode ser observada pela redução da área de secção transversa das fibras musculares. A forma poligonal das fibras musculares foi preservada em todos os grupos experimentais (Fig. 7). Os grupos submetidos à lesão nervosa periférica apresentaram um aumento da produção de colágeno total principalmente no perimísio que recobre os feixes de fibras musculares (Fig. 7).

Fibras musculares alvo foram encontradas próximas às terminações nervosas em todos os grupos com lesão nervosa periférica. Estas fibras alvo são um indicativo que o processo de reinervação está ocorrendo. As fibras musculares alvo apresentam sinais morfológicos de reorganização da sua citoarquitetura, pois possuem uma região central arredondada com filamentos desorganizados (Fig. 7).

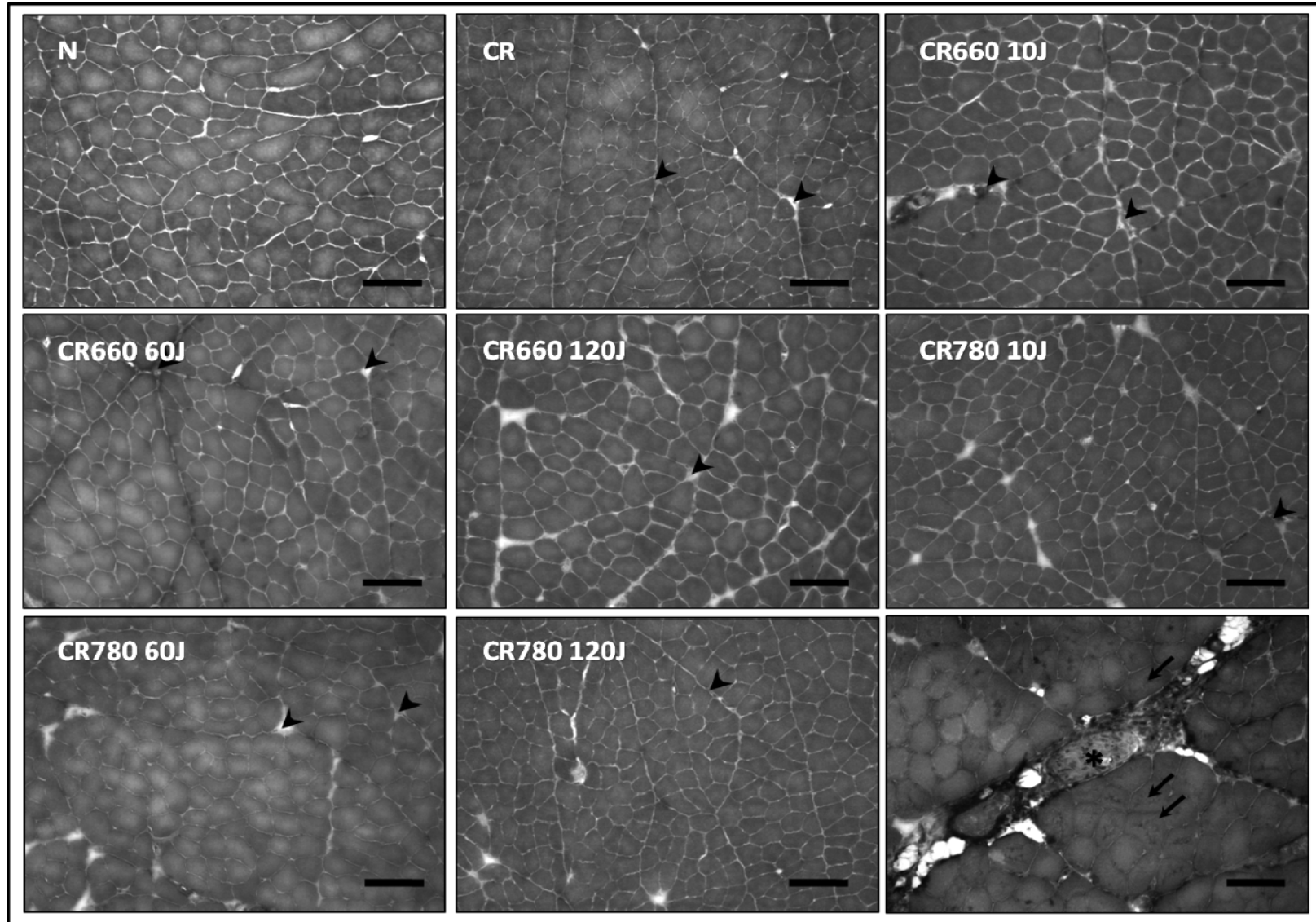


Figura 7 Cortes histológicos transversais do ventre dos músculos TA dos diferentes grupos experimentais corados com Tricrômio de Masson. Observe que os grupos CR e CR780 10, 60 e 120J apresentaram atrofia das fibras musculares em relação ao N. Cabeças de setas indicam aumento de colágeno total no perímio dos grupos submetidos à lesão nervosa periférica. Setas indicam a presença de fibras alvo, sendo um indicativo de reinervação destas fibras. Asterisco (*) mostra uma terminação nervosa intramuscular. $J = J/cm^2$. Escala da barra=20 μm para todos os grupos, na última a figura abaixo à direita 50 μm .

4.1.3. Área de Secção transversa (AST) das fibras musculares

A AST das fibras do músculo TA diminuiu significativamente nos grupos CR e CR780 comparados ao grupo N ($P < 0,05$; Fig. 8). No grupo CR houve uma redução média de 55,11% comparado a N ($P < 0,05$; Fig. 8). Os grupos irradiados com laser 780 nm apresentaram uma diminuição média de 44,47% na AST das fibras musculares (CR780 10J: -37,01%; CR780 60J: -51,77%; CR780 120J: -44,63%) comparados ao N ($P < 0,05$; Fig. 8). Os valores de AST das fibras musculares nos grupos irradiados com laser 660 nm não diferiram entre si e foram semelhantes aos valores normais ($P > 0,05$; Fig. 8).

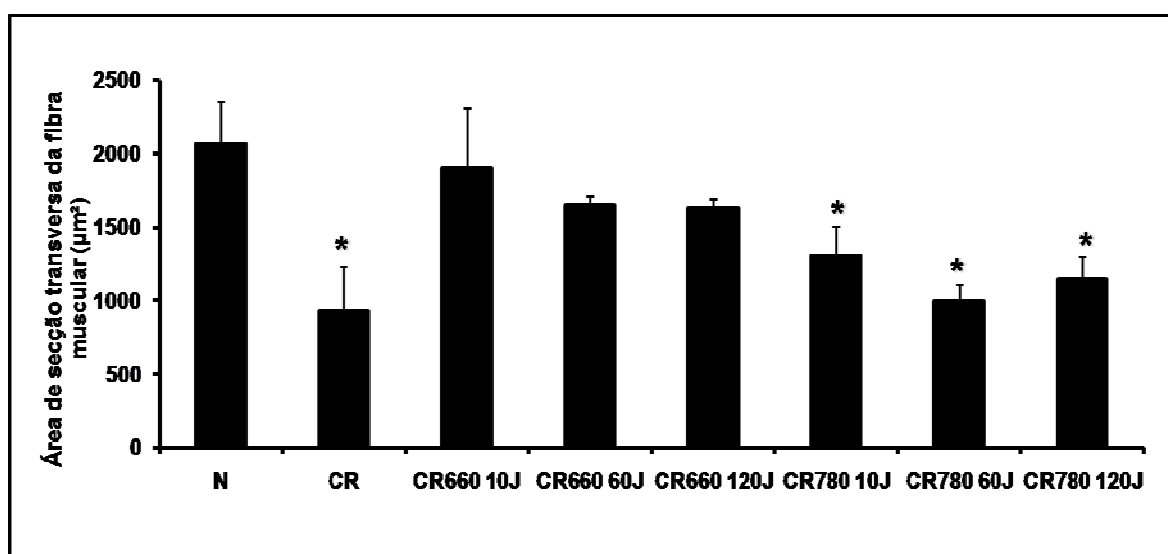


Figura 8. Área de Secção Transversa (AST) dos músculos TA dos diferentes grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparado ao N. Note que a irradiação à laser 660nm acelerou a recuperação da AST das fibras musculares independente da intensidade de energia aplicada. J = J/cm²

4.1.4. Atividade total de matriz metaloproteinases (MMPs) no músculo TA

A MMP-9 não foi detectada nos músculos TA em nenhum dos grupos experimentais.

A atividade da MMP-2 no grupo CR não diferiu dos valores normais ($p > 0,05$; Fig. 9). O laser com comprimento de onda de 660 nm nas diferentes doses (10, 60 e 120J) diminuiu significativamente a atividade da MMP-2 quando comparado ao grupo N ($p < 0,05$; Fig. 9). Além disso, tanto CR660 10J quanto CR660 60J também apresentaram valores significativamente menores na atividade de MMP-2 se comparados ao CR ($p < 0,05$; Fig. 9).

Os grupos CR780 60J e CR780 120J apresentaram uma diminuição de atividade da MMP-2 em comparação ao N e ao CR ($p < 0,05$; Fig. 9). A atividade da MMP-2 em CR780 10J não diferiu dos grupos N e CR ($p < 0,05$; Fig. 9).

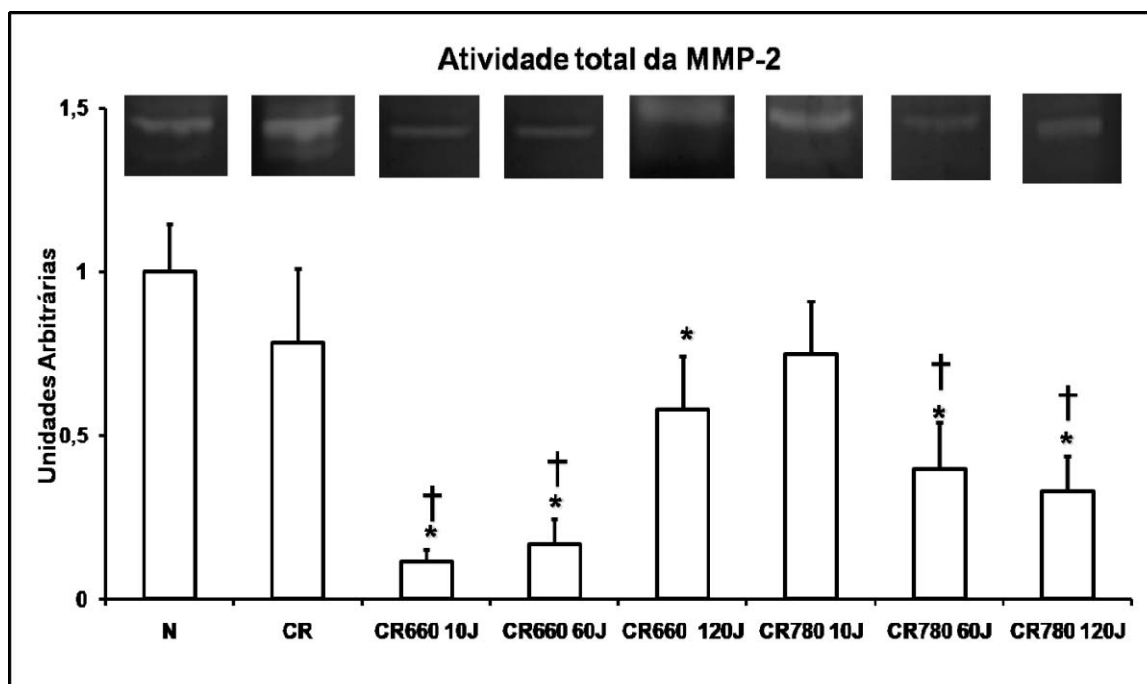


Figura 9. Atividade total da MMP2 nos grupos CR. A Atividade total da MMP-2 observada nos diferentes grupos experimentais. * $P < 0,05$: comparado ao N; † $P < 0,05$: comparado ao CR. Observe a expressiva diminuição da atividade da MMP-2 nos grupos CR irradiados com laser 660 nm, em doses baixas (10J); ou moderadas (60J). Observe os irradiados com laser 780 nm; em doses moderadas (60J) ou elevadas (120J), comparado aos grupos N e CR. Bandas representativas da atividade gelatinolítica da MMP-2 são apresentadas na parte superior do gráfico. J = J/cm²

4.1.5. Análise histológica do Nervo Ciático

A figura 10 mostra a histologia dos nervos ciáticos corados com azul de Toluidina, de todos os grupos lesados e também do grupo normal, que ilustram claramente similaridade de organização estrutural em todos os grupos. Uma leve diminuição da AST da fibra pode ser observada em todos os cortes dos nervos que foram esmagados em comparação ao grupo normal. Esta leve atrofia pode ser observada mais evidente nos dois últimos grupos CR780 60J e 120J. Os nervos dos grupos que foram tratados com o laser 660 nm nas três densidades de energia (10, 60 e 120 J/cm²) e o grupo CR780 10 J mostraram-se mais estruturados com as fibras nervosas maiores comparados ao CR.

A figura 11 mostra um nervo marcado com anti-S100. Esta técnica nos possibilitou observar a bainha de mielina e células de Schwann ao redor do axônio. No grupo N foi

possível observar a organização das fibras nervosas, a bainha de mielina bem evidenciada na cor vermelha. Já nos grupos experimentais foi observada uma expressão similar de S-100 entre os grupos com axoniotomia, indicando um processo de regeneração e reestruturação da fibra nervosa. Não houve diferenças aparentes entre os grupos com lesão nervosa periférica.

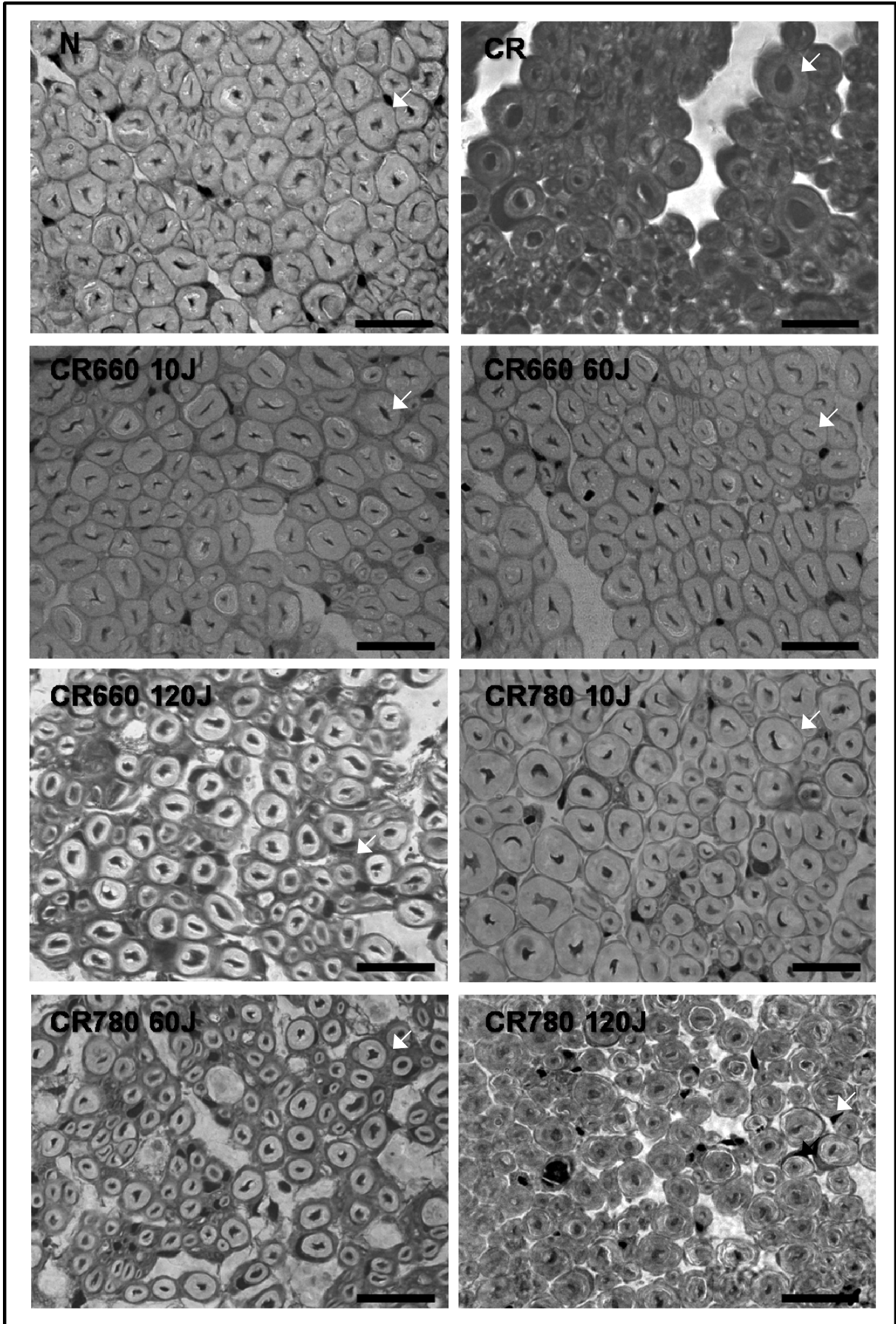


Figura 10. Cortes histológicos dos nervos axoniotomizados, corados com azul de toluidina. Seta representa a fibra nervosa mielinizada. Escala da barra 100 μ m. J = J/cm²

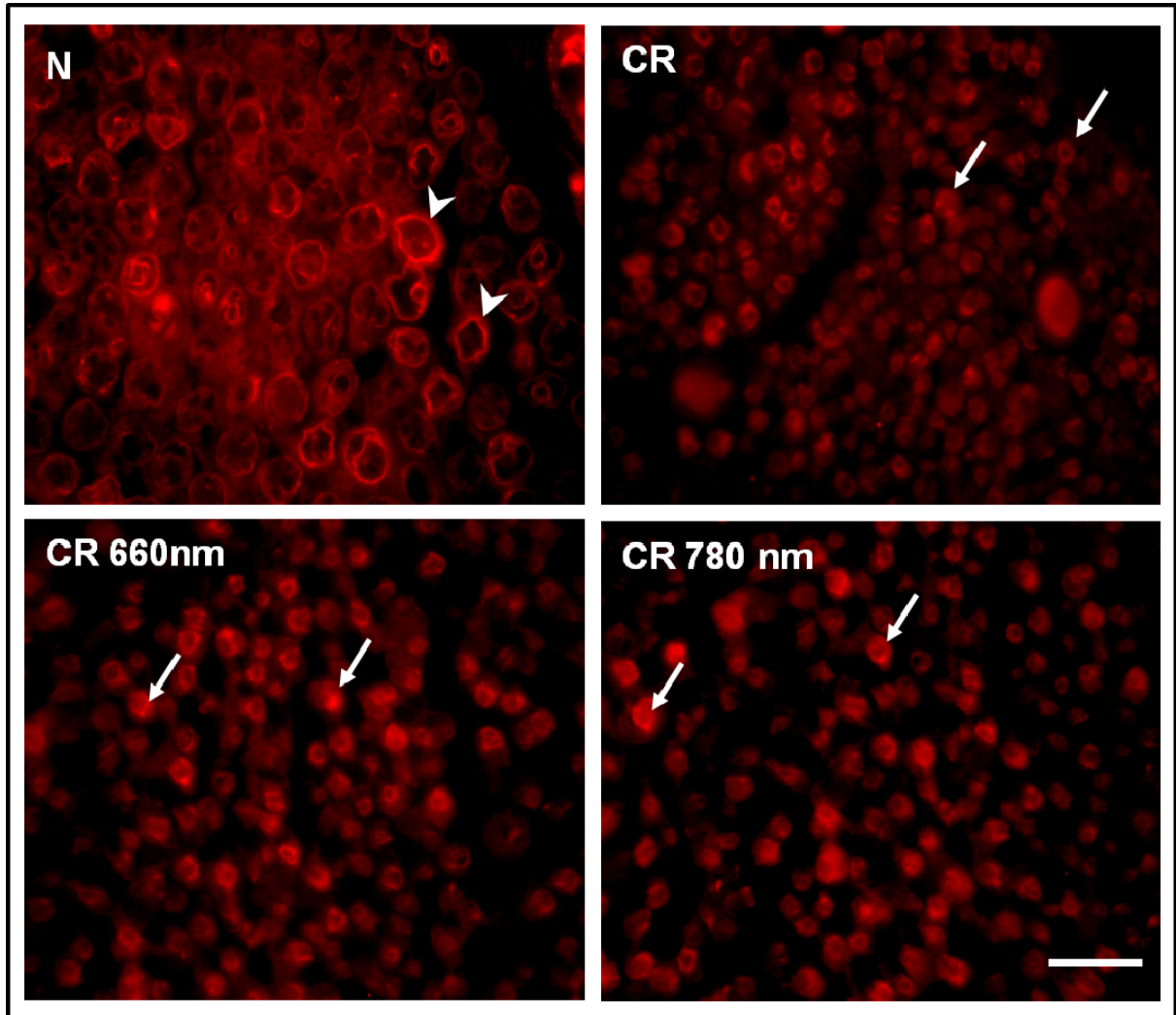


Figura 11. Cortes histológicos transversais dos nervos axoniotomizados marcados com anti-S100. Observe a bainha de mielina em vermelho. Cabeça de seta representa a estrutura normal da bainha de mielina; Seta mostra o padrão de expressão de S-100 nos grupos axoniotomizados. Escala da barra 100 μ m. $J = J/cm^2$

4.1.6. Análise Morfométrica do Nervo Ciático

4.1.6.1 Número de Fibras por campo

O valor médio de fibras nervosas por campo foi de 135 ± 27 , sendo que não houve diferença entre o número de fibras nervosas entre os diferentes grupos experimentais ($P > 0,05$; Fig. 12).

