

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - DIRETORIA DE SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**CARLA BERNARDO SOLDERA**

---

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO UTILIZANDO LED SOBRE OS  
ASPECTOS MORFOLÓGICOS MUSCULARES E REPARO DO TECIDO  
NERVOSO PÓS LESÃO DE NERVO CIÁTICO DE RATOS WISTAR**

---

**SÃO PAULO  
2017**

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - DIRETORIA DE SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**CARLA BERNARDO SOLDERA**

---

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO UTILIZANDO LED SOBRE OS  
ASPECTOS MORFOLÓGICOS MUSCULARES E REPARO DO TECIDO  
NERVOSO PÓS LESÃO DE NERVO CIÁTICO DE RATOS WISTAR**

---

Dissertação apresentada à  
Universidade Nove de Julho para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências da Reabilitação.

**Orientadora**

Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

**SÃO PAULO  
2017**

Soldera, Carla Bernardo.

Efeitos da fotobiomodulação utilizando LED sobre os aspectos morfológicos musculares e reparo do tecido nervoso pós lesão de nervo ciático de ratos wistar. / Carla Bernardo Soldera. 2017.

62 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2017.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari.

1. Lesão nervosa periférica. 2. LED. 3. Regeneração nervosa e muscular. 4. Nervo ciático.

I. Ferreira, Raquel Agnelli Mesquita.

II. Título.

CDU 615.8

São Paulo, 15 de dezembro de 2017.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Carla Bernardo Soldera.

Título da Dissertação: "Efeitos da fotobiomodulação utilizando LED sobre a resposta muscular e neural após lesão de nervo ciático de ratos wistar".

Presidente: PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROF. DR. FABIO DAUMAS NUNES



Membro: PROFA. DRA. SANDRA KALIL BUSSADORI



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e aos meus anjos da guarda, pela vida e por propiciar tantas oportunidades e colocar em meu caminho pessoas amigas e preciosas. Obrigado por coloca-las tão caprichosamente em minha vida.

A minha família que mesmo estando a alguns quilômetros de distância, se mostraram incansáveis em suas manifestações de apoio e carinho.

Agradeço aos colegas de laboratório, especialmente aos amigos Lucas, Beatriz e Agnelo que a todo momento estavam presentes para me auxiliar em qualquer precisão. Aos alunos de iniciação científica Patrick, Diógenes, Ingrid e Wallace, em especial a aluna Paola que permaneceu até o final firme e forte.

Agradeço a UNINOVE, pelo apoio financeiro, instituição que proporcionou este estudo, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que proporcionou a bolsa de estudos do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições Privadas de Ensino Superior (PROSUP).

Aos professores e colegas do programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, que compartilharam comigo esses momentos de aprendizado.

À minha orientadora Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, que sempre esteve presente em todas as etapas da minha vida acadêmica e a quem devo minha trajetória até aqui, sempre foi e será um exemplo para mim de competência, capacidade e paciência. Agradeço pela confiança em mim depositada e dedicação em todas as etapas deste trabalho. Registro aqui toda minha admiração e agradecimento pelo convívio e conhecimento adquirido.

### **Agradecimento especial**

Meu agradecimento mais profundo só poderia ser dedicado a uma pessoa: minha mãe. que sempre primou pela minha educação e além de me oferecer a oportunidade de estudar, sempre estava presente me incentivando a lutar por cada sonho. O tempo todo ao meu lado, incondicionalmente, nos momentos mais difíceis, que não foram raros nestes últimos anos, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porem gratificante etapa. Este período nos mostrou uma verdade: Somos uma Família! Sou grata por cada gesto carinhoso, cada sorriso, cada lagrima. Obrigada por tudo.