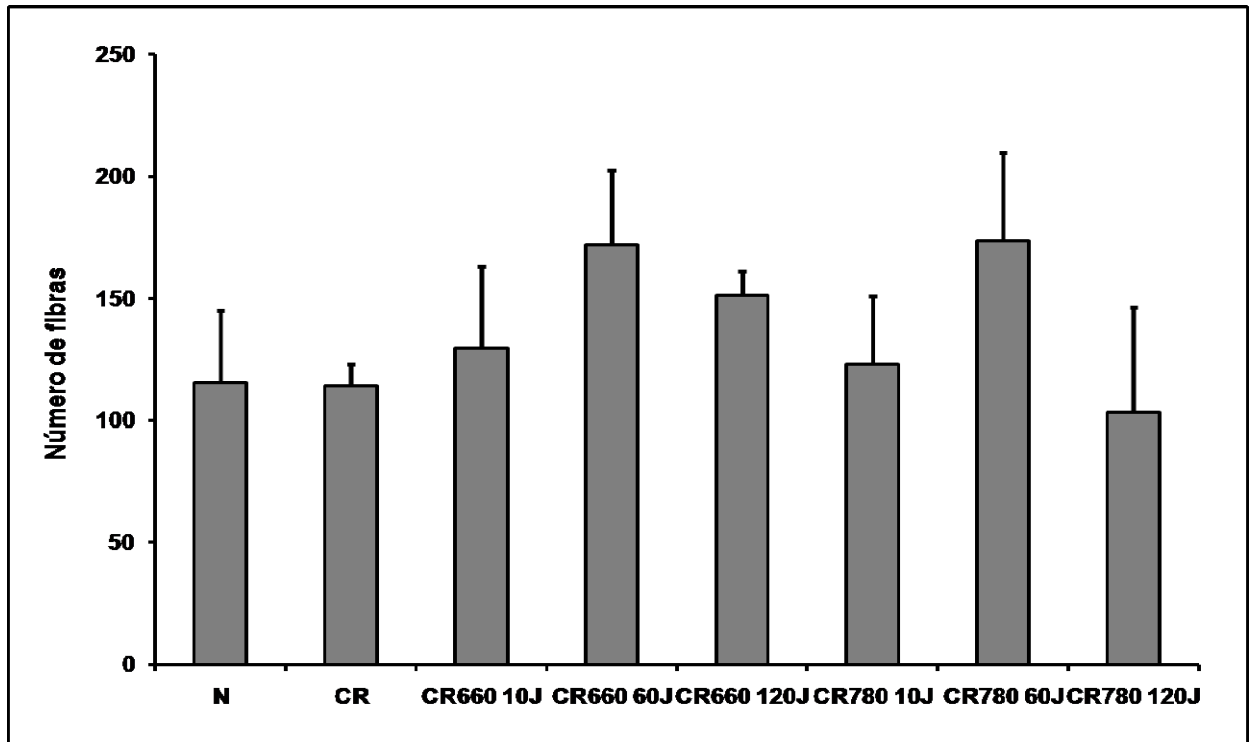


Figura 12. Número de fibras nervosas por campo microscópico dos nervos ciáticos nos diferentes grupos experimentais. Não houve diferença entre todos os grupos.

4.1.6.2. Área de secção transversa (AST) da mielina, axônio e fibras nervosas.

A figura 13 mostra os valores de AST das mielinas, dos axônios e das fibras nervosas nos nervos ciáticos nos diferentes grupos experimentais. Para a mielina, foi observada uma redução na AST nos grupos CR, CR660 120J e CR780 60J comparados a N ($P < 0,05$, Fig. 13). Os grupos CR660 10 e 60J e CR780 10 e 120J apresentaram valores de AST de mielina semelhante ao grupo N ($P > 0,05$; Fig.13). Para o axônio, observou-se uma diminuição na AST de todos os grupos com lesão nervosa periférica, comparados a N ($P < 0,05$; Fig. 13). Não houve diferença entre os grupos experimentais lesados ($P > 0,05$; Fig.13). O comportamento da AST da fibra nervosa acompanhou as alterações da mielina, isto é, os grupos CR660 10 e 60J e CR780 10 e 120J apresentaram valores similares ao grupo N ($P > 0,05$; Fig.13), enquanto que

CR, CR660 120J e CR780 10 e 120J tiveram seus valores de AST reduzidos quando comparados ao grupo N ($P < 0,05$; Fig.13).

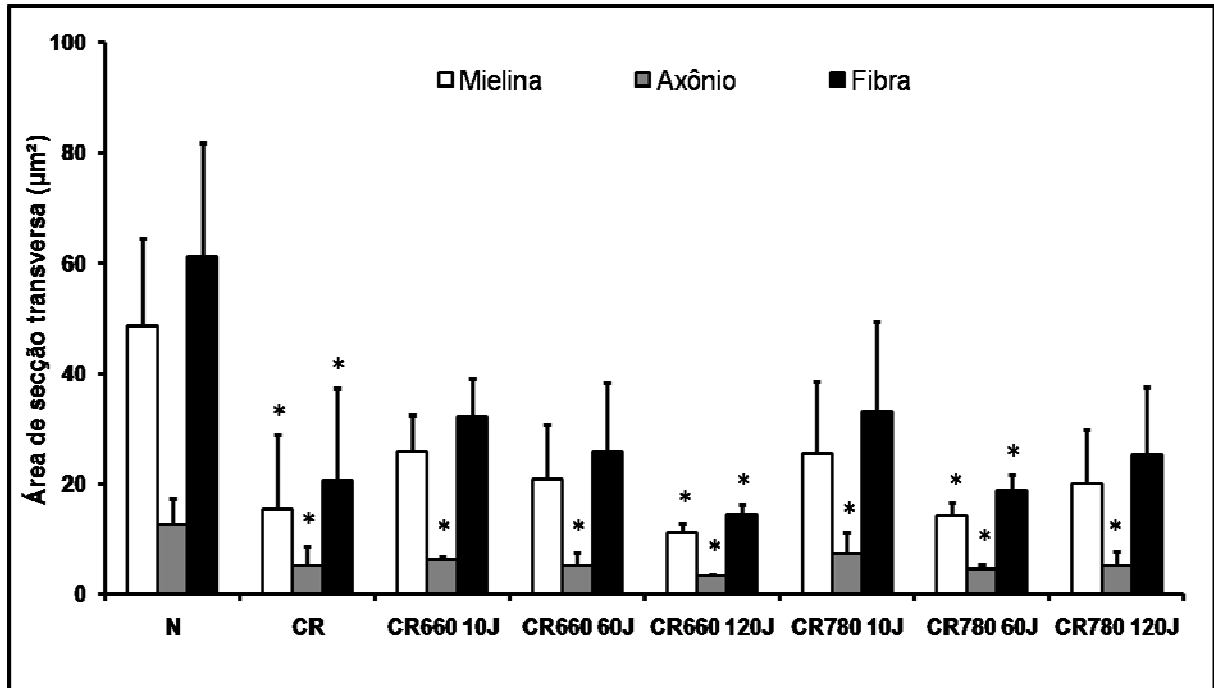


Figura 13. Área de secção transversa das bainhas de mielina, dos axônios e das fibras nervosas em nervo ciático dos diferentes grupos experimentais. * $P < 0,05$ comparado ao N. Observe que os grupos CR660 10 e 60J e CR780 10 e 120J apresentaram valores de AST de mielina e fibra nervosa similares ao N. Todos os grupos diminuiriam a AST do axônio comparados ao N. $J = J/cm^2$.

4.1.7. Atividade total de matriz metaloproteinases (MMPs) no nervo ciático

A lesão nervosa não modificou a atividade da MMP-9 no grupo CR comparado ao N ($p > 0,05$). A irradiação com laser 660 nm, independente da dose utilizada, diminuiu a atividade da MMP-9 nos nervos ciáticos lesados comparados ao CR (CR660 10J: -62%, $p = 0,0002$; CR660 60J: -68%, $p = 0,0001$; e CR660 120J: -39%, $p = 0,03$; Fig. 14). O grupo CR780 10J apresentou uma redução significativa da atividade da MMP-9 comparada ao N e ao CR ($p = 0,02$ e $p = 0,0001$, respectivamente; Fig.14). Os grupos CR780 60 e 120J apresentaram atividade de MMP-9 semelhante aos grupos N e CR ($p > 0,05$. Fig.14).

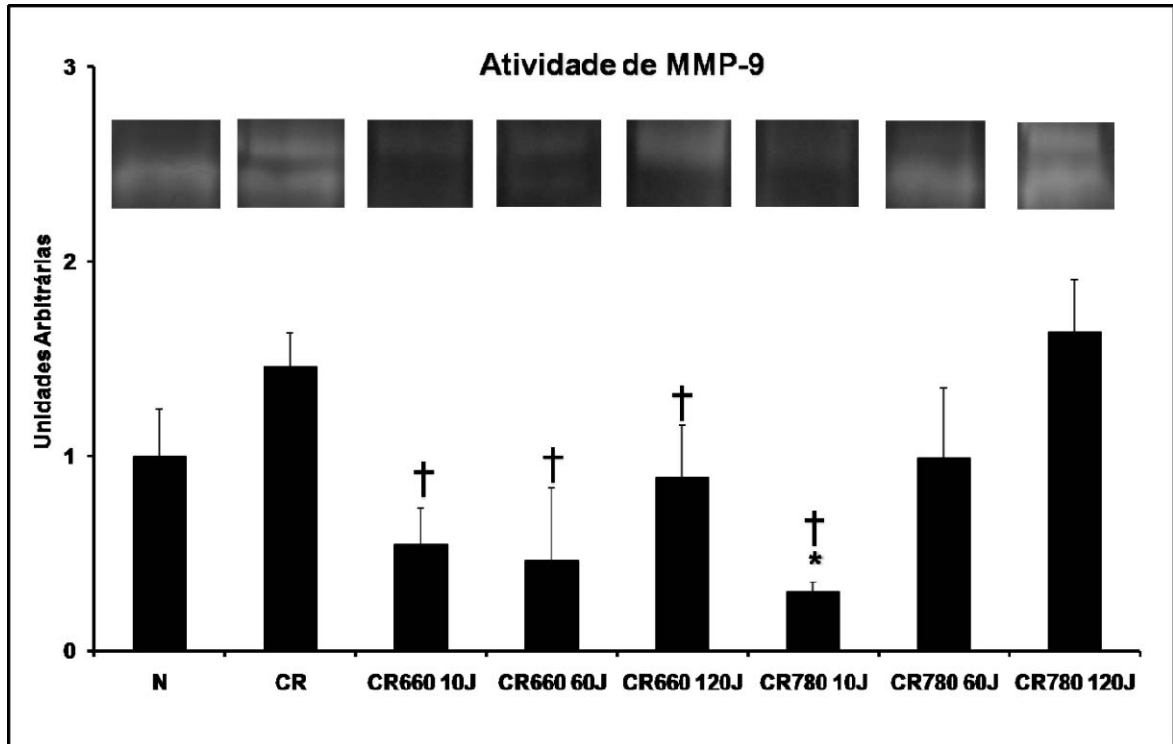


Figura 14. Atividade total da MMP-9 observada nos diferentes grupos experimentais. * $p < 0,05$: comparado ao grupo N; † $p < 0,05$: comparado ao CR. Observe que todos os grupos irradiados com laser 660 nm e apenas o grupo CR780 10J, apresentaram uma diminuição da atividade de MMP-9 comparada ao CR. Bandas representativas da atividade gelatinolítica da MMP-9 são apresentadas na parte superior do gráfico. J= J/cm².

A atividade da MMP-2 não foi alterada nos grupos CR e CR780 10, 60 e 120J comparada ao grupo N ($p > 0,05$; figura 15). No entanto, todos os grupos irradiados com laser 660 nm tiveram a atividade da MMP-2 significativamente aumentada, se comparado ao grupo N (CR660 10J: +81%, $p = 0,04$; CR660 60J: +126%, $p = 0,003$; e CR660 120J: +100%, $p = 0,02$) e CR ($p < 0,05$; figura 15).

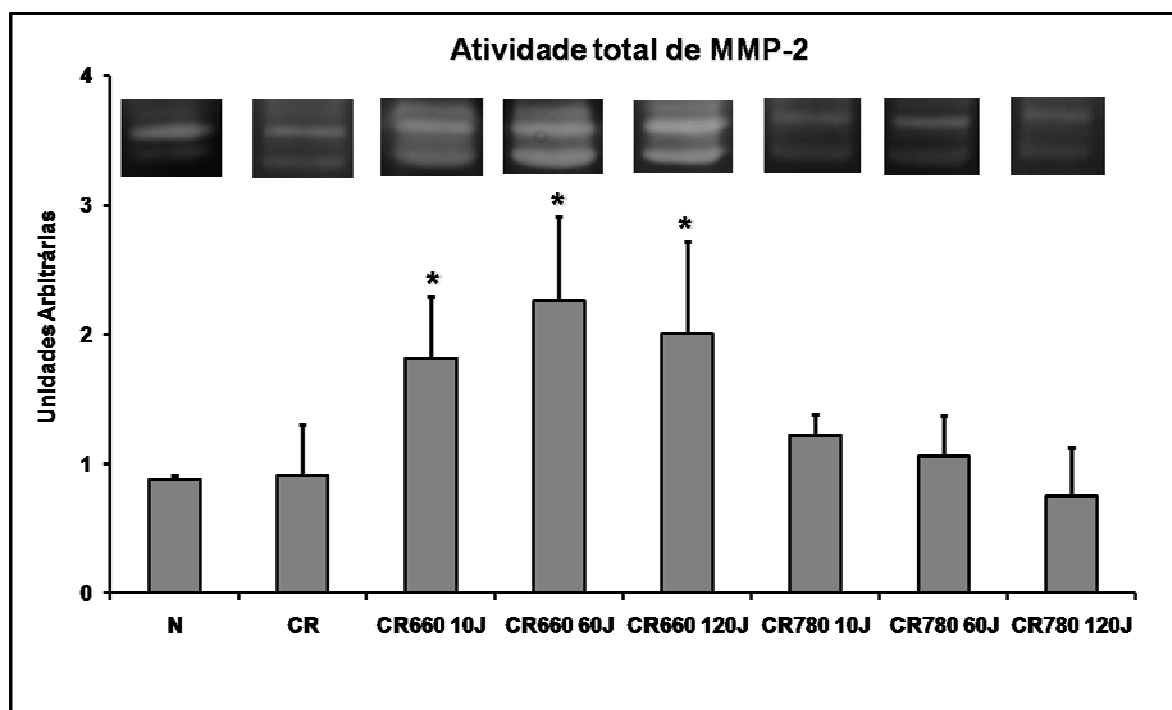


Figura 15. Atividade total da MMP-2 observada nos diferentes grupos experimentais. * $p < 0,05$: comparado os grupos N e CR. Observe o aumento significativo da atividade da MMP-2 nos grupos irradiados com laser 660nm comparado ao N e CR. Bandas representativas da atividade gelatinolítica da MMP-2 são apresentadas na parte superior do gráfico. $J = J/cm^2$.

4.2. Grupos neurorrafia Término-Terminal

4.2.1. Teste Funcional

Todos os grupos experimentais apresentaram valores similares ao N ($P > 0,05$; Fig. 16) no momento prévio à cirurgia (pré-TT). No entanto, já no primeiro dia todos os grupos TT, irradiados ou não com laser, apresentaram valores médios em torno de -117. Estes valores não diferiram entre si, mas foram inferiores aos seus valores pré-TT ($P < 0,05$; Fig.16). No quarto dia, houve uma diferença entre os grupos TT660 10J e TT780 60J, eles aumentaram em comparação ao TT ($P < 0,05$). Todos os grupos foram melhores que TT no décimo sexto dia ($P < 0,05$). No vigésimo quinto dia, os grupos TT660 60 e 120J e os grupos TT780 60 e 120J apresentaram valores significativamente maiores que o grupo TT ($P < 0,05$). Os grupos TT660 120J e todos os grupos TT780 foram melhores que o grupo TT no trigésimo sétimo e no quadragésimo nono dias ($P < 0,05$). Além disso, no dia 49 TT660 10J também teve um desempenho melhor que TT ($P < 0,05$). No dia 61, os grupos TT660 10J e TT780 60 e 120J foram melhores que o TT. No final do experimento, todos os grupos experimentais lesados

estavam menores que na pré-lesão ($P < 0,05$; Fig.16), não houve diferenças significativas entre eles ao final do experimento ($P > 0,05$; Fig.16).

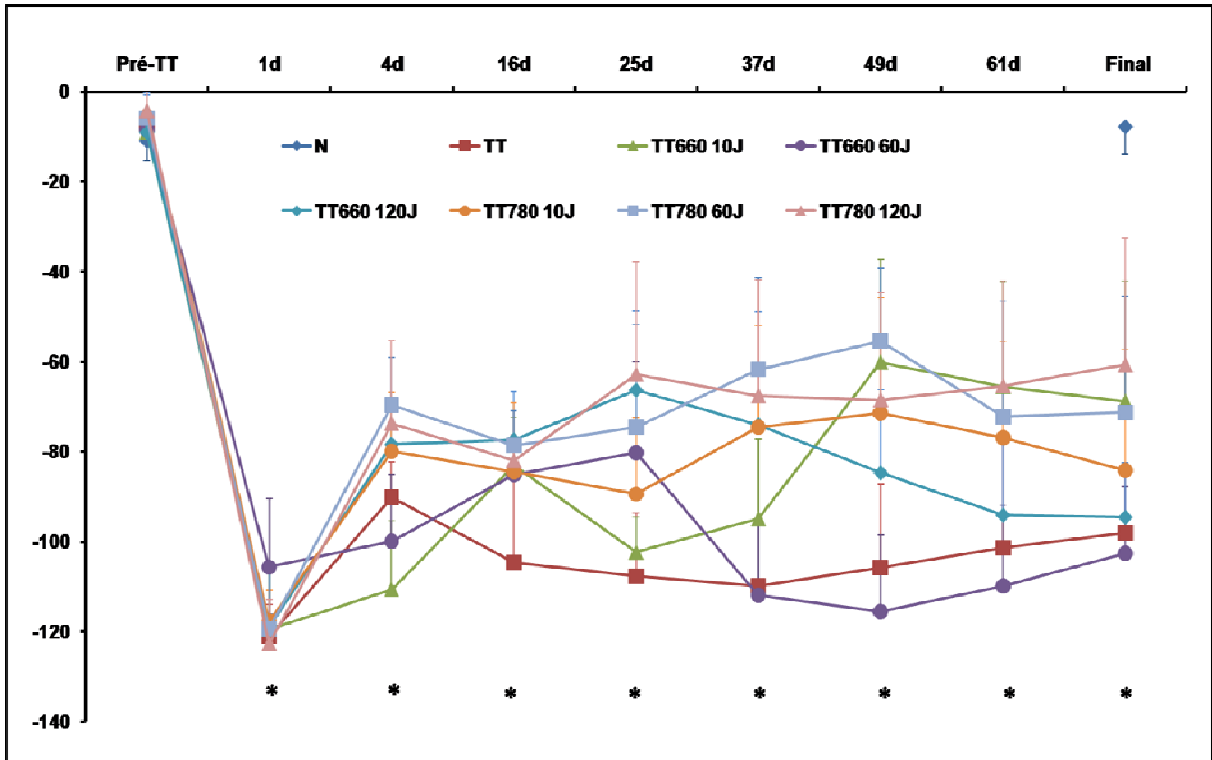


Figura 16. Índice funcional do nervo ciático nos diferentes grupos experimentais. * $P < 0,05$ comparado ao Pré-TT e ao N. Observe que já no primeiro dia, todos os grupos submetidos à cirurgia diminuíram seus índices indicando uma piora da função. Esta diminuição manteve-se até o final do experimento. Todos os grupos TT não alcançaram seus valores Pré-lesão (normais). Valores normais entre 0 á -20. J= J/cm

4.2.2. Histologia dos músculos TA

Cortes transversais dos músculos TA mostraram atrofia das fibras musculares nos grupos TT, TT660 10J, TT780 60J e TT780 120J quando comparados ao N (Fig.17). Estas fibras apresentaram uma forma arredondada diferente da forma poligonal da fibra muscular normal (Fig.16). Todos os grupos lesados apresentaram fibras musculares anguladas, algumas fibras com núcleos centralizados e degeneradas (Fig.17). Os grupos TT660 60J, TT660 120 e TT780 10J apresentaram fibras musculares com a arquitetura bem preservada e diâmetro aparentemente similar ao grupo N (Fig.17).

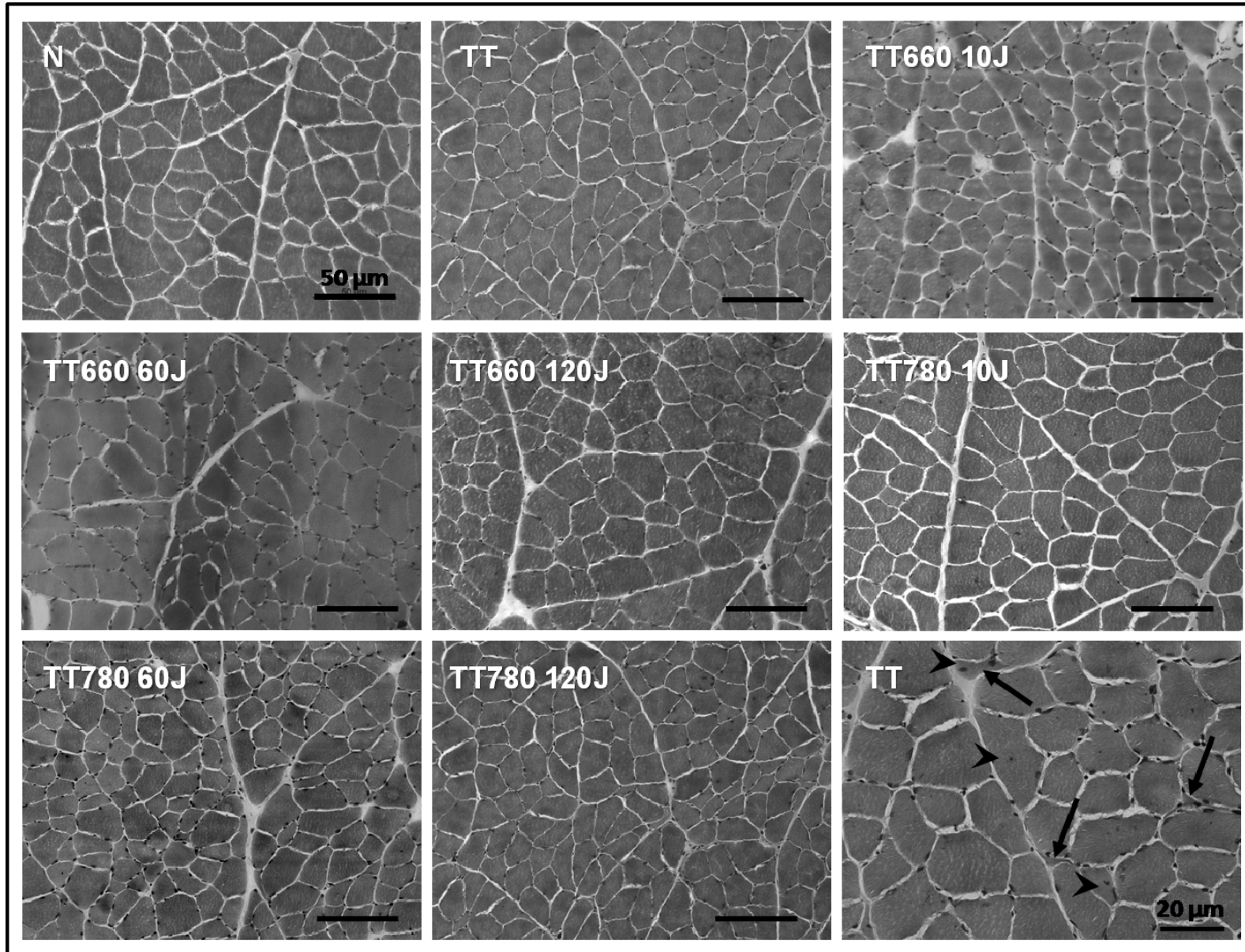


Figura 17. Cortes histológicos transversais do ventre dos músculos TA dos diferentes grupos experimentais corados com Azul de Toluidina. Observe que os grupos TT, TT660 10J, TT780 60J e TT780 120J apresentaram atrofia das fibras musculares em relação ao N. As fibras musculares destes grupos apresentaram uma forma arredondada característica de fibras desnervadas. Os grupos TT660 60 e 120J e TT780 10J possuíam fibras musculares com arquitetura mais preservada. Em todos os grupos com TT irradiados ou não com laser foram observadas fibras anguladas (setas), fibras musculares com núcleos centralizados (cabeça de seta) e fibras em degeneração. $J = J/cm^2$.

4.2.3. Área de secção transversa (AST) das fibras musculares

A AST das fibras musculares diminuiu significativamente nos grupos TT (-41%, $p = 0,0001$), TT660 10J (-20%, $p = 0,09$), TT780 60 (-24%, $p = 0,04$) e 120J (-31%, $p = 0,002$) comparados ao grupo N (Fig. 18). Os grupos TT660 60 e 120J e TT780 10J apresentaram valores da AST das fibras musculares semelhantes ao N ($P > 0,05$; Fig.18) e superiores ao TT (TT660 60J: $p = 0,005$; TT660 120J: $p = 0,01$; e TT780 10J: $p = 0,02$, respectivamente; Fig.18).

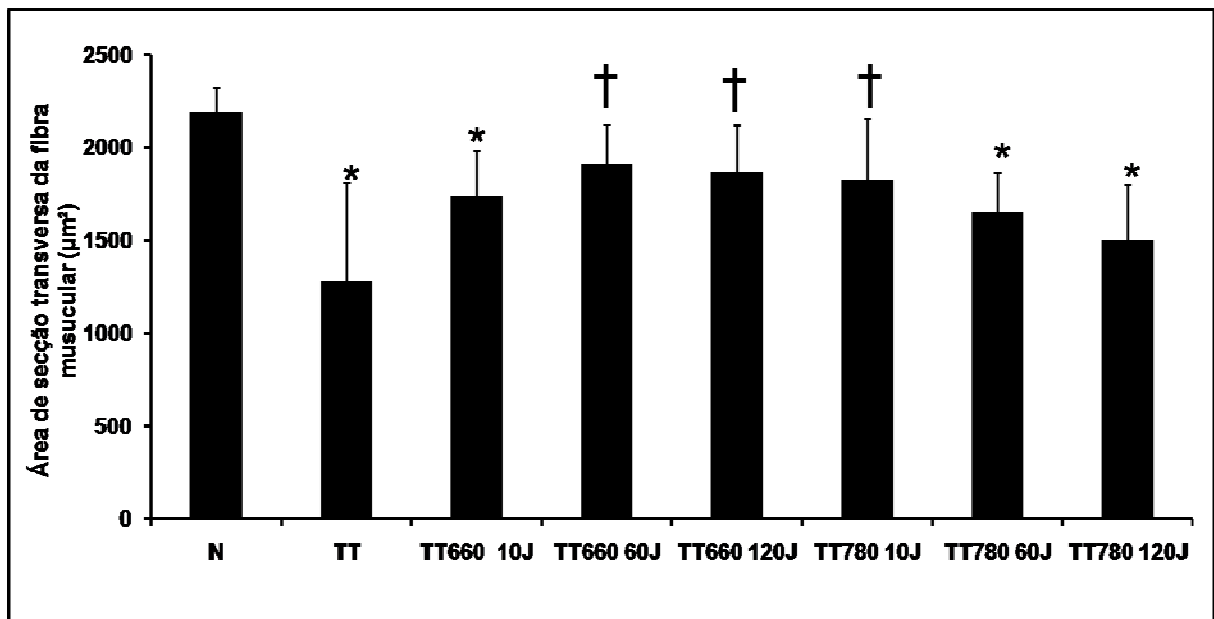


Figura 18. Área de Secção Transversa (AST) dos músculos TA dos diferentes grupos experimentais. * $p < 0,05$: comparados ao N; † $p < 0,05$: comparado ao TT. Note que os grupos TT660 60 e 120J e TT780 10J apresentaram valores normais da AST das fibras musculares. J= J/cm²

4.2.4. Atividade total de matriz metaloproteinases (MMPs) no músculo TA

A MMP-9 não foi observada nos músculos TA nos grupos experimentais examinados.

A atividade da MMP-2 no grupo TT não diferiu dos valores normais ($p > 0,05$; Fig. 19). O laser com comprimento de onda de 660 nm nas diferentes doses (10, 60 e 120J) diminuiu significativamente a atividade da MMP-2 quando comparado ao grupo N e TT ($p < 0,05$; Fig. 18). Não houve diferença entre os grupos TT660 ($P > 0,05$; Fig.19).

A atividade da MMP-2 foi significativamente menor no grupo TT780 10J quando comparada ao TT ($P < 0,05$; Fig.19), já o grupo TT780 60J apresentou atividade semelhante ao

N e ao TT ($P>0,05$; Fig.19). Além disso, o grupo TT780 120J teve a atividade total de MMP-2 aumentada se comparada ao N e TT ($P<0,05$; Fig..19).

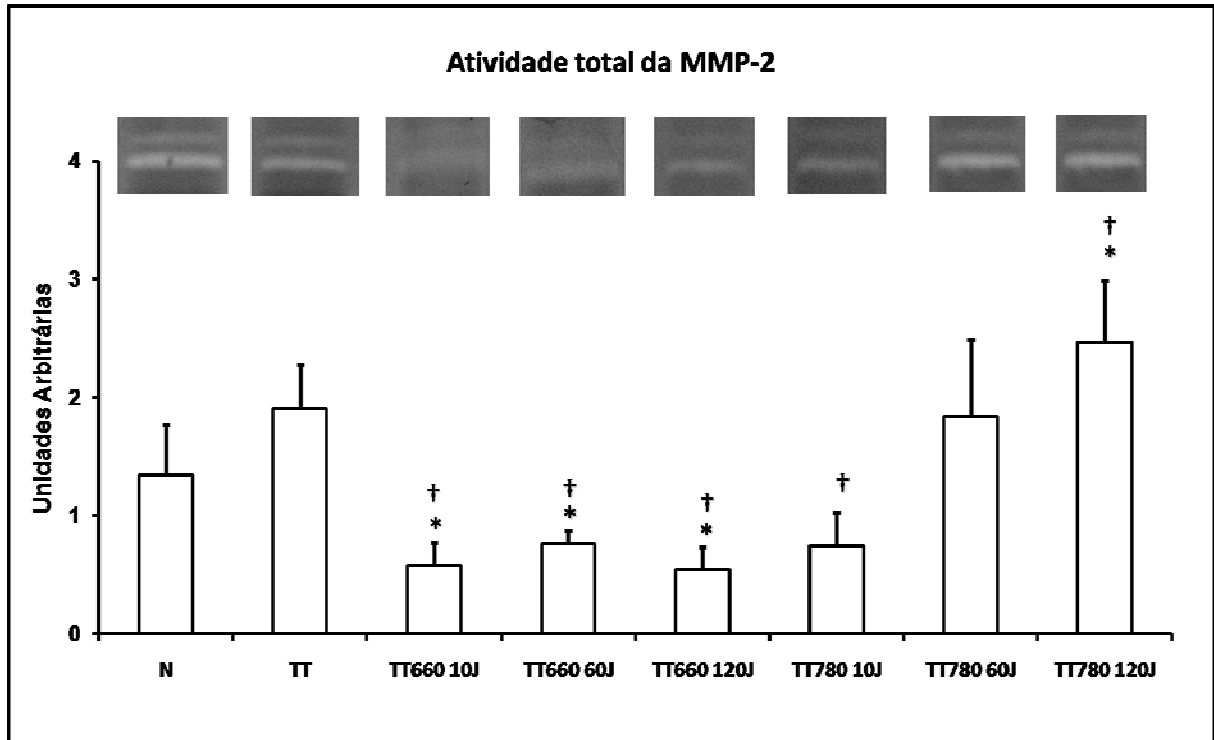


Figura 19. Atividade total da MMP-2 observada nos diferentes grupos experimentais. * $p<0,05$: comparado ao N; † $p<0,05$: comparado ao TT. Observe a expressiva diminuição da atividade da MMP-2 nos grupos TT660 10, 60, 120J e TT780 10J comparados ao N e TT. O grupo irradiado com laser 780 nm 120J apresentou um aumento na atividade total da MMP-2. J= J/cm².

4.2.5. Histologia do nervo ciático

4.2.5.1. Análise histológica do Nervo Ciático

A figura 20 mostra a histologia dos nervos ciáticos impregnados com tetróxido de ósmio em todos os grupos lesados e também do grupo normal que ilustram claramente a diferença de organização estrutural de todos os grupos lesados em comparação ao normal. A figura do grupo N mostra suas fibras bem arredondadas e com a bainha de mielina bem evidente. Já nos grupos experimentais as fibras não são todas arredondadas, com a presença de fibras achatadas e com a espessura tanto da fibra quanto da bainha de mielina menores do que as normais. Foi encontrado um grande número de células de Schwann englobando as fibras lesionadas.

A figura 21 mostra um nervo marcado com anti-S100. Esta técnica nos possibilitou observar a bainha de mielina e células de Schwann ao redor do axônio. No grupo N foi possível observar a organização das fibras nervosas, a bainha de mielina bem evidenciada na cor vermelha. Já nos grupos experimentais foi observada uma diminuição da bainha de mielina, assim como a expressão de S100, comparados ao grupo normal. Todos os grupos experimentais neurotmizados não diferenciaram entre si.

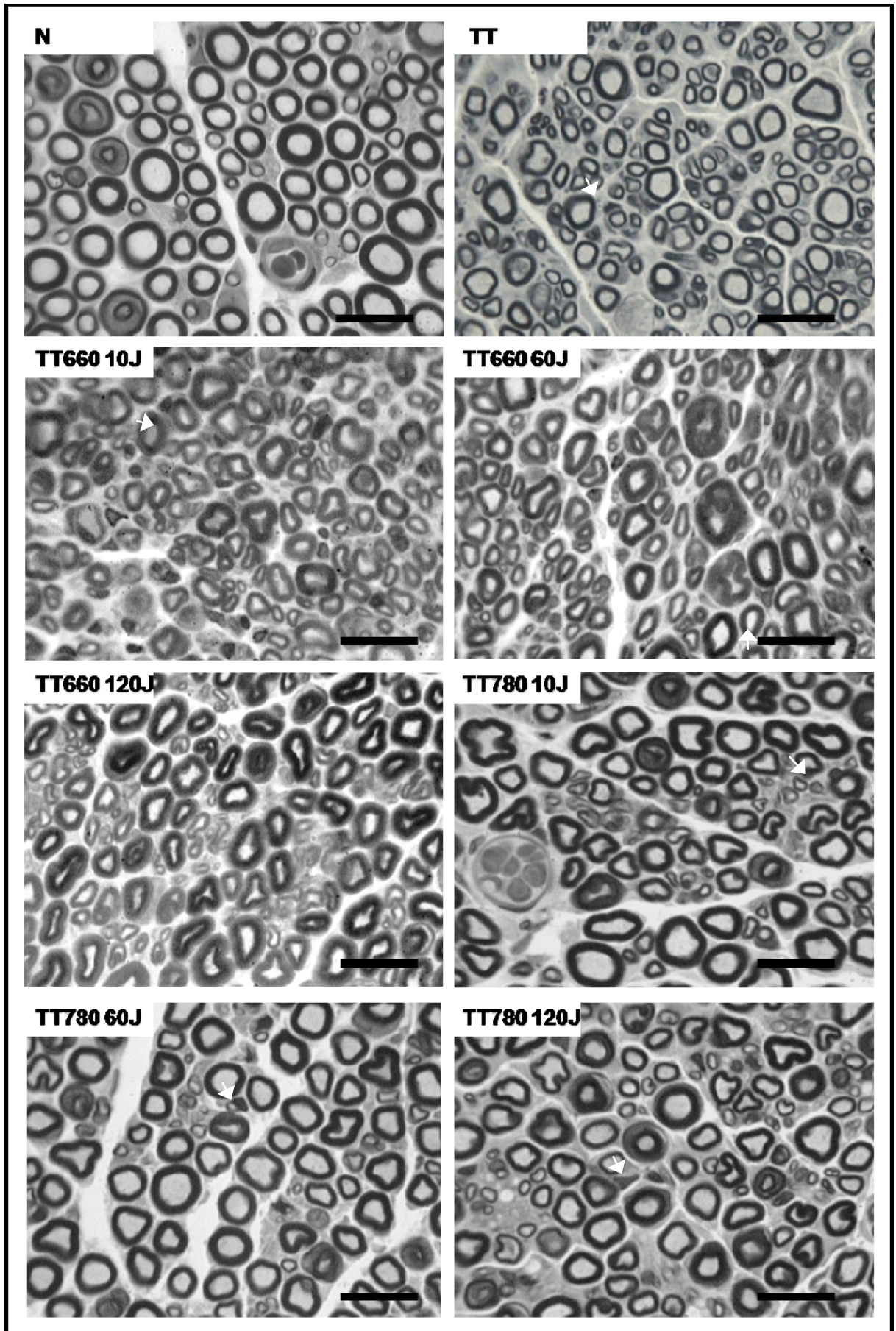


Figura 20. Cortes histológicos dos nervos ciáticos, impregnados com tetróxido de ósmio. Escala da barra 100 μ m. J = J/cm². Setas=Células de Schwann.

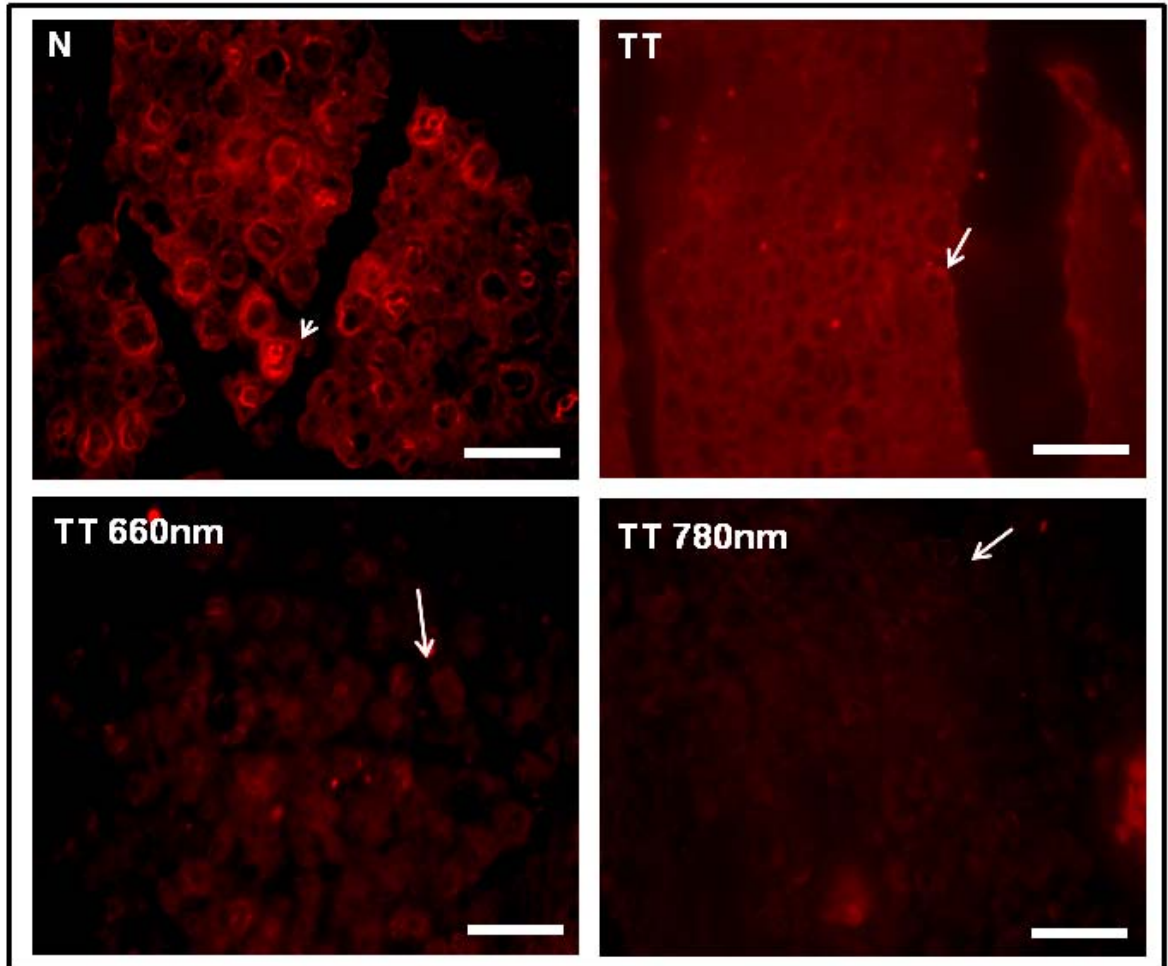


Figura 21. Cortes histológicos transversais dos nervos axoniotmisados marcados com anti-S100. Observe a bainha de mielina em vermelho. Cabeça de seta representa a estrutura normal da bainha de mielina; Seta mostra o padrão de expressão de S-100 nos grupos axoniotomizados. Escala da barra 100 μ m. $J = J/cm^2$.

4.2.6. Área de secção transversa do nervo ciático

4.2.6.1. Número de fibras nervosas

O valor médio de fibras nervosas por campo foi de 132 ± 20 , sendo que não houve diferença entre o número de fibras nervosas entre os diferentes grupos experimentais ($P > 0,05$; Fig. 22).

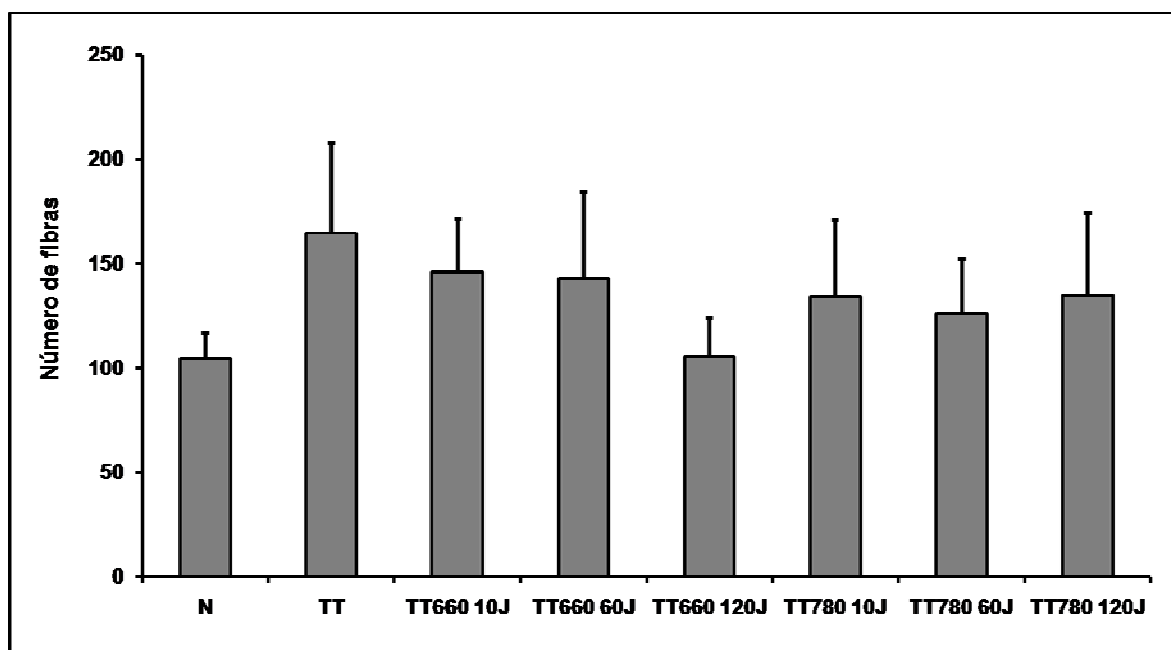


Figura 22. Número de fibras nervosas por campo microscópico dos nervos ciáticos nos diferentes grupos experimentais. Não houve diferença entre todos os grupos. $J = J/cm^2$.

4.2.6.2. Área de secção transversa (AST) de mielina, axônio e fibra nervosa.

A figura 23 mostra os valores das AST das bainhas de mielinas, axônios e fibras nervosas nos nervos ciáticos nos diferentes grupos experimentais. Para mielina, axônio e fibra nervosa observou-se uma redução na AST em todos os grupos TT, irradiados ou não com laser, comparados a N ($P < 0,05$, Fig. 23). Apenas o grupo TT660 120J apresentou valores de AST da bainha de mielina e fibra nervosa superiores ao TT ($P < 0,05$; Fig.23). Os demais grupos irradiados com laser 660 e 780 nm mostraram valores de AST para mielina e fibra nervosa semelhantes aos valores encontrados em TT ($P > 0,05$; Fig.23). Todos os grupos TT apresentaram valores da AST dos axônios semelhantes entre si ($P > 0,05$; Fig.23).

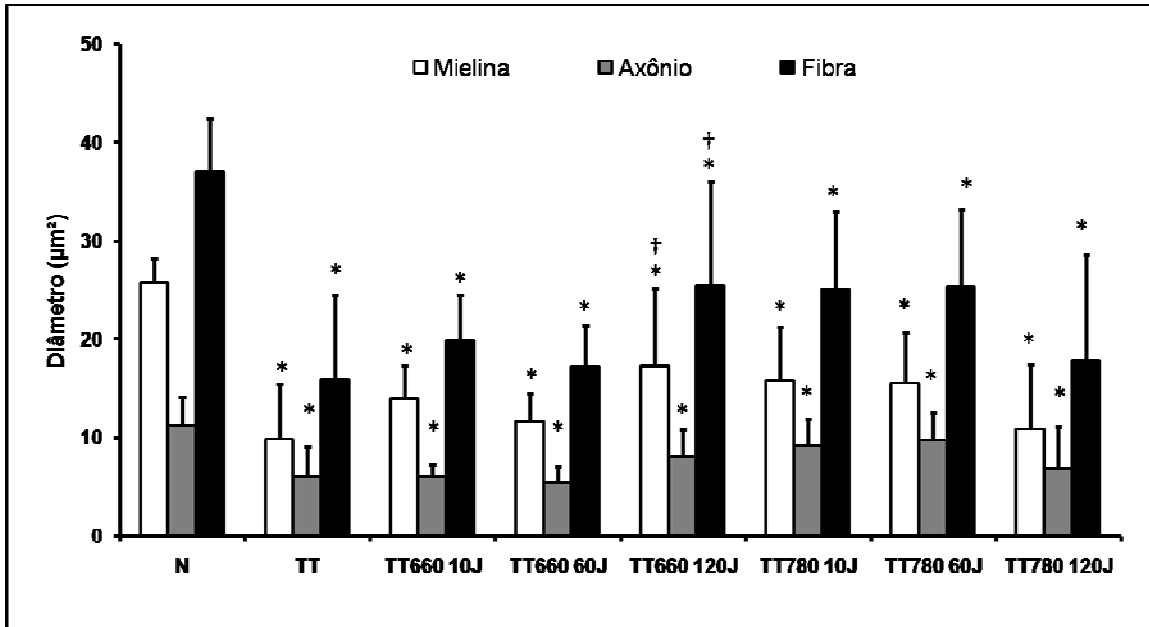


Figura 23. Área de secção transversa da bainha de mielina, axônio e fibra nervosa em nervo ciático dos diferentes grupos experimentais. * $P < 0,05$ comparado ao N; † $P < 0,05$ comparado ao TT. Observe que todos os grupos lesados apresentaram valores da AST da bainha de mielina, axônio e fibra nervosa inferiores aos valores normais. Apenas o grupo TT660 120J mostraram valores superiores da AST da bainha de mielina e fibra nervosa comparado ao TT. J= J/cm².

5. DISCUSSÃO

O presente estudo trouxe novas informações sobre os efeitos de doses diferentes da laserterapia na regeneração nervosa periférica e no músculo desnervado, em dois tipos de lesão do nervo ciático do rato. Todos os resultados trouxeram informações importantes para ajudar a esclarecer, determinar o melhor protocolo de aplicação do laser para acelerar a recuperação neuromuscular e conseqüentemente melhorar a sua função.

A análise geral e em conjunto dos resultados será discutida, pois tanto os resultados dos músculos, quanto os dos nervos,

tiveram uma tendência em demonstrar uma melhor resposta neuromuscular em determinadas doses do laser. Vários estudos realizados demonstram que o laser acelera o processo de regeneração do nervo (GIGO-BENATO, GEUNA & ROCHKIND, 2005; ANDERS et al., 2004). Porém, não foi encontrado nenhum estudo na última década que tenha analisado a resposta do músculo TA, pós-aplicação do laser, na lesão nervosa periférica (ROCHKIND et al., 2009 b;c). Outro ponto inovador desse estudo, que foi o pioneiro em estudar a atividade das MMPs no nervo esmagado e tratado com o laser. Além de estudar a atividade das MMPs no músculo TA pós-aplicação do laser na lesão nervosa periférica.

Os resultados conflitantes sobre o uso da laserterapia podem ser resultantes de inúmeras variáveis técnicas (em particular o comprimento de onda, doses e tipos de irradiação) os quais se não forem adequadamente ajustados poderão reduzir o eventual sucesso do procedimento terapêutico (GIGO-BENATO, GEUNA & ROCHKIND, 2005). Seguindo essa necessidade de estabelecer protocolos clínicos de aplicação da laserterapia ainda não testados, esse estudo teve a intenção de continuar aprofundar a análise dessa irradiação sobre o nervo. Os principais aspectos que foram confrontados foram os tipos de comprimento de onda do laser, três parâmetros de irradiação e também dois tipos de modelos experimentais de lesões nervosas (neurotmesa e axoniotmesa), os quais são aspectos relevantes nas perspectivas de aplicação em pacientes.

A escolha dos parâmetros do protocolo de irradiação do laser de baixa intensidade do presente estudo teve como base vários estudos científicos. Existe um aumento no uso dos aparelhos laser infravermelho, mas isso é justificado, pela sua maior penetração através da pele (TURNER & HODE, 1993). Efeitos positivos em estudos experimentais foram obtidos com comprimento de onda visível (ROCHKIND et al., 1987; HAMILTON et al., 1992; ANDERS et al., 1993) e próximo ao infravermelho (ROCHKIND et al., 2007 a;b; ROCHKIND et al., 2009 a). Parece que ambos os tipos de laser podem ser utilizados para promover a regeneração nervosa (GIGO-BENATO, GEUNA & ROCHKIND, 2005). Outro

parâmetro é a densidade de energia, em que as análises dos resultados publicados mostraram que a laserterapia em diferentes níveis de densidade de energia, com menos de 10 J/cm² até 150 J/cm², são eficientes na regeneração nervosa (GIGO-BENATO, GEUNA & ROCHKIND, 2005). O mesmo pode ser aplicado nos tempos de tratamento os quais oscilam de menos de 1 minuto até 90 minutos. Portanto, essas observações sugerem que a luz exerce um efeito positivo na regeneração nervosa, com uma grande variação de intervalos tanto de densidade de energia, quanto tempo de emissão. Todos os estudos publicados, os quais utilizaram emissão contínua levaram a resultados positivos. Portanto, esse tipo de emissão a laser de acordo com os protocolos observados, foi utilizado neste estudo baseados em achados na literatura (GIGO-BENATO, GEUNA & ROCHKIND, 2005).

O presente estudo trouxe uma curva dose dependente, o qual foi essencial para conseguirmos encontrar uma dose mais adequada tanto ao tipo de lesão, quanto ao tipo de comprimento de onda utilizado. Nos grupos esmagados, parece que ambos os comprimentos de onda foram melhores para a área de secção transversa do nervo ciático. Porém, somente em algumas densidades de energia a atrofia da fibra nervosa periférica foi evitada, que foram no laser 660 nm nas densidades de energia 10 e 60 J/cm² e no laser 780 nm na densidade de energia de 10 e 120 J/cm². Nas mesmas doses foi observada que a espessura da bainha de mielina estava igual ao normal, este achado é um indicativo que o nervo pós-esmagamento e tratado com o laser nas doses acima mencionadas, melhorou sua atividade de condução. Porém na análise qualitativa de imunofluorescência a bainha de mielina e células de Schwann estavam marcadas, destacadas, porém não estavam diferentes do controle CR. A bainha de mielina é responsável pela condução do potencial de ação ao longo do axônio, e a falta ou redução dela no nervo causa uma diminuição ou perda da função axonal (OH, 2001). Já atrofia dos nos músculos TA foi evitada nos grupos experimentas que foram estimulados com o laser 660 nm, que se apresentaram sem atrofia muscular, comparados ao grupo lesado, isso sugere que suas funções estão normais, e que o laser 660 nm nas densidades de energia de 10, 60 e 120 J/cm² são eficazes em evitar a atrofia muscular do TA pós-lesão de axoniotmese.

Os resultados relativos à atividade das MMPs no modelo de esmagamento nervoso, também são interpretados de acordo com o contexto global dos achados do músculo e do nervo. Deste modo, os autores do presente estudo acreditam que o laser 660 nm, principalmente os grupos 60 e 120 J/cm², acelerou o processo de regeneração nervosa e reinervação das fibras musculares. Tal hipótese pode ser sustentada pelo fato que os grupos irradiados com laser 660 nm recuperaram a AST das fibras musculares comparados ao grupo normal e lesão. Esta recuperação foi acompanhada por um aumento da atividade da MMP-2 e

uma diminuição da MMP-9 no nervo. Já no músculo foi acompanhada por uma diminuição da atividade da MMP-2.

Durante a degeneração walleriana, eventos iniciais como a desintegração do citoesqueleto axonal e a quebra da bainha de mielina são coordenados, dentre outros fatores, pela atividade das MMPs, especialmente a MMP-9 e -2. La Fleur e colaboradores (1996) mostraram que altos níveis de MMP-9 no 1º e 4º dia pós-lesão por esmagamento do nervo estão relacionados com o ingresso de neutrófilos e macrófagos, respectivamente. Os autores relatam ainda que estas células inflamatórias, e as células de Schwann, são capazes de secretar MMP-9. A secreção desta MMP é importante para gerar o remodelamento da matriz extracelular (MEC) que acompanha a destruição de débris de axônios e mielina, e assim permitindo o crescimento axonal. Além disso, a ação das MMPs é capaz de liberar as células de Schwann das suas conexões com a membrana basal, permitindo sua proliferação e estimulação das terminações axonais (LA FLEUR et al., 1996).

Apesar do aumento da atividade da MMP-9 ser desejada em uma fase inicial da degeneração nervosa, a manutenção de seus níveis elevados pode ser prejudicial para a integridade tecidual. Beuche e colaboradores (2000) observaram um aumento de níveis séricos da MMP-9 em pacientes com esclerose lateral amiotrófica, possivelmente causado por nervos em degeneração e músculos desnervados. Ratos MMP-9-knockout que foram submetidos a uma lesão medular apresentaram uma recuperação acelerada da função motora comparados a animais não transgênicos (NOBLE et al, 2002). Juntos estes resultados indicam que a regulação negativa da MMP-9, pode ser um aspecto positivo durante fases finais do reparo neural.

Ainda neste contexto, a produção de componentes da MEC como laminina, fibronectina e colágeno tipo IV pelas células de Schwann, é importante para auxiliar o crescimento axonal durante o processo regenerativo, pois formam uma espécie de rede para a passagem do cone de crescimento. Contudo, outros componentes da MEC como as proteoglicanas sulfato de condroitina (CSPG), são capazes de inibir este processo (GANTUS et al, 2006).

Estudos prévios mostraram que, durante o processo de degeneração walleriana, o aumento da atividade da MMP-2 no nervo é capaz de reorganizar a lâmina basal via degradação de seu principal componente, o colágeno tipo IV, permitindo o avanço do cone de crescimento axonal (LA FLEUR et al, 1996). Além disso, já está bem descrito na literatura que a MMP-2 degrada proteoglicanas que inibem o processo de crescimento axonal como o sulfato de condroitina (GANTUS et al, 2006). Deste modo, o aumento da atividade da MMP-2 poderia ser um indicativo positivo do processo de degeneração/regeneração dos axônios.

Portanto, nossos resultados corroboram com tais achados, pois uma vez que grupos que apresentaram AST das fibras musculares iguais aos normais, e que apresentaram maior AST da bainha de mielina possuíam uma menor atividade de MMP-9 e maior de atividade de MMP-2 no nervo. Também é necessário destacar que estas MMPs são sistematicamente reguladas pelos inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMP), controlando o processo e protegendo a estrutura da lâmina basal (LA FLEUR et al, 1996). Estudos futuros para investigar o papel do laser sobre as MMPs no tecido nervoso e muscular, devem também considerar os TIMPs.

Em relação ao músculo esquelético desnervado, o papel das MMPs nestas situações ainda não está definido. Alguns estudos mostraram que o aumento da atividade da MMP-2 em músculos após 28 dias de desnervação pode estar relacionado com a atrofia muscular e a proliferação de tecido conjuntivo ao redor das fibras musculares (RUSSO et al., 2008), mas também com a abertura de canais para a reinervação das fibras desnervadas. Contudo, outros estudos mostram que o aumento da atividade da MMP-2 pode estar relacionado com ciclos de degeneração/regeneração das fibras musculares. Deste modo, a diminuição da atividade da MMP-2 nos músculos dos grupos irradiados com laser 660 nm, pode ter sido benéfica para o tecido muscular, pois poderia haver menos lesão.

Estudos futuros deveriam avaliar os tecidos musculares e nervosos em diferentes períodos de tempo, para investigar o comportamento destas MMPs e assim confirmar estas hipóteses aqui geradas.

Todos os animais experimentais que foram esmagados recuperam sua função normal ao final do experimento. Tal resposta já era esperada pelo tipo de lesão de esmagamento no nervo ciático do rato. Varejão e colaboradores (2004) usaram nosso mesmo protocolo de lesão de esmagamento no nervo ciático do rato, constataram que 4 semanas pós-lesão ocorreu recuperação de cerca de 80% da função, e que na 8^o semana a recuperação motora dos animais era total. Portanto, no presente estudo a lesão no nervo ciático do rato (VAREJÃO et al., 2004) foi realizada mediante uma pinça com pressão padronizada (BEER, 2001). Esse é o modelo mais estudado na literatura (ROCHKIND et al 1987a;1987b; HAMILTON, KEVEN & RAY, 1992; ANDERS et al. 1993; KHULLAR et al.,1995; BAGIS et al.,2003; SHIN et al., 2003) por ser uma cirurgia rápida e por conseguir estudar os efeitos iniciais da recuperação nervosa. Mesmo sendo uma lesão com prognóstico de recuperação rápido em modelo animal, em humanos o tempo de recuperação de uma lesão traumática do nervo pode se estender vários meses ou até anos, dependendo do grau de severidade e de extensão da lesão (ROCHKIND et al., 2007 a;b). Pensando na aplicabilidade clínica é necessário estudar

terapias que acelere a recuperação do nervo lesado evitando vários problemas, como por exemplo, o tempo de imobilização que causa atrofia muscular.

O laser foi eficaz em acelerar a regeneração do nervo pós-lesão severa em estudos que utilizaram comprimentos de onda similares e iguais aos aplicados no presente estudo (tab. 1) (ROCHKIND et al., 2007; MOHAMMED, AL-MUSTAWFI & KAKA., 2007; WU et al., 2009). Os resultados do nosso estudo, com lesão severa, ou seja, os neurotmesados, referente aos resultados da AST da bainha de mielina, foram todos iguais ao lesão TT. Com exceção no grupo TT660 120J que a bainha de mielina teve uma espessura igual ao normal. Os resultados da imunofluorescência não mostraram diferenças entre os grupos lesados. Em adição, é importante destacar que a AST da fibra dos músculos TA no grupo TT660 120J estava igual ao normal. Tais resultados reforçam a hipótese que o laser 660 nm na densidade de energia de 120 J/cm^2 foi mais efetivo, em comparação as demais doses, dentro dos grupos dos submetidos à neurotmeze.

Em relação ao músculo TA, é importante salientar que a AST das fibras musculares nos grupos TT660 60J e TT780 10J apresentou níveis normais. Não é possível excluir a hipótese que talvez o laser 780 nm com densidade de energia de 10 J/cm^2 possa exercer efeitos benéficos sobre a recuperação neuromuscular, pois níveis normais de AST das fibras musculares foram observados neste grupo. Achados interessantes em modelos animais e em humanos mostraram que o laser 780 nm é capaz de acelerar a regeneração nervosa periférica em lesões severas (ROCHKIND et al, 2007 a;b; ROCHKIND et al., 2009 a). Estudo em cultura de células neuronais de ratos estimuladas com o laser 780 nm, mostrou que esse comprimento de onda estimulou a migração de células neuronais, desenvolveu neurônios de maior calibre, com uma densa e ramificada rede de interligação de fibras nervosas (ROCHKIND et al.,2009 a). Parece que esse comprimento de onda também é eficaz em acelerar o prognóstico de recuperação em pacientes que sofreram lesões no nervo (ROCHKIND et al.,2007 a).

A resposta funcional dos grupos experimentais ao longo dos 84 dias de pós-neurorrafia término-terminal foi muito variável. Entretanto, ao observarmos o grupo TT660 120J a partir do vigésimo dia, ele se manteve com sua função melhor em comparação ao controle TT, até o sexagésimo primeiro dia pós-lesão. Ao comparar esse achado funcional aos resultados da AST do nervo e do músculo TA, nesse grupo TT660 120J, é possível sugerir que o laser possa ter estimulado a regeneração do nervo, evitado a atrofia muscular e conseqüentemente melhorado a função neuromuscular.

Relativo a atividade das MMPs no músculo do experimento término-terminal, o laser 660 nm 60 e 120 J/cm² e 780 nm 10 J/cm² pode ter exercido um efeito benéfico sobre o tecido muscular, pois diminuiu a atividade da MMP-2 e acelerou a recuperação da AST das fibras musculares. Uma limitação do nosso estudo foi a ausência da análise da atividade total das MMPs do nervo. Devido ao número de amostras, o tempo de realização do experimento e a quantidade do tecido nervoso optamos por usar os nervos ciáticos para as análises histológicas e morfométricas a fim de evitar grandes variabilidades na amostra. Deste modo, consideramos que estudos futuros usem mais animais por grupo para evitar tais problemas. Apesar disso, acreditamos que mesmo na ausência das análises da atividade das MMPs no nervo, investigações futuras poderão focalizar e identificar as MMPs e os componentes da matriz extracelular, como laminina e colágeno IV.

A neurotmeose, como já foi anteriormente descrito na introdução, tem um prognóstico de recuperação mais lento. De Sá e colaboradores (2004) viram que em oito semanas a função do nervo na reparação término-terminal era de 80% e para que seja absoluta o autor sugere ainda algumas semanas. Contudo, estudos futuros deveriam estudar tempos pós-lesão e pós-tratamento superiores a 84 dias, ou talvez fazer uma curva de tempo, principalmente para as doses do presente estudo que apresentaram respostas positivas.

O teste funcional utilizado em nosso estudo é muito difundido e utilizado, porque é de fácil execução, não invasivo e de baixo custo. Entretanto, a eficácia dos seus resultados é muito conflitante entre os cientistas. Alguns estudiosos aceitam o teste como uma boa ferramenta para avaliar o nervo ciático lesado, outros questionam sua acurácia, e sempre indicam testes mais precisos, como por exemplo, a vídeo análise (BEVAR, 2002; SARIKCIOGLU L, DEMIREL & UTUK et al., 2009, COSTA et al., 2009). Por mais que este teste funcional seja questionado, ele é uma análise adicional e que se observada em conjunto com outras análises, dá um respaldo á mais aos resultados dos tecidos analisados, dando uma visão global de como está à interação neuromuscular, assim como todo o segmento acometido.

Com um adequado protocolo de aplicação da irradiação a laser, com lesões nervosas periféricas padronizadas, este estudo trouxe dados importantes para o uso clínico, tanto no comprimento de onda, densidade de energia, quanto no melhor protocolo de aplicação para cada tipo de lesão no nervo (axoniotmeose ou neurotmeose).

Paralelamente aos resultados do presente estudo, chama a atenção para a necessidade de mais pesquisas sobre os efeitos da laserterapia na regeneração nervosa periférica, objetivando

uma definição mais clara sobre a parametrização, protocolos de irradiação do laser que sejam efetivos na promoção da recuperação nervosa pós-traumática.

6. CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo principal observar o efeito da laserterapia em seis protocolos de aplicação, em dois tipos de lesão do nervo ciático do rato. Ao observar os resultados em conjunto dos grupos que foram submetidos à axoniotmese é possível concluir que os protocolos de aplicação do laser 660nm 10, 60 e 120 J/cm² mostrou ser efetivo na recuperação do nervo esmagado, evitou a atrofia do músculo tibial anterior, e ajudou no remodelamento da matriz extracelular do músculo tibial e do nervo ciático.

Com base no objetivo proposto, podemos concluir que o grupo que foi submetido à neurotmese com o protocolo de aplicação do laser 660nm 120 J/cm² mostrou ser efetivo na recuperação do nervo, evitou a atrofia do músculo tibial anterior, ajudou no remodelamento da matriz extracelular no músculo e sua função foi melhor em relação ao não tratado em quase todo o experimento. Na lesão grave, os protocolos de aplicação do laser 660nm 60, 120 J/cm² e 780nm 10 J/cm² exerceu um efeito benéfico no músculo tibial anterior, pois acelerou a área de secção transversa das fibras e ajudou no remodelamento da matriz extracelular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHTIKOSKI, A M TUOMINEN H, KORPELAINEN JT, TAKALA TE, OIKARINEN A. Collagen Synthesis and degradation in polyneuropathy and myopathies. **Muscle Nerve**. 30 (5):602-82, Nov 2004.
- AMAT A, RIGAU J, WAYNANT RW, ILEV IK, TOMAS J, ANDERS JJ. Modification of the intrinsic fluorescence and the biochemical behavior of ATP after irradiation with visible and near-infrared laser light. **J Photochem Photobiol B**.81(1):26-32, 3 Out 2005.
- ANDERS JJ, GEUNA S, ROCHKIND S. Phototherapy Promotes Regeneration and Functional Recovery of Injured Peripheral Nerve. **Neurol Res**. 26:233-239, 2004.
- ANDERS JJ, BORKE RC, WOOLERY SK, VAN DE MERWE WP. Low Power Laser Irradiation Alters The Rate of Regeneration of The Rat Facial Nerve. **Lasers Surg Med**. 13:72– 82,1993.
- AZZE R J, MATTAR Jr. R. **Lesões dos Nervos Periféricos**. In: Pardini Jr. AG, editor. Traumatismos da mão. 3ª ed., Rio de Janeiro, Meds, 2000.
- BAGIS S, COMELEKOGLU U, COSKUN B, MILCAN A, BUYUKAKILLI B, SAHIN G, OZISIK S, ERDOGAN C. No Effect of GA-AS (904 nm) Laser Irradiation on the Intact Skin of the Injured Rat Sciatic Nerve. **Lasers Med Sci**.18:83– 88, 2003.
- BAIN JR, MACKINNON SE, HUNTER DA. Functional Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat. **Plast Reconstr Surg**. 83:129-138, 1989.
- BEER GM, STEURER J, MEYER VE. Standardizing Nerve Crushes with a Non-Serrated Clamp. **J Reconstr Microsurg** .17:531-534, 2001.
- BERVAR M. An alternative video footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. **Acta Chir Plast**. 44(3):86-9, 2002.
- BEUCHE W, YUSHCHENKO M, MÄDER M, MALISZEWASKA M, FELGENHAUER K, WEBER F. Matrix metalloproteinase-9 is elevated in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Neuroreport**.11:3419-3422, 2000.
- BILLINGTON L.; CARLSON B. M. The recovery of Long-Term Denervated rat muscles after Machine Treatment and Grafting. **J neurol Sci**. 144:147-155, 1996.
- CAVANAGH, J. B, WELLER, R. O. Peripheral Nervous system. **Nervous System, Muscle and Eyes**. London: Churchil Livingstone, 3. ed., v.4, cap. 11, p. 533-543,1990.
- CARMELI E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**. 29:191–197, 2004.
- CHEN YS, HSU SF, CHIU CW, LIN JG, CHEN CT, YAO CH. Effect of Low-Power Pulsed Laser on Peripheral Nerve Regeneration in Rats. **Microsurgery**. 25:83– 89, 2005.

C.I. PLATT, C .A. KREKOSKI, R.V. WARD, D.R. EDWARDS, J. GAVRILOVIC. Extracellular Matrix and Matrix Metalloproteinases in Sciatic Nerve. **Journal of Neuroscience Research**. 74:417–429, 2003.

COSTA LM, SIMÕES MJ, MAURÍCIO AC, VAREJÃO AS. Chapter 7: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part IV-kinematic gait analysis to quantify peripheral nerve regeneration in the rat. **Int Rev Neurobiol.**;87:127-39, 2009.

CLEUTJENS JP, VERLUYTEN MJ, SMITHS JF, DAEMEN MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. **Am J Pathol.** 147(2):325-38, Ago 1995.

CRISCI A R., FERREIRA L F. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Accelerates the Regeneration of the Sciatic Nerve after Neurotomy in Rats. **Ultrasound in Med. & Biol.** 28 (10):1335-1341, 2002.

DE SÁ JMR, MAZZER N, B CH, BARREIRA AA. The End-To-Side Peripheral Nerve Repair Functional and Morphometric Study Using the Peroneal Nerve of Rats. **Journal of Neuroscience Methods**. 1–9, 2004

DOW DE, CEDERNA PS, HASSETT CA, KOSTROMINOVA TY, FAULKNER JA, DENNIS RG. Number of Contractions to Maintain Mass and for of a Denervated Rat Muscle. **Muscle Nerve**. 30:77-86, 2004.

DEMESTRE M, ORTH M, WELLS GM, GEARING A J, HUGHES RA, GREGSON NA. Characterization of matrix metalloproteinases in denervated muscle. **Neuropathol Appl Neurobiol**. 31:545-555, 2005.

EHRLICHER A, BETZ T, STUHRMANN B, KOCH D, MILNER V, RAIZEN MG, KAS J. Guiding neuronal growth with light. **Proc Natl Acad Sci USA**. 99:16024–16028, 2002.

EVANS, G. R. Challenges to Nerve Regeneration. **Semin Surg Oncol**. 19:312-318, 2000.

EVANS, G. R. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. **The Anatomical Record**. 263:396-404, 2001.

GAGLIARDI S, ATLANTE A, PASSARELLA S. A Novel Property Of Adenine Nucleotides: Sensitivity To Helium-Neon Laser In Mitochondrial Reactions. **Biochem Mol Biol Int**.41:449–460, 1997.

GANTUS M A V, NASCIUTTI L E, CRUZ C M, PERSECHINI P M, MARTINEZ A M B. Modulation of extracellular matrix components by metalloproteinases and their tissue inhibitors during degeneration and regeneration of rat sural nerve. **Brain Res**.1122:36-46, 2006.

GEUNA S., GIGO-BENATO D., DE CASTRO R A. On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibers. **Microsurgery**. 24:72-76, 2004.

GEUNA S, RAIMONDO S, NICOLINO S, BOUX E, FORNARO M, TOS P, BATTISTON B, PERROTEAU I. Schwann-cell proliferation in muscle-vein combined conduits for

bridging rat sciatic nerve defects. **J Reconstr Microsurg.** (2):119-23; discussion 124, 19Fev 2003.

GIGO-BENATO D, GEUNA S, DE CASTRO R A, TOS P, FORNARO M, BOUX E, BATTISTON B, GIACOBINI-ROBECCHI M G. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. **Lasers Med Sci.** 19(1):57-65, 30 Jul, 2004.

GIGO-BENATO D, GEUNA S, ROCHKIND S. Phototherapy for enhancing Peripheral Nerve Repair: A Review of the Literature. **Muscle Nerve.** 31:694-701, 2005.

HAMILTON G F, KEVEN R T, RAY R H. The Effects Of Helium-Neon Laser Upon Regeneration Of The crushed Peroneal Nerve. **J Orthop Sports Phys Therapy.** 15:209 –214, 1992.

HEINE W, CONANT K, GRIFFIN JW, HÖKE A. Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically denervated peripheral nerves. **Exp Neurol.** 189(2):231-40, Out 2004.

SIEBERT H, DIPPEL N, MA M , WEBER F, WOLFGANG B C K. Matrix Metalloproteinase Expression and Inhibition After Sciatic Nerve Axotomy. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.** 60 (1): 85-86, Jan 2001.

ISHIDO M.; KAMI K.; MITSUHIKO M. In vivo Expression Patterns of MyoD, P21 and Rb Proteins in Myonuclei and Satellite Cells of Denervated Rat Skeletal Muscle. **Am J Physiol Cell Physiol.** 287:C484-C493, 2004.

JOHNSON TS, O'NEILL AC, MOTARJEM PM, AMANN C, NGUYEN T, RANDOLPH MA, WINOGRAD JM, KOICHEVAR IE, REDMOND RW. Photochemical tissue bonding: a promising technique for peripheral nerve repair. **J Surg Res.** 143(2):224-9, Dez 2007.

KHERIF S, Dehaupas M, Lafuma C, Fardeau M, Alameddine HS. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve. **Neuropathol Appl Neurobiol.** 24:309 –319,1998.

KHULLAR SM, BRODIN P, MESSELT EB, HAANAES HR. The Effects of Low Level Laser Treatment on Recovery of Nerve Conduction and Motor Function After Compression Injury in the Rat Sciatic Nerve. **Eur J Oral Sci.** 103:299 –305, 1995.

KOSKINEN SO, KJAER M, MOHR T, SØRENSEN FB, SUURONEN T, TAKALA TE. Type IV collagen and its degradation in paralyzed human muscle: effect of functional electrical stimulation. **Muscle Nerve.** 23:580 –589, 2000.

KOSTROMINOVA, T.Y. et al. Comparison of Gene Expression of Two-Month Denervated, Two-Month Stimulated-Denervated and Control Rat Skeletal Muscles. **Physiol Genomics.** 22:227-243, 2005.

KOUYOUMDJIAN, J. A. Peripheral Nerve Injuries: A Retrospective Survey of 456 Cases. **Muscle Nerve.** 34: 785–788, 2006.

KREISLER M, CHRISTOFFERS A B, WILLERSHAUSEN B, D'HOEDT B. Effect Of Low-Level GaAlAs Laser Irradiation On The Proliferation Rate Of Human Periodontal Ligament Fibroblasts: An In Vitro Study. **J Clin Periodontol**. 30:353–358, 2003.

LA FLEUR M, Underwood JL, Rappolee DA, Werb Z. Basementmembrane and repair of injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. **J Exp Med**. 184:2311–2326, 1996.

LEUNG MC, LO SC, SIU FK, SO KF. Treatment Of Experimentally Induced Transient Cerebral Ischemia With Low Energy Laser Inhibits Nitric Oxide Synthase Activity And Up-Regulates The Expression Of Transforming Growth Factor-Beta1. **Lasers Surg Med**. 31:283–288, 2002.

LIEBER R. **Skeletal Muscle Structural, Function, & Plasticity**. Lippincott Williams & Wilkins. 2nd edition, Philadelphia, 2002.

LUCAS C, CRIENS-POUBLON L J, COCKRELL C T, DE HAAN R J. Wound Healing in Cell Studies and Animal Model Experiments by Low Level Laser Therapy; Were Clinical Studies Justified? A Systematic Review. **Lasers Med Sci**. 17:110–134, 2002.

LUNDBORG G. A 25-Year Perspective of Peripheral Nerve Surgery: Evolving Neuroscientific Concepts and Clinical Significance. **J Hand Surg**. 25:391–414, 2000.

MILORO M, HALKIAS LE, MALLERY S, TRAVERS S, RASHID RG. Low Level Laser Effect On Neural Regeneration In Gore-Tex Tubes. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 93: 27–34, 2002.

MILLESSE H. Techniques for Nerve Grafting. **Hand Clinics** 16: 73-91, 2000.

MOHAMMED I F, AL-MUSTAWFI N, KAKA L N. Promotion of regenerative processes in injured peripheral nerve induced by low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg**. 25(2):107-11, 2007.

NOBLE L J, DONOVAN F, IGARASHI T, GOUSSEV S, WERB Z. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. **J Neurosci**. 22:7526-35, 2002.

O'NEILL A C, RANDOLPH M A, BUJOLD K E, KOCHEVAR I E, REDMOND R W, WINOGRAD J M. Photochemical sealing improves outcome following peripheral neurotomy. **J Surg Res**. 151(1):33-9. Mar 5, 2009.

OH S J. **Color atlas of nerve biopsy pathology**. Library of Congress. Washington DC. 2001 p.10-30

ROCHKIND S, BARR-NEA L, RAZON N, BARTAL A, SCHWARTZ M. Stimulatory Effect Of He-Ne Low Dose Laser On Injured Sciatic Nerves of Rats. **Neurosurgery**. 20:843–847, 1987a.

ROCHKIND S, BARR-NEA L, VOLGER I. Spinal Cord Response to Laser Treatment of Injured Peripheral Nerve. **Spine**. 15:6–10, 1990.

ROCHKIND S, EL-ANI D, NEVO Z, SHAHAR A. Increase of Neuronal Sprouting and Migration Using 780nm Laser Phototherapy as Procedure for Cell Therapy. **Lasers in Surgery and Medicine** .41:277–281, 2009. **a**

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**.25(5):436-42, Oct. 2007.a

ROCHKIND S, GEUNA S, SHAINBERG A. Chapter 25 phototherapy in peripheral nerve injury effects on muscle preservation and nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol*. 87:445-64, 2009.**b**

ROCHKIND S, LEIDER-TREJO L, NISSAN M, SHAMIR MH, 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**. 25(3):137-43, Jun 2007.b

ROCHKIND S, NISSAN M, RAZON N, SCHWARTZ M, BARTAL A. Electrophysiological Effect of HeNe Laser On Normal And Injured Sciatic Nerve in The Rat. **Acta Neurochir**. 83:125–30, 1986.

ROCHKIND S, NISSAN M, BARR-NEA L, RAZON N, SCHWARTZ M, BARTAL A. Response of Peripheral Nerve To He-Ne Laser: Experimental Studies. **Lasers Surg Med**.7:441– 443, 1987b.

ROCHKIND S, NISSAN M, LUBART R, AVRAM J, BARTAL A. The In-Vivo Nerve Response to Direct Low-Energy-Laser Irradiation. **Acta Neurochir** .94:74 –77, 1988.

ROCHKIND S, NISSAN M, ALON M, SHAMIR M, SALAME K. Effects of Laser Irradiation on the Spinal Cord for The Regeneration of Crushed Peripheral Nerve in Rats. **Lasers Surg Med**. 28: 216–219, 2001.

ROCHKIND S, OUAKNINE G E. New Trend in Neuroscience: Low-Power Laser Effect on Peripheral and Central Nervous System (Basic Science, Preclinical and Clinical Studies). **Neurol Res**. 14:2-11, 1992.

ROCHKIND S, ROUSSO M, NISSAN M, VILLARREAL M, BARR-NEA L, REES D G. Systemic Effects Of Low-Power Laser Irradiation on The Peripheral and Central Nervous System, Cutaneous Wounds, and Burns. **LasersSurgMed**. 9:174–182, 1989.

ROCHKIND S. Stimulation Effect of Laser Energy on the Regeneration of Traumatically Injured Peripheral Nerves. **Morphogen Regen**.83:25–27, 1978.

ROCHKIND S. Phototherapy in peripheral nerve injury for muscle preservation and nerve regeneration. **Photomed Laser Surg**. 27(2):219-20, Apr 2009**c**

RUSSO T L, PEVIANI S M, DURIGAN J L, SALVINI T F. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. **Muscle Nerve**. 37(5):593-600, May 2008.

SARIKCIOGLU L, DEMIREL B M, UTUK A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. **Folia Morphol (Warsz)**. 68(1):1-7, Fev 2009.

SCHOSER BG, BLOTTNER D. Matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-7 and MMP-9 in denervated human muscle. **Neuroreport**. 10:2795-2797, 1999.

SCHOSER B G, BLOTTNER D, STUERENBURG H J. Matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies: enhanced immunoreactivity near atrophic myofibers. **Acta Neurol Scand**.105:309–313, 2002.

SEDDON H. Three Types of Nerve Injury. **Brain**. 66: 227-288, 1943.

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**. 344:71–74, 2003.

SNYDER S K, BYRNES K R, BORKE R C, SANCHEZ A, ANDERS J J. Quantification of Calcitonin Gene-Related Peptide mRNA and Neuronal Cell Death in Facial Motor Nuclei Following Axotomy and 633 nm Low Power Laser Treatment. **Lasers Surg Med**. 31: 216 – 222, 2002.

SHAMIR M H, ROCHKIND S, SANDBANK J, ALON M. Double-Blind Randomized Study Evaluating Regeneration of the Rat Transected Sciatic Nerve After Suturing and Postoperative Low Power Laser Treatment. **J Reconstr Microsurg**.17:133– 137, 2001.

SHUBAYEV V I, MYERS R R. Upregulation and interaction of TNFalpha and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. **Brain Res**. 855:83– 89, 2000.

SUNDERLAND S. **Nerves and nerve injuries**. Churchill Livingstone, New York, 1978.

TURNER J, Hode L. **Laser Therapy: Clinical Practice and Scientific Background**. Prima Books Grängesberg, Sweden: p380–434, 2003.

VAN BREUGEL H H, Bar P R. He-Ne Laser Irradiation Affects Proliferation of Cultured Rat Schwann Cells in a Dose-Dependent Manner. **J Neurocytol** .22:185–190, 1993.

VAREJÃO A S, CABRITA A M, MEEK M F, BULAS-CRUZ J, MELO-PINTO P, RAIMONDO S, GEUNA S, GIACOBINI-ROBECCHI MG. Functional and Morphological Assessment of a Standardized Rat Sciatic Nerve Crush Injury with a non-Serrated Clamp. **J Neurotrauma**. 21:1652-1670, 2004.

WOLLMAN Y, ROCHKIND S, SIMANTOV R. Low Power Laser Irradiation Enhances Migration and Neurite Sprouting of Cultured Rat Embryonic Brain Cells. **Neurol Res**.18:467– 470, 1996.

WELLS J, KAO C, KONRAD P, MILNER T, KIM J, MAHADEVAN-JANSEN A, JANSEN ED. Biophysical mechanisms of transient optical stimulation of peripheral nerve. **Biophys J**. Oct 1;93(7):2567-80. May 25, 2007

WU X, DMITRIEV AE, CARDOSO MJ, VIERS-COSTELLO AG, BORKE RC, STREETER J, ANDERS JJ. 810 nm Wavelength light: an effective therapy for transected or contused rat spinal cord. **Lasers. Surg Med.** 41(1):36-41, Jan, 2009.

WU WH, PONNUDURAI R, KATZ J, POTT CB, CHILCOAT R, UNCINI A, et al. Failure to confirm Report Of Light-Evoked Response of Peripheral Nerve to Low Power Helium-Neon Laser Light Stimulus. **Brain Res.** 401:407– 408,1987.

ANEXO 1

ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO

ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO

No período de vigência do doutorado tive apoio financeiro da CAPES (2 meses) e FAPESP (34 meses).

Durante o período do doutorado, além do trabalho apresentado, estive envolvida em alguns projetos de pesquisa e outras atividades no exterior, as quais foram importantes para a minha formação acadêmica.

Participação de projetos de pesquisa:

No doutorado, algumas análises e submissões pendentes do mestrado, foram realizadas. Ainda no mestrado foi dado início a três artigos científicos. Dois eram meus trabalhos de mestrado, o outro foi colaboração com um trabalho de doutorado de Tiago L. de Russo. Um dos artigos foi seu tema de Doutorado já foi publicado:

Russo, TL; Peviani, SM; Freria, CM; Gigo-Benato, D; Geuna, S; Salvini, TF. Electrical Stimulation Based On Chronaxie Reduces Atrogin-1 And Myod Gene Expressions In Denervated Muscle Of Rat. Muscle Nerve. 35: 87–97, 2007.

Um dos meus dois trabalhos de Mestrado foi aceito para publicação. No doutorado, análises complementares foram realizadas no músculo, em parceria com o Laboratório de Plasticidade Muscular, com colaboração do Dr. Thiago L. de Russo, e Dra. Tania de Fátima Salvini.

Trabalho em publicação:

Davilene Gigo-Benato, Thiago Luiz Russo, Stefano Geuna, Natalia Rezende Santa Rosa Domingues, Tania Fátima Salvini, Nivaldo Antonio Parizotto. Electrical stimulation impairs early functional recovery and accentuates skeletal muscle atrophy after sciatic nerve crush injury in rat. Muscle Nerve. Para impressão.

No doutorado ainda me dediquei juntamente com os colaboradores, para a publicação do artigo que está submetido, intitulado:

The 830nm lasertherapy effects on early rat sciatic nerve recovery after crush injury. Gigo-Benato, D; Geuna, S; Russo, TL; Cillo, G; Gonçalves, H; Raimondo, S; Salvini, TF; Giacobini-Robecchi, MG; Parizotto, NA. Submitted to: Photomedicine and Laser Surgery.

As análises dos nervos, desses três trabalhos, eu fiz em parceria com o Laboratório de Anatomia, no *Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, della Università di Torino*, na Itália, ainda quando eu estava no mestrado.

No doutorado, participei também de um artigo já aceito a publicação, o qual realizei as análises dos nervos, em parceria com o Laboratório de Plasticidade Muscular, com colaboração do Dr. Thiago L. de Russo, e Dra. Tania de Fátima Salvini.

Trabalho em publicação:

Thiago Russo; Sabrina M Peviani, João L Durigan, Davilene Gigo-Benato, Gabriel B Delfino; Tania F Salvini. Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogin-1 in denervated rat skeletal muscle. Journal of Muscle Research and Cell Motility. In press

Experiência Internacional no Período:

Curso de Verão na França:

No período de vigência da bolsa de doutorado da Fapesp, tive a oportunidade de participar de um curso de Verão de Miologia na França, no período de 17-26 de Junho de 2009. No Instituto de Miologia -*Hostital Pittie-Salpetriere-Paris-França*. Os temas abordados foram sempre na área de miopatologia e principalmente alterações neuromusculares em distúrbios genéticos. Os palestrantes eram especialistas nesse assunto de toda a Europa. Além de palestras participávamos de dinâmicas em grupo e atividades práticas.

Visita científica:

Visita científica no laboratório da Profa. Juanita J. Anders, no, *Department of Anatomy, Physiology, and Genetics. Uniformed Services University of the Health Sciences, Maryland EUA. 14-19 Dezembro de 2009.*

A Profa. Juanita J. Anders, é umas das pessoas mais conceituadas na área de laser na regeneração nervosa tanto periférica, quanto central. Ela é editora de várias revistas consagradas na área de laser.

Quando estive em seu laboratório, pude aprender e participar de uma parte experimental, de cultura de células de schwann irradiadas com laser de baixa intensidade. Além de discutirmos os resultados da minha tese. A professora contribuiu muito para o enriquecimento científico do presente estudo. Colaborações futuras já estão sendo planejadas.

ANEXO 2

ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO_ 2010



Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Lasers in Surgery & Medicine*.

Manuscript ID: LSM-10-0054

Title: Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve.

Authors: Gigo-Benato, Davilene
Russo, Thiago
Tanaka, Erika
Assis, Livia
Salvini, Tania
Parizotto, Nivaldo

Date Submitted: 21-Feb-2010

 [Print](#)  [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.2.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)



Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve.

Journal:	<i>Lasers in Surgery & Medicine</i>
Manuscript ID:	LSM-10-0054
Wiley - Manuscript type:	Basic Research
Date Submitted by the Author:	21-Feb-2010
Complete List of Authors:	Gigo-Benato, Davilene; Federal University of São Carlos, Department of Physiotherapy Russo, Thiago; Federal University of São Carlos, Physical Therapy Tanaka, Erika; Federal University of São Carlos, Department of Physiotherapy Assis, Livia; Federal University of Sao Carlos, Physiotherapy Department Salvini, Tania; Federal University of São Carlos, Department of Physiotherapy Parizotto, Nivaldo; Federal University of São Carlos, Department of Physiotherapy
Key Words:	peripheral nerve repair, lasertherapy, denervated muscle, rehabilitation, functional analysis



1
2
3 **Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after**
4 **crush injury in rat sciatic nerve.**
5
6
7
8
9

10 Davilene Gigo-Benato¹, PhD, Thiago Luiz Russo², PhD, Erika Harumi Tanaka¹, Livia
11 Ribeiro Assis¹, MD, Tania Fátima Salvini², PhD, Nivaldo Antonio Parizotto¹, PhD.
12
13
14
15
16

17 ¹Unity of Thermophototherapy, Department of Physiotherapy, Federal University of
18 São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, zip code: 13565-905, Brazil (DGB, EHT, LRA
19 and NAP).
20
21
22
23

24 ²Unity of Skeletal Muscle Plasticity, Department of Physiotherapy, Federal University
25 of São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, zip code: 13565-905, Brazil (TLR and TFS).
26
27
28
29
30
31

32 **Acknowledgements:** This work was supported by grants of the FAPESP (Fundação de
33 Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, process numbers: 2006/52931-4 and
34 08/03499-8).
35
36
37
38
39
40

41 **Corresponding author:** Davilene Gigo Benato; Department of Physiotherapy, Federal
42 University of São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luís km 235, C.P. 676 –
43 CEP: 13565-905 São Carlos, SP, Brazil; Telephone: 00 55 16 33518345 FAX: 00 55 16
44 33612081; E-mail: benatodavilene@yahoo.com.br
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Key Words:

Peripheral nerve repair, lasertherapy, denervated muscle, rehabilitation, functional analysis.

For Peer Review

Abstract

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Posttraumatic nerve repair is still a challenge for rehabilitation. Although surgical techniques have made enormous progresses over the years, the functional recovery after nerve injury is often incomplete and sometimes frankly unsatisfactory. It is thus particularly important to find out clinical protocols to enhance nerve regeneration. The present study investigated the effects of 660 and 780 nm LLLT using different energy densities (10, 60 and 120 J/cm²) on neuromuscular and functional recovery as well as on matrix metalloproteinases (MMPs) activity after crush injury in rat sciatic nerve. MATERIALS AND METHODS: Rats received LLLT irradiation transcutaneously at the lesion site for 10 consecutive days post-injury and then sacrificed 28 days after injury. Both sciatic nerves and tibialis anterior (TA) muscles were analyzed. Nerve analyses consisted of histology (light microscopy) and myelin, axon and nerve fiber cross-sectional area (CSA) measurements. The S-100 labeling was used to identify myelin sheath and Schwann cells. Muscle fiber CSA and zymography were carried out to assess the degree of muscle atrophy and MMPs activities respectively. Statistical significance was set at 5% ($P \leq 0.05$). RESULTS: 660 nm LLLT either using 10 or 60 J/cm² recovered muscle fiber, myelin and nerve fiber CSA compared to normal values. Furthermore, it increased MMP-2 activity in nerve and decreased MMP-2 and -9 activities in muscles and nerves respectively. Functional recovery in irradiated groups did not differ from crushed non irradiated group. CONCLUSIONS: Data suggest that 660 nm LLLT with low (10 J/cm²) or moderate (60 J/cm²) energy densities is able to accelerate neuromuscular recovery after crush nerve injury in rat.

INTRODUCTION

Peripheral nerve injury is a common clinical event which is generally related to incapacity [1, 1]. According to a U.S. study, 50,000 subjects suffer traumatic injuries of peripheral nerves every year [3, 4] representing a significant public health problem. In Brazil, a recent study classified 456 cases of nerve injuries and showed that axonotmesis represents the most common nerve injury (45%) followed by neurotmesis (41%) and neuropraxia (14%) respectively [5].

The mechanisms involving nerve regeneration are well described. When nerve fiber continuity is interrupted, the distal stump undergoes Wallerian degeneration [6]. The proximal axon stump can then regenerate along the nerve tract distal to the lesion and reach the peripheral target (muscle fibers and sensory receptors) [6].

Another tissue strongly affected by peripheral nerve injuries is skeletal muscle. Innervation is critical for muscle functionality and structural integrity [7, 8]. Thus, denervation leads to a profound loss of muscle mass and inability to generate force [9, 10].

The coordination of regeneration process depends of numerous modifications of extracellular matrix (ECM) [11] occurring concomitantly in both injured nerve and denervated muscles [12-14]. These changes require the action of proteolytic zinc-containing enzymes called matrix metalloproteinases (MMPs), which play a critical role in the ECM reorganization. MMPs are secreted by Schwann cells, intramuscular axons, muscle satellite cells and fibroblasts into skeletal muscle at the neuromuscular junction (NMJ) and around muscle fibers [12, 15-17].

Nevertheless, only a few studies have investigated the MMPs in neuromuscular diseases [12, 13, 15, 18-20]. Studies of nerve crush injury suggest that MMP-2 and MMP-9 are involved in facilitating axonal growth along the peripheral nerve via basal lamina

1
2
3 remodeling [13, 14]. Thus, MMP activity can be considered as a good marker to
4
5 investigate peripheral nerve recovery.
6

7
8 Low-level laser therapy (LLLT) seems to be a very efficient technique in peripheral
9
10 nerve recovery and its effectiveness has been found over the years. A critical review of
11
12 the literature [1] showed that more than 80% of the experimental studies carried out so
13
14 far on the use of LLLT for promoting peripheral nerve repair, led to a positive outcome
15
16 on posttraumatic/postoperative nerve recovery, thus pointing to this physiotherapy tool
17
18 as a very promising clinical approach for patients who suffered a nerve lesion.
19

20
21 On the other hand there are conflicting results on the use of LLLT. These results may be
22
23 due to technical variables lists (in particular wavelength, doses and types of radiation)
24
25 which if not properly adjusted may reduce the success of any therapeutic procedure [1,
26
27 21]. Following the need to establish clinical protocols for the application of LLLT, this
28
29 study intends to continue to deepen the analysis of this therapy on the peripheral nerve,
30
31 focusing particular attention on the choice and combination of the LLLT wavelength
32
33 (660nm and 780nm) and the parameters of irradiation (10, 60 and 120 J/cm²) on the
34
35 MMP activity response and neuromuscular recovery after sciatic nerve crush in rats.
36
37 The results of this study bring important aspects in the prospects for application in
38
39 patients in the future.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIALS AND METHODS

Crush Injury

Wistar adult (275 g) (*Rattus norvegicus*) male rats were used in this study. Good laboratory animal practice was observed according to the international standards for animal experimentation and following approval by our local Institution's Animal Care and Ethics Committee. The animals were anaesthetised with an intraperitoneal injection of a premixed solution containing ketamine (95 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg). The skin was shaved and cleaned with 10% povidone iodine. A 2-cm-long incision was made on the skin through a gluteal approach and the left sciatic nerve was exposed. A non-serrated clamp, exerting a force of 54 N [22, 23], was used for a period of 30 seconds to create a 3-mm-long crush injury, 10 mm above the bifurcation, in order to get a good reproducibility of the axonotmetic lesion [23]. The starting diameter of the sciatic nerve was about 1 mm, during the crush the nerve flattens to a new diameter of 2 mm, giving a final pressure of $p = 9$ MPa. The nerves were kept moist with 37°C sterile saline solution throughout the surgical intervention. After surgery, animals were housed in single cages and fed rat chow and water ad libitum. For the first four days, acetaminophen (13,5 mg/100 ml) was added to water for pain reduction.

LLLT Protocol and Experimental Design

Biostimulation was carried on using a gallium–aluminium–arsenide laser device (TWIN LASER, MM Optics, São Carlos, SP, Brazil) with following parameters: continuous radiation, wavelength: 660 or 780 nm, power: 40 mW, spot area: 4 mm², energy density at the point of entry: 10, 60 or 120 J/cm². The time of stimulation was pre determinate by the device following the parameters above described. All parameters are described in detail on Table 1.

1
2
3 The radiation was applied transcutaneously at skin contact, after shaving the skin, on the
4 site of surgery (recognizable for the presence of the surgical scar) at two points
5 following the sciatic nerve trajectory, one above and one below the scar site
6 considering two inches away from them. Applications were made daily for 10
7 consecutive days beginning on the 1st day after surgery. The animals were gently
8 handling. Laser biostimulation did not produce any painful sensation and distress to the
9 animals.
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 The animals were randomly divided into eight groups (n: 8): (1) normal (N), in which
20 the animals received no intervention and remained free in the cage for 28 days; (2)
21 Crush (CR), in which the animals were submitted the crush injury and received the
22 simulation treatment (placebo); (3) crushed nerve irradiated with LLLT 660nm 10J/cm²
23 (CR660 10J); (4) crushed nerve irradiated with LLLT 660nm 60J/cm² (CR660 60J); (5)
24 crushed nerve irradiated with LLLT 660nm 120J/cm² (CR660 120J); (6) crushed nerve
25 irradiated with LLLT 780nm 10J/cm² (CR780 10J); (7) crushed nerve irradiated with
26 LLLT 780nm 60J/cm² (CR780 60J); (8) crushed nerve irradiated with LLLT 780nm
27 120J/cm² (CR780 120J). The experimental groups and the LLLT parameters are
28 described on Table 1.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **The assessment of nerve functional recovery**

49 The assessment of nerve function recovery was carried out by calculating the sciatic
50 functional index (SFI) as described by Bain and cols [24]. Animals were tested in a
51 confined walkway measuring 42-cm-long and 8.2-cm-wide, with a dark shelter at the
52 end. A white paper was placed on the floor of the rat walking corridor. The hind paws
53 of the rats were pressed down onto a finger paint-soaked sponge, and they were then
54 allowed to walk down the corridor leaving its hind footprints on the paper. Three
55
56
57
58
59
60

1
2
3 measurements were taken from the footprints: (1) the print length (PL), i.e. the distance
4 from the heel to the third toe; (2) the toe spread (TS), i.e. distance from the first to the
5 fifth toe; and (3) the intermediary toe spread (ITS), i.e. distance from the second to the
6 fourth toe. All three measurements were taken from the experimental (E) and normal
7 (N) sides. The SFI was calculated according to the following equation:
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

$$SFI = -38.3 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13.3 \left(\frac{EITS - NITS}{NITS} \right) - 8.8$$

18
19
20
21
22
23

24 **Muscle and nerve evaluation**

25
26 Twenty-eighth days after surgery, all animals were euthanized with anesthetic overdose.
27
28 The right sciatic nerves and the right muscles tibialis anterior (TA) were carefully
29 dissected to avoid mechanical injuries.
30
31

32
33 The muscles were then divided in half at the middle of the belly. The distal fragment
34 was used for the histological and morphometric measurements. The proximal fragment
35 was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (Forma Scientific,
36 Marietta, OH) for the zimography analysis.
37
38
39
40
41

42
43 Afterwards, the distal fragment was frozen in isopentane, previously frozen in liquid
44 nitrogen. Muscle samples were placed in plastic tubes and stored in freezer at -80°C .
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

1
2
3 Germany) equipped with a digital camera (AxioCam HRc, Carl Zeiss, Germany) and
4
5 the AxioVision 4.7 software (Carl Zeiss, Jena, Germany). A blind procedure was used
6
7 for measurements.
8
9

10 Four sciatic nerves were immediately frozen in liquid nitrogen at stored at -80°C for
11
12 zymography. The other four nerves were divided in half at the distal of the lesion. One
13
14 part were fixed in 10 % formalin for 3 h and then washed in phosphate buffer saline
15
16 (PBS) until embedding. The specimens were dehydrated and embedded in paraffin and
17
18 cut at 7 µm perpendicular to the main nerve axis. For immune-histochemistry, sections
19
20 were incubated overnight in a solution of anti-S100 (polyclonal, rabbit, which
21
22 recognizes the bovine 21 kD monomeric units of S-100 calcium-binding protein,
23
24 dilution 1:800, Sigma, St. Louis, MO). After washing in PBS, immunolabelling was
25
26 carried out by incubating sections for 1h in a solution containing secondary antibodies:
27
28 TRITC-conjugated anti-rabbit IgG (dilution 1:200, Dako, Milano, Italy). The sections
29
30 were finally mounted with a Dako fluorescent mounting medium and analyzed by a
31
32 fluorescence microscope (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with
33
34 appropriate filter. A magnification of 100x was used.
35
36
37
38
39

40 For specificity assessment we have also carried out a "morphology-based specificity
41
42 test", consisting of the same immunolabelling protocol to stain sections from normal
43
44 peripheral nerve where the protein is known to be present with a clear localization easily
45
46 detectable from a morphological viewpoint. This test supported the specificity of the
47
48 reagent by demonstrating that it specifically labels only the tissue elements where the
49
50 immunogen is known to be present.
51
52
53

54 The other part of the divided nerve were fixed by dripping (for 5 minutes) and then
55
56 immersion in a solution containing 2.5% purified glutaraldehyde and 0.5% saccharose in
57
58 0.1M Sorensen phosphate buffer (pH 7.4, 4°C), for 6-8 hours. Specimens were washed
59
60

1
2
3 in a solution containing 1.5% saccharose in 0.1M Sorensen phosphate buffer (pH 7.4) for
4
5 6-12 hours, post-fixed in 1.5% osmium tetroxide, dehydrated and then embedded in
6
7 historesin according to manufacture instructions (Leica HistoResin, Leica, Wehrheim,
8
9 Germany). Series of 2 μm thick semi-thin transverse sections were cut using an
10
11 ultramicrotome and stained by Toluidine blue for 30 seconds. The nerve section were
12
13 observed under a light microscope (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with
14
15 a Carl Zeiss AxioCam HRC camera.
16
17

18
19 For morphometric analysis of the regenerated nerve fibers, we used the method of
20
21 Systematic Random Sampling and 2D-dissector which was described previously [25].
22
23 The measurements were performed using the software ImageJ 1.42q (Wayne Rasband,
24
25 National Institutes of Health, US, available to download at <http://rsb.info.nih.gov/ij>).
26
27 The variables analyzed were: number of nerve fibers per field; axon, myelin and nerve
28
29 fiber CSA. Numerical data were analyzed using MATLAB (version 7.0.1).
30
31
32
33
34
35

36 **Zymography**

37
38 Muscle and nerve extraction and zymographic analysis was performed according to
39
40 current methodology [26, 27]. The molecular mass of gelatinolytic activities was
41
42 determined by comparison to reference protein molecular mass marker PageRuler
43
44 Prestained Protein Ladder (Fermentas Life Sciences, Burlington, Ont., Canada).
45
46 Activity bands were identified according to their molecular weights (active-MMP-9: 85
47
48 kDa; pro-MMP-2: 72 kDa; intermediary-MMP-2: 64 kDa; and active-MMP-2: 57 kDa).
49
50 Densitometric quantitative analysis of the total protein in the zymography was
51
52 performed using GeneTools v3.06 software (Syngene, Cambridge, UK).
53
54
55
56
57
58
59
60

Statistic

1
2
3 Shapiro-Wilk's W and Levene's test were applied to evaluate the normality and
4
5 homogeneity of the results, respectively. For parametric data: one-way ANOVA was
6
7 used to identify possible differences between groups. When differences were observed,
8
9 the Tukey test was performed. For non-parametric data: Kruskal-Wallis test followed by
10
11 Newman-Keuls test were performed. For all tests, the significance level was set at 5%
12
13
14
15 (p ≤ 0.05).
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Results

Walking track analysis

Figure 1 shows the functional assessment of posttraumatic sciatic nerve recovery by calculating the SFI. Normal walking is represented on the moment pre-crush (Pre-CR; Fig 1) when SFI values are close to zero. As expected, on the day-2 all groups had their SFI declined compared do Pre-CR ($P < 0.05$; Fig 1). The indexes maintained low until the 10th day when they started to increase and reached normal values on the 20-day ($P > 0.05$). They remained practically unchanged until the final experimental period (Fig 1). No difference among the groups was observed in any investigated period ($P > 0.05$; Fig 1).

Muscle Histology and Morphometric Analysis

Figure 2 represents sections from TA muscles stained with Masson's Trichrome. Muscle fiber atrophy was observed in CR, CR780 10, 60 and 120J groups in comparison to N and CR660 10, 60 and 120J (Fig 2). All groups preserved the polygonal muscle fiber shape (Fig 2). Target muscle fibers with signs of morphological reorganization were found close to nerve endings in all groups submitted to peripheral nerve injury. These target fibers are an indicative of reinnervation process (Fig 2). Furthermore, groups submitted to peripheral nerve injury had an increase total collagen mainly in the perimysium, surrounding muscle fibers bundles (Fig 2).

Muscle fiber CSA decreased significantly in CR and CR780 (10, 60 and 120J) compared to N group ($P < 0.05$, Fig 3) confirming histology findings. The CR group decreased its CSA around 55.11% compared to N ($P < 0.05$, Fig 3). The groups irradiated with 780 nm laser decreased around 44.47% in muscle fiber CSA (CR780 10J: -37.01%; CR780 60J: -51.77%; CR780 120J: -44.63%) compared to N ($P < 0.05$,

1
2
3 Fig 3). The CR660 groups presented muscle fiber CSA similar to normal values ($P >$
4
5 0.05, Fig 3).
6
7
8
9

10 **Total activity of MMPs in TA muscles**

11
12 The MMP-9 was not detected in muscles of any experimental groups (data not shown).
13
14 The MMP-2 activity in the CR group did not differ from normal values ($P > 0.05$, Fig 4).
15
16 The 660 nm LLLT at different doses (10, 60 and 120J) decreased significantly the
17
18 MMP-2 activity compared to N group ($P < 0.05$, Fig 4). Furthermore, MMP-2 activity in
19
20 both CR660 10J and CR660 60J was lower than CR levels ($P < 0.05$, Fig 4). The CR780
21
22 60J and CR780 120J groups showed a decrease of MMP-2 activity compared to N and
23
24 CR ($P < 0.05$, Fig 4). The MMP-2 activity in CR780 10J group was similar to N and CR
25
26 ($P > 0.05$, Fig 4).
27
28
29
30
31
32
33

34 **Nerve histology, S-100 immunofluorescence and morphometry**

35
36 Figure 5 shows the sciatic nerve histology stained with toluidine blue for all injured and
37
38 normal groups. They all clearly illustrate similarities in structural organization. A slight
39
40 atrophy can be observed in all crush groups compared to normal. However, this atrophy
41
42 can be observed most clearly in CR and in the last two groups CR780 60J and 120J (Fig
43
44 5). The nerves from CR660 10, 60 and 120J, and CR780 10 J group were better
45
46 structured with bigger nerve fibers compared to the other crush groups (CR, CR780 60
47
48 and 120J; Fig 5).
49
50
51
52

53
54 The S100 immunofluorescence can be observed in the Figure 6. Schwann cells and
55
56 myelin sheath are represented in red. Myelin sheath is well delimited in N group (Fig
57
58 6A). All crushed nerves presented a similar pattern of S100 expression (Fig 6B-D).
59
60

1
2
3 Myelin sheath was well delimited in many nerve fibers, but it was smaller than N group.
4
5 No notable difference was observed among crush groups submitted or not to LLLT.
6
7
8 Morphometric nerve analysis showed that the mean number of nerve fiber per field was
9
10 135 ± 27 , and there was no difference among the experimental groups ($P > 0.05$, Fig 7).
11
12 Figure 8 shows the mean \pm SD values of myelin, axon and nerve fiber CSA in the
13
14 sciatic nerves of the experimental groups. For myelin, a reduction of CSA was observed
15
16 in CR, CR660 120J and CR780 60J compared to N ($P < 0.05$, Fig 8). The CR660 10, and
17
18 60J, and CR780 10 and 120J had myelin CSA values similar to N group ($P > 0.05$; Fig
19
20 8). Axon CSA decreased in all crushed groups compared to N ($P < 0.05$, Fig 8) with no
21
22 difference among them ($P > 0.05$; Fig 8). Nerve fiber CSA followed the changes
23
24 observed in myelin, e.g., the CR660 10 and 60J, and CR780 20 and 120J groups
25
26 presented values similar to N group ($P > 0.05$; Fig 8), whilst CR, CR660 120J, and
27
28 CR780 60J were smaller than N group ($P < 0.05$; Fig 8).
29
30
31
32
33
34
35

36 **Total MMP activity in sciatic nerve**

37
38 After 28 days, MMP-9 activity from CR was similar to N group ($p > 0.05$; Fig 9). LLLT
39
40 660 nm, regardless the dose used, decreased MMP-9 activity in injured sciatic nerves
41
42 compared to CR (CR660 10J: -62%, $p = 0.0002$; CR660 60J: -68%, $p = 0, 0001$; and L
43
44 660 120J: -39%, $p = 0.03$; Fig. 9). The CR780 10J group showed a significant reduction
45
46 of MMP-9 activity compared to N and CR groups ($p = 0.02$ and $p = 0.0001$,
47
48 respectively; Fig.9). Both CR780 60 and 120J groups presented the same levels of
49
50 MMP-9 activity compared to N and CR groups ($p > 0.05$; Fig.9).
51
52
53

54
55 The MMP-2 activity remained unchanged in CR, CR780 10, 60 and 120J groups
56
57 compared to N ($p > 0.05$, Figure 10). However, all groups irradiated with 660 nm laser
58
59 had the MMP-2 activity significantly increased compared to N (L 660nm 10J: +81%, p
60

1
2
3 = 0.04; L 660nm 60J: +126%, p = 0.003, and L 660nm 120J: +100%, p = 0.02) and CR
4
5
6 group (p <0.05, Figure 10).
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

DISCUSSION

This study brings new information about the effects of different doses of LLLT in peripheral nerve regeneration and denervated muscle recovery after crush injury. All results brought important contribution to clarify and establish the best parameters for LLLT clinical use, focusing the acceleration of neuromuscular recovery and functional improvement.

The authors consider that the results cannot be interpreted out of a global context. Therefore, in the present study, the effects of LLLT were carried out considering both muscle and nerve responses. Since some parameters showed to be better to neuromuscular recovery than others.

Several studies had already showed that LLLT accelerates the peripheral nerve regeneration process [1, 28-40]. However, no study in the last decade has examined the effects of LLLT irradiation on TA muscle trophism after peripheral nerve injuries [39, 40]. Another innovator point of this study was to study the MMP activity in both nerve and muscle submitted to LLLT.

The conflicting results about the LLLT use in rehabilitation could be due to numerous technical variables, particularly wavelength, energy densities and type of irradiation. If they are not well adjusted, they can impair therapeutic process [1]. Following the necessity of to establish clinical protocols of LLLT application, the present study proposed to go deeper on the investigation of the effects of peripheral nerve irradiation.

The mainly aspects confronted in this study were the wavelength types (660 nm vs 780 nm) and the energy densities (10, 60 and 120 J/cm²) which are relevant aspects to patient application perspectives.

The LLLT parameters chosen in this study were based on several scientific studies. Literature shows that there is an increase of infrared laser devices use, and it is justified

1
2
3 by its greater penetration through the skin [41]. Nevertheless, positive effects obtained
4 from experimental studies used either visible [30, 42, 43] or near-infrared lasers [21]. It
5 seems that both types of LLLT wavelengths are useful to promote nerve regeneration.
6
7
8
9
10 Another important parameter to be considered when investigating LLLT effects is
11 energy density. Analysis of published results showed that LLLT at different levels of
12 energy density (ranging from less than 10 J/cm² to 150 J/cm²) are effective in promoting
13 nerve regeneration [1]. The same can be reported from time of irradiation which vary
14 from less than 1 minute to 90 minutes. Therefore, these observations suggest that LLLT
15 has positive effects on nerve regeneration. On the other hand there is a lot of doubts
16 involving the best parameter combination to consider when to treat nerve injuries. All
17 published studies which presented good results in nerve regeneration used continuous
18 LLLT, thus this type of laser emission was used in the current study [1, 28, 39].

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31 Regarding to muscle fiber CSA results, 660 nm LLLT with 10, 60 or 120 J/cm² seems to
32 be effective to accelerate the recovery of muscle fiber trophism in the present study. On
33 the other hand, groups irradiated with 780 nm LLLT presented muscle fiber CSA
34 similar to CR values. In addition, nerve morphometry showed that both myelin and
35 nerve fiber CSA reached normal levels in CR660 10 and 60 J/cm² and also in CR780 10
36 and 120 J/cm². Myelin sheath is responsible for action potential conduction along the
37 axon, and its reduction causes decrease or loss of axonal function [44]. Nerve histology
38 corroborated to this findings because these groups presented bigger nerve fibers and less
39 content of connective tissue rounding fibers. Furthermore, S-100, a marker of Schwann
40 cells and myelin sheath, showed that its expression was quite similar among crushed
41 groups, and myelin was not structured as in control groups. To elucidate these different
42 aspects involving muscle and nerve recovery, future studies should investigate electrical
43 neurophysiologic parameters of neuromuscular system such as H-reflex and M-wave,
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 and also factors related to muscle reinnervation, for example neural cell adhesion
4
5 molecule (N-CAM), agrin, and acetylcholine receptors expressions.
6

7
8 Relating to MMP activity results, the biological meaning of its behavior due to LLLT
9
10 are interpreted in accordance to nerve and muscle global results. Therefore, the authors
11
12 believe that the 660 nm LLLT, especially the groups 10 and 60J/cm², accelerated nerve
13
14 regeneration and muscle fiber reinnervation. This hypothesis can be supported by the
15
16 fact that groups irradiated with 660 nm laser recovered muscle fiber CSA compared to
17
18 the N group. This recovery was accompanied by an increased of MMP-2 activity in
19
20 nerve and a decrease of MMP-9 and MMP-2 activities in nerve and muscle,
21
22 respectively.
23
24
25

26
27 During initial phases of Wallerian degeneration, axonal cytoskeleton disintegration and
28
29 myelin sheath breakdown are highly coordinated by MMPs, specially MMP-9 and -2.
30
31 La Fleur and cols [45] showed that high levels of MMP-9 on the day-1 and -4 after
32
33 nerve crush injury are related to neutrophils and macrophage influx respectively.
34
35 Furthermore, the authors report that inflammatory cell and Schwann cells are able to
36
37 secrete MMP-9. Its secretion is important to degrade axon and myelin debris promoting
38
39 ECM remodeling necessary to axonal growth. In addition, MMPs can release Schwann
40
41 cells of their connections with basal membrane allowing their proliferation and
42
43 stimulating axon terminals penetration through ECM [45].
44
45
46

47
48 Despite the increment of MMP-9 activity is desired during early stage of nerve
49
50 degeneration, the maintenance of high MMP-9 levels can be detrimental to tissue
51
52 integrity. Beuche and cols [46] observed an increase of serum MMP-9 levels in patients
53
54 with amyotrophic lateral sclerosis possibly caused by peripheral nerve degeneration and
55
56 muscle denervation. Mice MMP-9-knockout underwent a spinal cord injury showed an
57
58 accelerated recovery of motor function compared to wild animals [47]. Together these
59
60

1
2
3 results indicate that the negative regulation of MMP-9 might be important during the
4
5 final stages of neural repair. Thus, our results suggest that LLLT might have an anti-
6
7 inflammatory effect controlling inflammatory cell influx via MMP-9 down regulation.
8
9

10 In this context, the production and degradation of ECM components seems to stimulate
11
12 or impair axonal growth. Gantus and cols [11] reported that laminin, fibronectin and
13
14 collagen IV are important to support axonal growth during regenerative process,
15
16 forming a network of ECM to the growth cone. However, other ECM components such
17
18 as chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) are able to inhibit this process [11].
19
20

21
22 Previous studies have shown that during the Wallerian process, the increment of MMP-
23
24 2 activity in nerve is able to reorganize the basal lamina by degrading collagen type
25
26 IV and allowing the axonal growth cone to move forward [45]. Moreover, it is well
27
28 described in the literature that MMP-2 degrades CSPG [11] suggesting that the increase
29
30 of MMP-2 activity could be a positive indicator of axon regeneration process.
31
32

33
34 Therefore, our results corroborate to these findings. In the present study groups which
35
36 presented the normal values of muscle fiber and myelin CSA had the lowest values of
37
38 MMP-9 and the highest values of MMP-2 in sciatic nerves. It is also necessary to
39
40 emphasize that these MMPs are systematically regulated by tissue inhibitors of
41
42 metalloproteinase (TIMP) which control the process and protect the basal lamina
43
44 structure [45]. Future studies should investigate the role of LLLT not only on MMPs
45
46 activity in nerve and muscle tissues but also consider the TIMPs expression.
47
48

49
50 For the denervated skeletal muscle, the role of MMPs in this affection is not well
51
52 defined yet. Some studies have shown that the increase of MMP-2 activity in muscles
53
54 after 28 days of denervation may be related not only to muscle atrophy and proliferation
55
56 of connective tissue around muscle fibers [26], but also to ECM remodeling which
57
58 allows axonal growing and muscle fiber reinnervation. However, other studies show
59
60

1
2
3 that increase of MMP-2 activity may be related to cycles of degeneration / regeneration
4 of muscle fibers. Thus, the decrease of MMP-2 activity in muscles from groups
5 irradiated with 660nm LLLT may have been beneficial to muscle tissue, probably
6 causing less damage in muscle fibers. Future studies should evaluate the behavior of
7 these MMPs in muscular and peripheral nervous systems in different periods of time to
8 confirm the hypotheses here generated.
9

10
11 Regarding to functional analysis, all experimental groups submitted to crush nerve
12 injury recovered normal function in the ending of experimental period. Such response
13 was expected due to the type of nerve injury performed. Varejão and cols [23] used the
14 same protocol of crush injury in rat sciatic nerve and found that 4 weeks post-injury,
15 animals recovery about 80% of the function, and on the 8th week, the motor recovery
16 was complete. Following this premise, the authors opted for using a well described,
17 controlled and reproducible model of crush injury of rat nerve sciatic [22, 23, 30, 31,
18 43, 48, 49, 50] which allows to verify different phases of nerve recovery. Morphological
19 findings of the present study such as targeted muscle fibers were observed in all crushed
20 groups suggesting that muscle fibers were reinnervated confirming the time set of nerve
21 recovery after the crush.
22

23
24 Even considered as an injury with rapid prognosis of recovery in animal model, in
25 humans the time of recovery after nerve traumatic injury may extend during several
26 months or even years, depending on the severity and extension of the lesion [38].
27 Additionally, the recovery in many times used to be incomplete generating dysfunctions
28 and impairing daily life activities. Regarding clinical applicability this type of study
29 brings important contribution to design new safe and effective strategies of peripheral
30 nerve injury rehabilitation.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 The functional test used in our study is largely widespread and used, because it is an
4 easy, noninvasive and cheap procedure. However, the effectiveness of their results
5 differs among scientists. Some accept the test as a good tool to evaluate sciatic nerve
6 injury. Others groups question its accuracy, and suggest that video analysis could be
7 more precise [51-53]. Even questioned, functional test is an additional analysis that
8 whether observed combined with other analyses can suggest how the neuromuscular is
9 interacting.

10
11 Interesting, the present study demonstrated that both nerve and muscle have a biological
12 response according to wavelength and dose used, e.g., data support a dose-dependent
13 curve. The 660 nm LLLT with 10 or 60 J/cm² seems to be more effective to accelerate
14 nerve recovery because CR660 10 and 60J groups presented normal values of muscle
15 fiber CSA, decreased the MMP-2 and -9 activities in TA muscles and sciatic nerves,
16 respectively, increased the MMP-2 activity in nerve, and presented normal values of
17 myelin and nerve fiber CSA, indicating a possible acceleration of nerve regeneration
18 and muscle fiber reinnervation.

19
20 Based on objective proposed we can conclude that 660 nm LLLT specially low (10
21 J/cm²) and moderate (60J/cm²) energy densities accelerates neuromuscular recovery and
22 ECM remodeling in nerve and muscle via MMP-2 and -9 regulation, but it failed to
23 improve function after crush nerve injury in rats.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

LEGENDS

Figure 1. Functional analysis of crushed groups assessed by sciatic functional index calculation. Pre-CR: immediately before nerve crush injury. At pre-lesion state the function was absolutely normal in all groups. Function decreased at the 2-day and remained unchanged until 10 days of injury. After that, an exponential increase of functionality was observed in all groups, and they reached normal values on the 20th day. * Difference statistically significant ($p < 0.05$) compared to Pre-CR. $J = J/cm^2$.

Figure 2. Histological appearance of tibialis anterior muscle after Masson's Trichrome staining. Note that CR, CR780 10, 60 and 120J groups presented muscle fiber atrophy compared to N. Head arrows indicate increase of total collagen in the perimysium in all crushed groups. Arrows show target muscle fibers indicating cytoarchitecture reorganization. Target fibers are an indicative of reinnervation process. Asterisk (*) indicate an intramuscular nerve termination. $J = J/cm^2$. Bar = 100 μm .

Figure 3. Mean cross-sectional area of tibialis anterior muscle fibers. * $P < 0.05$ compared to N. Note that CR and CR780 10, 60 and 120J did not recovery normal values of muscle fiber CSA. Groups irradiated with 660 nm LLLT presented normal muscle fiber CSA. $J = J/cm^2$.

Figure 4. Total MMP-2 activity observed in different experimental groups. Representative bands of MMP-2 gelatinolytic activity are represented on the top of the figure. $J = J/cm^2$. * $P < 0.05$: compared to N; † $P < 0.05$: compared to CR. Note the significant decrease of MMP-2 activity in CR660 10 and 60J, and also in CR780 60 and 120J compared to N and CR groups.

1
2
3 **Figure 5.** Histological nerve sections stained with toluidine blue. Note structural
4 similarities among the experimental groups. Scale bar: 40 μm^2 . J = J/cm².
5
6
7

8
9
10 **Figure 6.** Immunofluorescence analysis of S-100 performed in sciatic nerves. Myelin
11 sheath and Schwann cells are marked in red. Head arrows represent normal S-100
12 expression in N group. White arrows show S-100 expression in small regenerated
13 fibers. No difference was observed among crushed groups. Bar: 100 μm^2 . J = J/cm².
14
15
16
17
18

19
20
21 **Figure 7.** Number of nerve fibers per microscopic field in different experimental
22 groups. There was no difference among the groups.
23
24
25
26

27
28
29 **Figure 8.** Myelin, axon and nerve fiber cross-sectional area (CSA) from sciatic nerve.* P
30 <0.05 compared to N. Note that CR660 10 and 60J and CR780 10 and 120J had myelin
31 and nerve fiber CSA values similar to N. All crushed groups decreased the axon CSA
32 compared to N with no difference among them. J = J/cm².
33
34
35
36
37
38

39
40
41 **Figure 9.** Total MMP-9 activity observed in sciatic nerve from different experimental
42 groups. Representative bands of MMP-2 gelatinolytic activity are presented on the top
43 of the figure. J = J/cm². * P<0.05: compared to group N; †P<0.05: compared to CR.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55 **Figure 10.** Total MMP-2 activity observed in sciatic nerve from different experimental
56 groups. Representative bands of MMP-2 gelatinolytic activity are presented on the top
57 of the figure. J = J/cm². * P<0.05: compared to group N and CR; Note that all groups
58
59
60

1
2
3 submitted to 660 nm LLLT regardless the dose (10, 60 and 120J) had MMP-2 activity
4
5 increased.
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

REFERENCE

1. Gigo-Benato D, Geuna S, de Castro Rodrigues A, Tos P, Fornaro M, Boux E, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurotomy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. *Lasers Med Sci* 2004; 19:57-65.
2. Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy for enhancing Peripheral Nerve repair: a review of the literature. *Muscle Nerve* 2005; 31:694-701.
3. Millesi H. Techniques for nerve grafting. *Hand Clinics* 2000; 16:73-91.
4. Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec* 2001; 263:396-404.
5. Kouyoumdjian JA. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. *Muscle Nerve* 2006; 34:785-788.
6. Lundborg G. *Nerve injury and repair*, 2nd Edition, Edinburgh: Churchill Livingstone. 2005.
7. Ishido M, Kami K, Mitsuhiko M. In vivo expression patterns of MyoD, p21 and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287:C484-C493.
8. Kostrominova TY, Dow DE, Dennis RG, Miller RA, Faulkner JA. Comparison of gene expression of two-month denervated, two-month stimulated-denervated and control rat skeletal muscles. *Physiol Genomics* 2005; 22:227-243.
9. Billington L, Carlson BM. The recovery of long-term denervated rat muscles after marcaine treatment and grafting. *J Neurol Sci* 1996; 144:147-155.
10. Dow DE, Cederna PS, Hassett CA, Kostrominova TY, Faulkner JA, Dennis RG. Number of contractions to maintain mass and for of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2004; 30:77-86.
11. Gantus MAV, Nasciutti LE, Cruz CM, Persechini PM, Martinez AMB. Modulation of extracellular matrix components by metalloproteinases and their tissue inhibitors during degeneration and regeneration of rat sural nerve. *Brain Res* 2006; 1122:36-46.
12. Demestre M, Orth M, Wells GM, Gearing A J, Hughes RA, Gregson NA. Characterization of matrix metalloproteinases in denervated muscle. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005; 31:545-555.
13. Platt CI, Krekoski CA, Ward RV, Edwards DR, Gavrilovic J. Extracellular matrix and matrix metalloproteinases in sciatic nerve. *J Neurosci Res* 2003; 74:417-429.

14. Siebert H, Dippel N, Mäder M, Weber F, Brück W. Matrix metalloproteinase expression and inhibition after sciatic nerve axotomy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60:85-93.
15. Ahtikoski AM, Tuominen H, Korpelainen JT, Takala TE, Oikarinen A. Collagen synthesis and degradation in polyneuropathy and myopathies. *Muscle Nerve* 2004; 30:602-608.
16. Schoser BG, Blottner D. Matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-7 and MMP-9 in denervated human muscle. *Neuroreport* 1999; 10:2795-2797.
17. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 2004; 29:191-197
18. Kherif S, Dehaupas M, Lafuma C, Fardeau M, Alameddine HS. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; 24:309-319
19. Koskinen SO, Kjaer M, Mohr T, Sørensen FB, Suuronen T, Takala TE. Type IV collagen and its degradation in paralysed human muscle: effect of functional electrical stimulation. *Muscle Nerve* 2000; 23:580-589.
20. Schoser BG, Blottner D, Stuerenburg HJ. Matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies: enhanced immunoreactivity near atrophic myofibers. *Acta Neurol Scand* 2002; 105:309-313.
21. Rochkind S, El-Ani D, Nevo Z, and Shahar A. Increase of neuronal sprouting and migration using 780nm laser phototherapy as procedure for cell therapy. *Lasers Surg Med* 2009; 41:277-281.
22. Beer GM, Steurer J, Meyer VE. Standardizing nerve crushes with a non-serrated clamp. *J Reconstr Microsurg* 2001; 17:531-534.
23. Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma* 2004; 21:1652-1670.
24. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989; 83:129-138.
25. Geuna S, Gigo-Benato D, De Catro Rodrigues A. On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibers. *Microsurgery* 2004; 24:72-76.
26. Russo TL, Peviani SM, Durigan JL, Salvini TF. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 2008; 37:593-600.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
27. Peviani SM, Russo TL, Durigan JL, Vieira BS, Pinheiro CM, Galassi MS, Salvini TF. Stretching and electrical stimulation regulate the metalloproteinase-2 in rat denervated muscle. *Neurol Res* 2009 (in press).
28. Anders JJ, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. *Neurol Res* 2004; 26:233-239.
29. Rochkind S, Nissan M, Razon N, Schwartz M, Bartal A. Electrophysiological effect of HeNe laser on normal and injured sciatic nerve in the rat. *Acta Neurochir* 1986; 83:125-30.
30. Rochkind S, Barr-Nea L, Razon N, Bartal A, Schwartz M. Stimulatory effect of He-Ne low dose laser on injured sciatic nerves of rats. *Neurosurgery* 1987; 20:843- 847.
31. Rochkind S, Nissan M, Barr-Nea L, Razon N, Schwartz M, Bartal A. Response of peripheral nerve to HeNe laser: experimental studies. *Lasers Surg Med* 1987; 7:441-443.
32. Rochkind S, Nissan M, Lubart R, Avram J, Bartal A. The in-vivo nerve response to direct low-energy-laser irradiation. *Acta Neurochir* 1988; 94:74-77.
33. Rochkind S, Rousso M, Nissan M, Villarreal M, Barr-Nea L, Rees DG. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. *Lasers Surg Med* 1989; 9:174-182.
34. Rochkind S, Barr-Nea L, Volger I. Spinal cord response to laser treatment of injured peripheral nerve. *Spine* 1990; 15:6-10.
35. Rochkind S, Ouaknine GE. New trend in neuroscience: low-power laser effect on peripheral and central nervous system (basic science, preclinical and clinical studies). *Neurol Res* 1992; 14:2-11.
36. Rochkind S, Nissan M, Alon M, Shamir M, Salame K. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. *Lasers Surg Med* 2001; 28:216-219.
37. Rochkind S, Drory V, Alon M, Nissan M, Ouaknine GE. 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.* 2007; 25:436-42.
38. Rochkind O S, Leider-Trejo L, Nissan M, Shamir MH, 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* 2007; 25:137-43.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
39. Rochkind S, Geuna S, Shainberg A. Chapter 25: Phototherapy in peripheral nerve injury effects on muscle preservation and nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol* 2009; 87:445-64.
40. Rochkind S. Phototherapy in peripheral nerve injury for muscle preservation and nerve regeneration. *Photomed Laser Surg* 2009; 27:219-20.
41. Turner J, Hode L. *Laser Therapy: Clinical practice and scientific background*. Sweden: Prima Books Grängesberg. 2003:380-434.
42. Hamilton GF, Keven Robinson T, Ray RH. The effects of helium-neon laser upon regeneration of the crushed peroneal nerve. *J Orthop Sports Phys Therapy* 1992; 15:209-214.
43. Anders JJ, Borke RC, Woolery SK, Van De Merwe WP. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. *Lasers Surg Med* 1993; 13:72-82.
44. OH, Shin J. *Color atlas of nerve biopsy pathology*. EUA: CRC Press LLC. 2005.
45. La Fleur M, Underwood JL, Rappolee DA, Werb Z. Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Exp Med* 1996; 184:2311-2326.
46. Beuche W, Yushchenko M, Mäder M, Maliszewaska M, Felgenhauer K, Weber F. Matrix metalloproteinase-9 is elevated in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 2000; 11:3419-3422.
47. Noble LJ, Donovan F, Igarashi T, Goussev S, Werb Z. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *J Neurosci* 2002; 22:7526-35.
48. Khullar SM, Brodin P, Messelt EB, Haanaes HR. The effects of low level laser treatment on recovery of nerve conduction and motor function after compression injury in the rat sciatic nerve. *Eur J Oral Sci* 1995; 103:299-305.
49. Bagis S, Comelekoglu U, Coskun B, Milcan A, Buyukakilli B, Sahin G, Ozisik S, Erdogan C. No effect of GA-AS 9904 nm) laser irradiation on the intact skin of the injured rat sciatic nerve. *Lasers Med Sci* 2003; 18:83-88.
50. Shin DH, Lee E, Hyun JK, Lee SJ, Chang YP, Kim JW, Choi YS, Kwon BS. Growth-associated protein-43 is elevated in the injured rat sciatic nerve after low power laser irradiation. *Neurosci Lett* 2003; 344:71-74.
51. Bervar M. An alternative video footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *Acta Chir Plast* 2002; 44:86-89.
52. Sarikcioglu L, Demirel BM, Utuk A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia Morphol (Warsz)* 2009; 68:1-7.
53. Costa LM, Simões MJ, Maurício AC, Varejão AS. Chapter 7: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part IV-

kinematic gait analysis to quantify peripheral nerve regeneration in the rat. *Int Rev Neurobiol* 2009; 87:127-39.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 Table 1: Experimental groups and LLLT parameters investigated.

Experimental Groups (n = 8)	Wavelength (nm)	Power (mW)	Energy Density (J/cm ²)	Total energy emitted per point* (J)	Time ON (min)
N	-	-	-	-	-
CR	-	-	-	-	1
CR660 10J	660	40	10	4	0.3
CR660 60J	660	40	60	24	1
CR660 120J	660	40	120	48	2
CR780 10J	780	40	10	4	0.3
CR780 60J	780	40	60	24	1
CR780 120J	780	40	120	48	2

2 N: normal group; CR: crush group. Note that “J” in the experimental groups column means “J/cm²”. *Total energy emitted per point = energy
3 density (J/cm²) x spot area

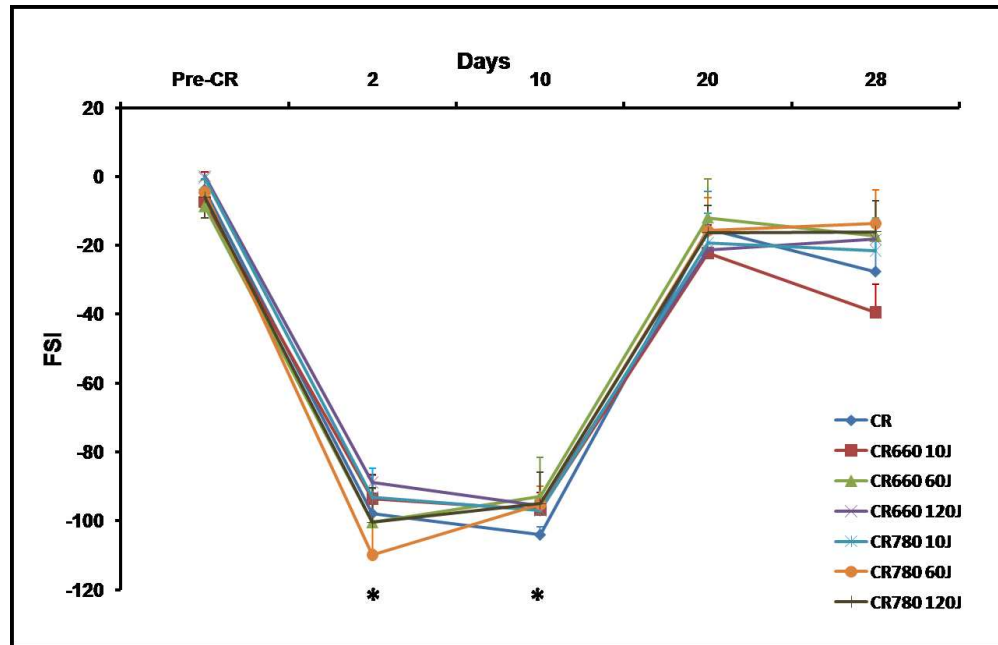


Figure 1. Functional analysis of crushed groups assessed by sciatic functional index calculation. Pre-CR: immediately before nerve crush injury. At pre-lesion state the function was absolutely normal in all groups. Function decreased at the 2-day and remained unchanged until 10 days of injury. After that, an exponential increase of functionality was observed in all groups, and they reached normal values on the 20th day. * Difference statistically significant ($p < 0.05$) compared to Pre-CR. J = J/cm^2
217x140mm (150 x 150 DPI)

review

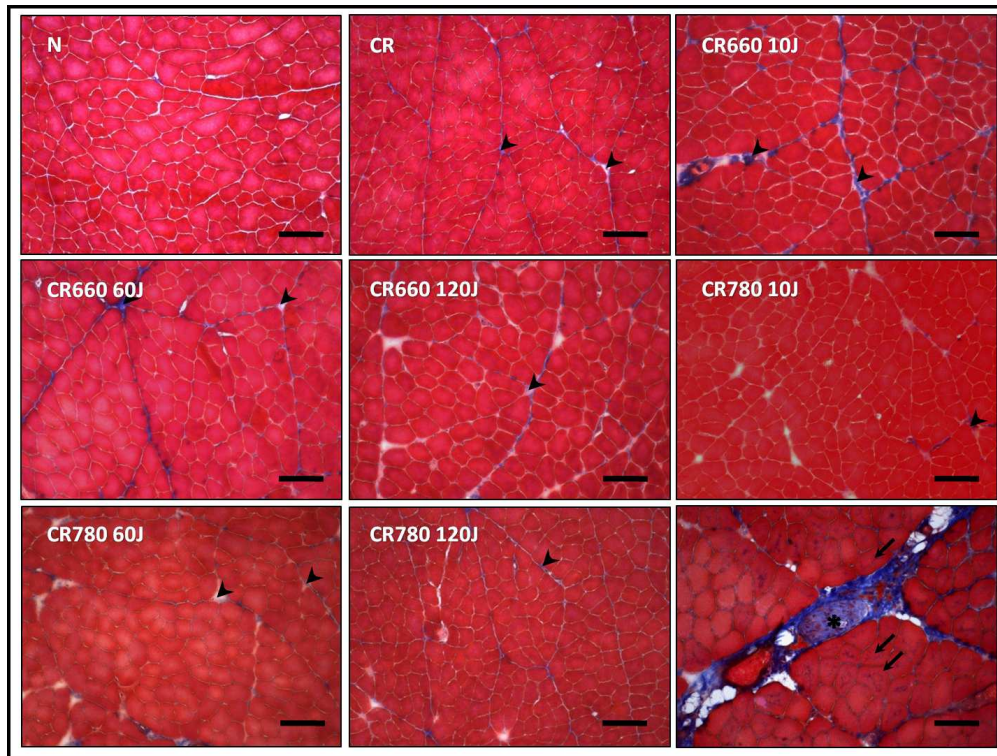


Figure 2. Histological appearance of tibialis anterior muscle after Masson's Trichrome staining. Note that CR, CR780 10, 60 and 120J groups presented muscle fiber atrophy compared to N. Head arrows indicate increase of total collagen in the perimysium in all crushed groups. Arrows show target muscle fibers indicating cytoarchitecture reorganization. Target fibers are an indicative of reinnervation process. Asterisk (*) indicate an intramuscular nerve termination. J = J/cm². Bar = 100 μ m.

242x183mm (150 x 150 DPI)

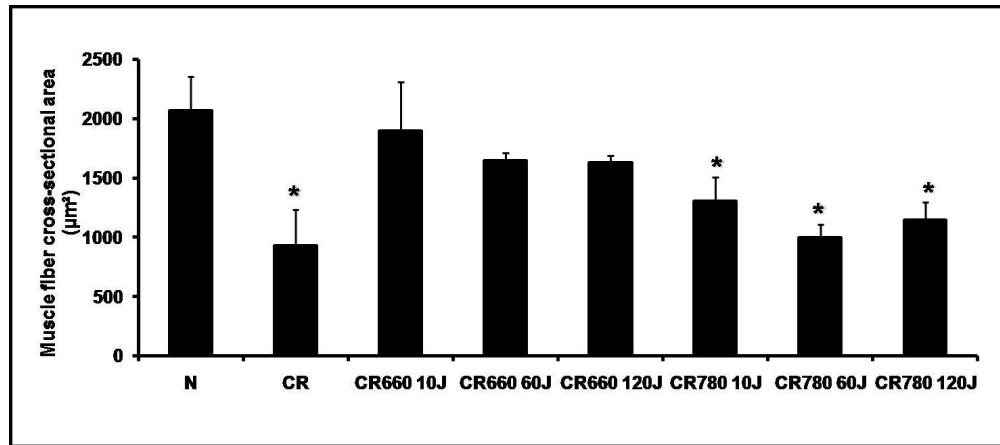


Figure 3. Mean cross-sectional area of tibialis anterior muscle fibers. * $P < 0.05$ compared to N. Note that CR and CR780 10, 60 and 120J did not recovery normal values of muscle fiber CSA. Groups irradiated with 660 nm LLLT presented normal muscle fiber CSA. J = J/cm². 250x111mm (150 x 150 DPI)

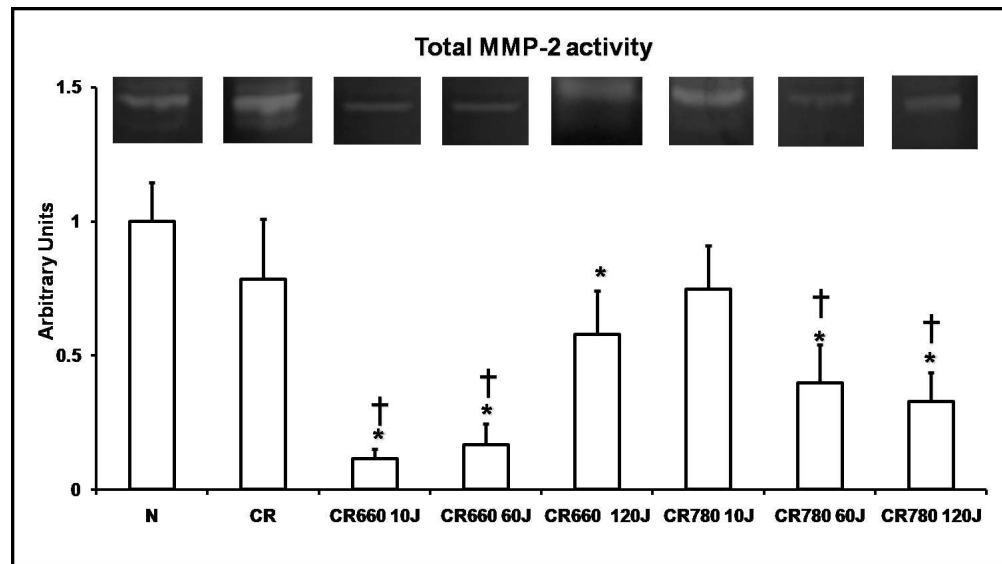


Figure 4. Total MMP-2 activity observed in different experimental groups. Representative bands of MMP-2 gelatinolytic activity are represented on the top of the figure. J = J/cm². * P < 0.05: compared to N; † P < 0.05: compared to CR. Note the significant decrease of MMP-2 activity in CR660 10 and 60J, and also in CR780 60 and 120J compared to N and CR groups.
255x142mm (150 x 150 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

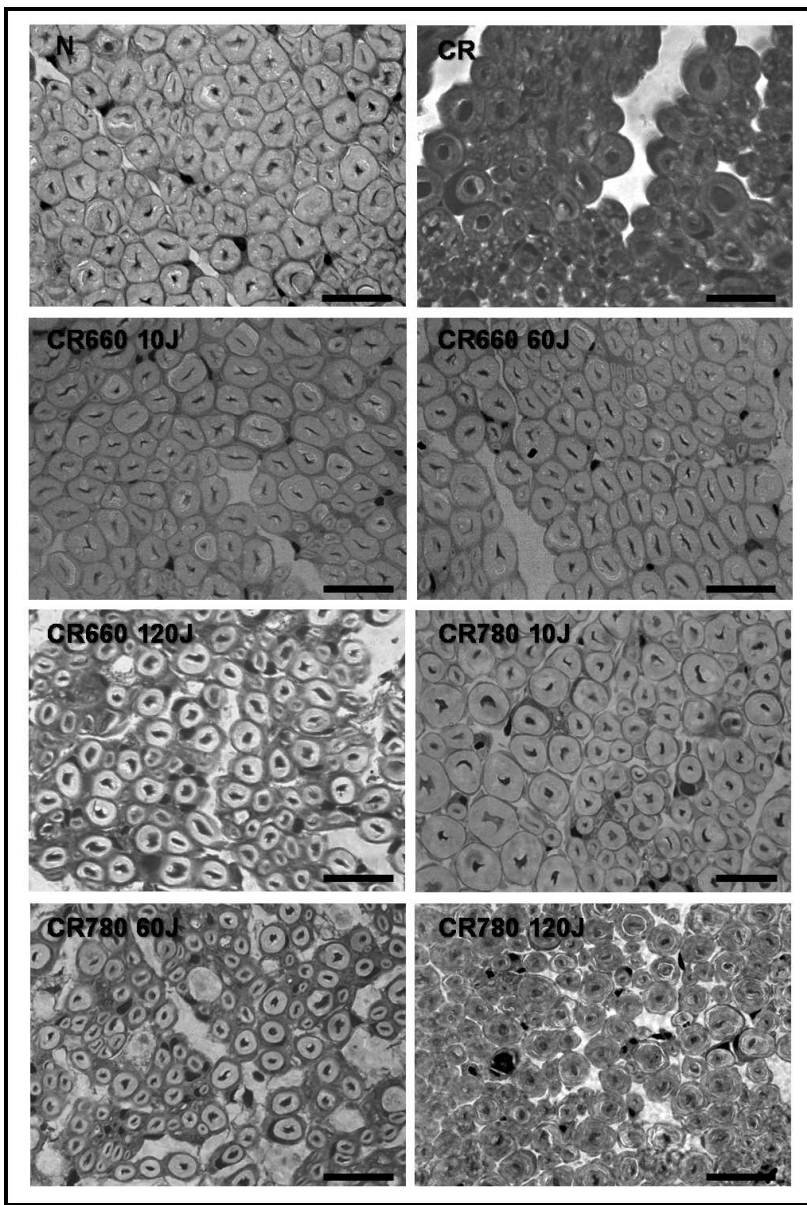


Figure 5. Histological nerve sections stained with toluidine blue. Note structural similarities among the experimental groups. Scale bar: 40 μm^2 . J = J/cm². 171x255mm (150 x 150 DPI)

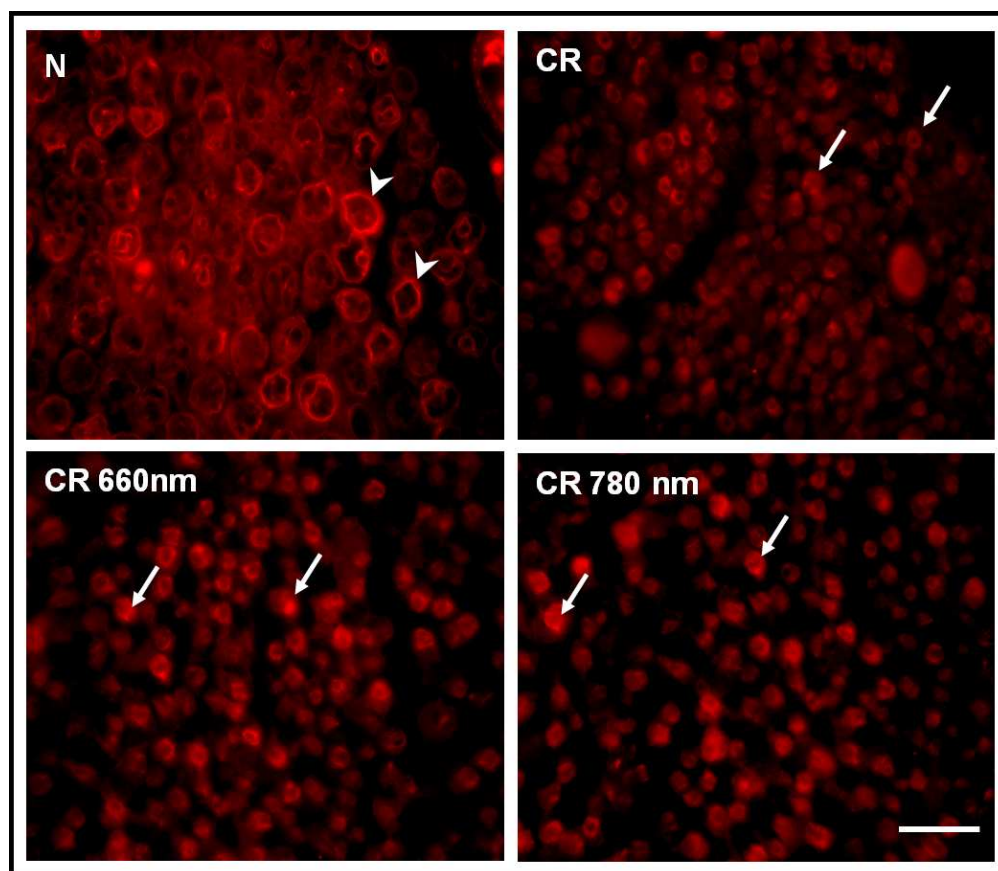


Figure 6. Immunofluorescence analysis of S-100 performed in sciatic nerves. Myelin sheath and Schwann cells are marked in red. Head arrows represent normal S-100 expression in N group. White arrows show S-100 expression in small regenerated fibers. No difference was observed among crushed groups. Bar: 100 μm^2 . J = J/cm².
177x153mm (150 x 150 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

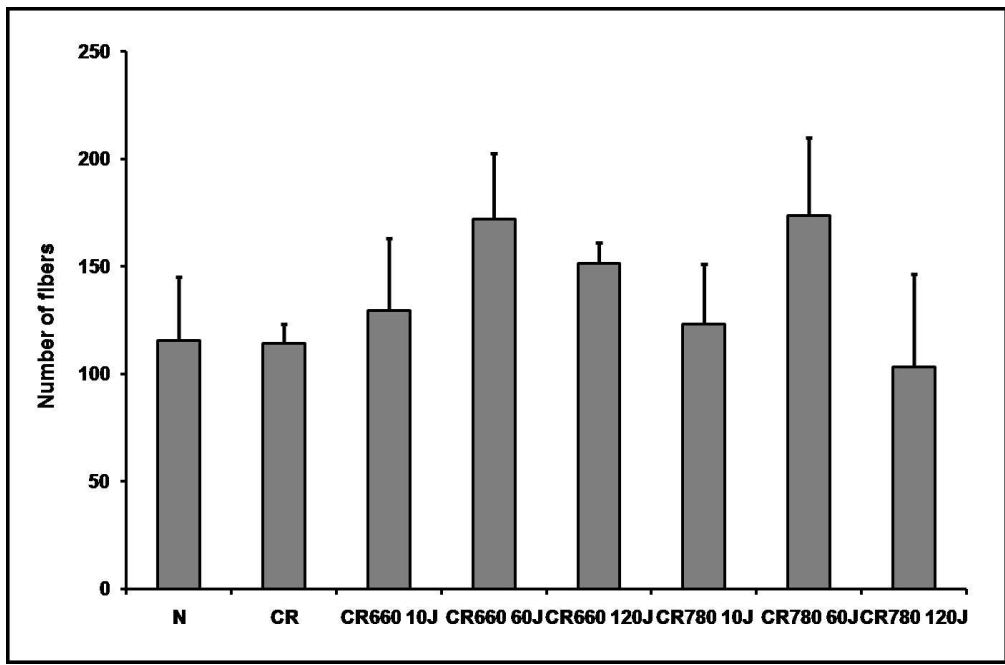


Figure 7. Number of nerve fibers per microscopic field in different experimental groups. There was no difference among the groups.
237x155mm (150 x 150 DPI)

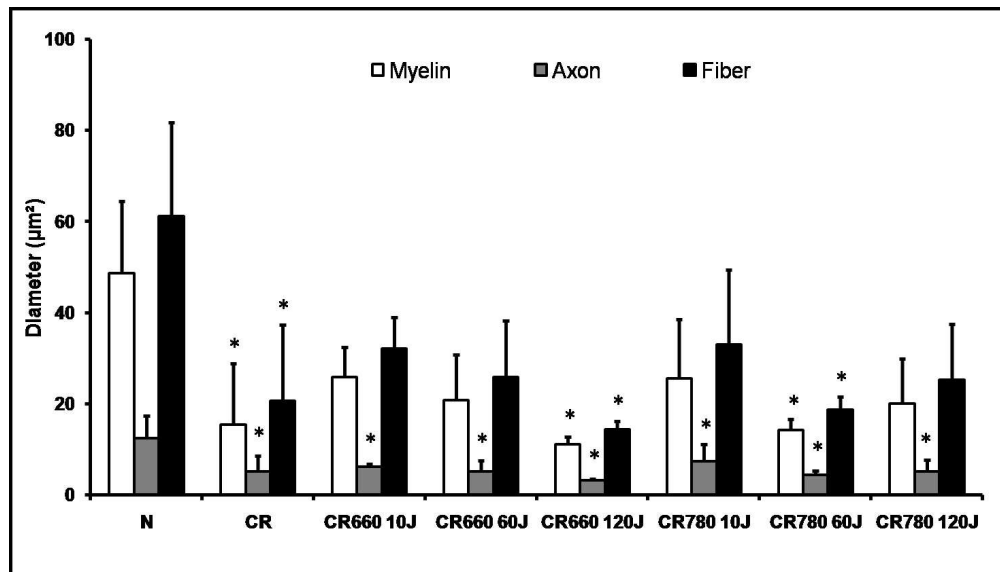


Figure 8. Myelin, axon and nerve fiber cross-sectional area (CSA) from sciatic nerve.* $P < 0.05$ compared to N. Note that CR660 10 and 60J and CR780 10 and 120J had myelin and nerve fiber CSA values similar to N. All crushed groups decreased the axon CSA compared to N with no difference among them. J = J/cm².
249x141mm (150 x 150 DPI)

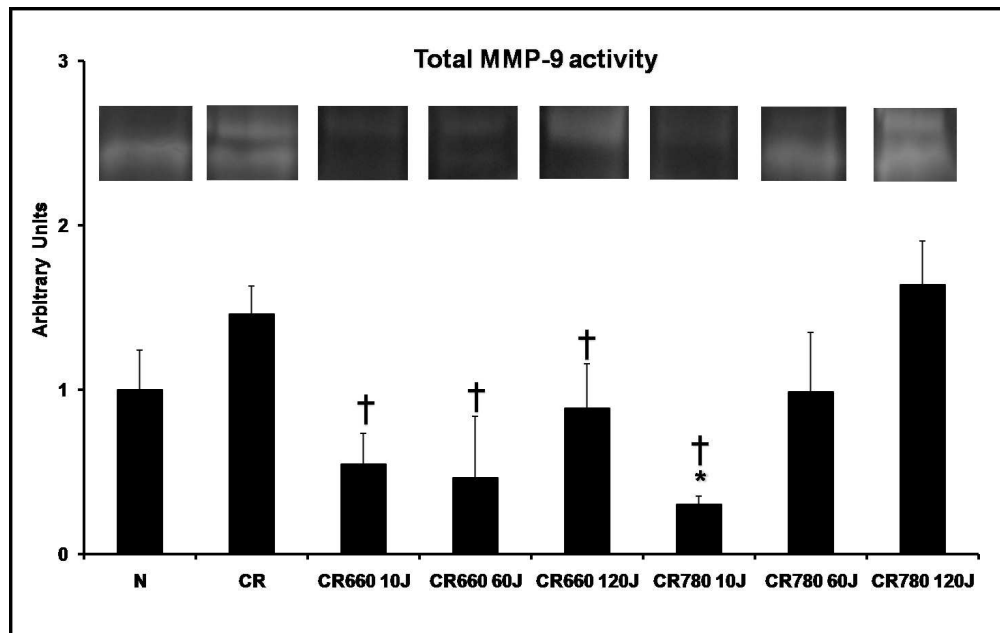


Figure 9. Total MMP-9 activity observed in sciatic nerve from different experimental groups. Representative bands of MMP-2 gelatinolytic activity are presented on the top of the figure. J = J/cm². * P<0.05: compared to group N; †P<0.05: compared to CR. Note that all groups CR660 (10, 60 and 120J) and only CR780 10J decreased MMP-9 activity compared to CR.
248x156mm (150 x 150 DPI)

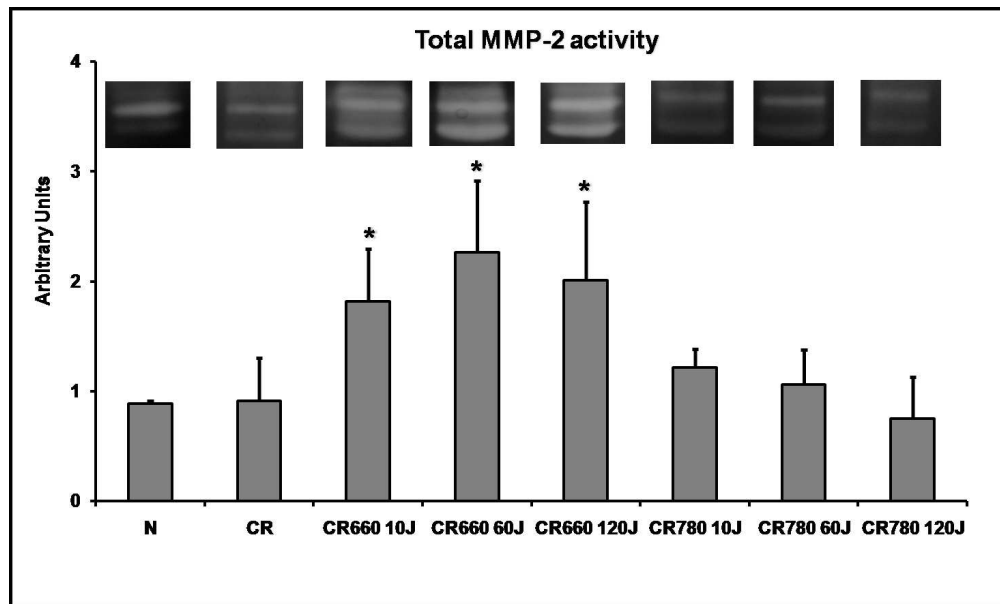


Figure 10. Total MMP-2 activity observed in sciatic nerve from different experimental groups. Representative bands of MMP-2 gelatinolytic activity are presented on the top of the figure. J = J/cm². * P<0.05: compared to group N and CR; Note that all groups submitted to 660 nm LLLT regardless the dose (10, 60 and 120J) had MMP-2 activity increased.
248x149mm (150 x 150 DPI)