## Resumo

As lesões nervosas periféricas (LNP) não apresentam clinicamente um risco de morte ao indivíduo, porém podem resultar em distúrbios motores e sensoriais alterando a funcionalidade do membro afetado. A fototerapia utilizando laser de baixa potência (LBP) tem demonstrado efeitos positivos para o processo de reparo nervoso e muscular após diferentes tipos de lesão e pouco se conhece a respeito dos efeitos da terapia com diodo emissor de luz (LED, do inglês light emitting diode). **Objetivo:** Analisar os efeitos do LED sobre o reparo nervoso e muscular de ratos Wistar pós lesão por esmagamento do nervo ciático. **Metodologia:** foram utilizados 85 ratos Wistar, pesando 200-250g, em 5 grupos: Controle: sem nenhum procedimento; Lesão: realizado apenas o esmagamento do Nervo Ciático Esquerdo (NCE); Lesão+LEDn: esmagamento do NCE e irradiação LED na área correspondente à lesão nervosa; Lesão+LEDm: esmagamento do NCE e LED no músculo Tibial Anterior; Lesão+LEDnm: esmagamento do NCE e irradiação LED na área correspondente à lesão nervosa e músculo. A aplicação do LED em região nervosa foi realizada com os seguintes parâmetros: comprimento de onda de 808nm, área do feixe 1cm<sup>2</sup>, potência média 40Mw, densidade de potência 0.04W/ cm<sup>2</sup>, densidade de energia 0.8 J/cm<sup>2</sup>, energia por ponto 0.8J, total de pontos 4, tempo por ponto 20seg, tempo total 80seg, energia por ponto 3.2J e em região muscular foi utilizado comprimento de onda de 808nm, área do feixe 1cm<sup>2</sup>, potência média 40Mw, densidade de potência 0.04W/ cm<sup>2</sup>, densidade de energia 0.4 J/cm<sup>2</sup>, energia por ponto 0.4J, total de pontos 8, tempo por ponto 10seg, tempo total 80seg, energia por ponto 3.2J. Ao término dos períodos experimentais, foi realizada a análise de marcha utilizando o Índice Funcional Ciático (IFC), bem como a análise da hiperalgesia mecânica através do teste de von Frey utilizando o analgesímetro de pressão com transdutor. Após a eutanásia dos animais os músculos Tibial Anterior direito e esquerdo foram removidos e pesados em uma balança semi-analítica para determinação do grau de atrofia muscular sendo calculada a relação de massa muscular. **Resultado:** Após a realização do IFC, no período de 7 dias, todos os grupos tratados com LED apresentaram uma melhora da marcha em relação ao grupo Lesão. O grupo LEDn foi o que apresentou o melhor resultado comparado ao grupo controle. Após 14 dias, o grupo LEDn e LEDnm apresentaram valores semelhantes ao grupo controle. Já em relação ao índice de atrofia muscular, no período de 7 dias, todos os grupos tratados com LED demonstraram uma diminuição do índice em relação ao grupo Controle. Em 14 dias, os grupos LED demonstraram um aumento em relação ao grupo Lesão. Em 21 e 28 dias, os grupos lesionados demonstraram uma diminuição em relação ao grupo Controle. Apenas o grupo LEDnm apresentou uma diminuição em relação ao grupo Lesão. No que diz respeito a hiperalgesia mecânica, os resultados obtidos demonstraram que em 7 dias, o grupo LEDn foi o que apresentou o melhor resultado comparado ao grupo controle. Em 14 dias, os grupos LEDn e LEDm apresentaram um aumento no limiar sendo necessário uma pressão maior para promover uma resposta álgica comparados ao grupo controle, tornando-os mais resistentes aos estímulos. Em 28 dias todos os grupos lesionados e tratados apresentaram um aumento da hiperalgesia em relação ao grupo controle. **Conclusão:** O LED aumentou a funcionalidade da marcha avaliada pelo IFC após 1 e 2 semanas pós LNP, especialmente quando foi usado na região nervosa associada ou não à região muscular, induziu um aumento na massa muscular em relação aos animais que não receberam tratamento no período de 2 semanas pós LNP e proporcionou um aumento no limiar álgico comparado ao grupo controle no período de 2 semanas pós LNP, sendo necessário um estímulo nociceptivo de maior intensidade para gerar o estímulo doloroso indicando uma melhor recuperação.

**Palavras-chave:** lesão nervosa periférica; LED; regeneração nervosa e muscular, nervo ciático

## Abstract

Peripheral nerve lesions (LNP) do not clinically present a risk of death to the individual but may result in motor and sensory disturbances altering the function of the affected limb. Phototherapy using low level laser has demonstrated positive effects for the nervous and muscle repair process after different types of injury and little is known about the effects of light emitting diode (LED) therapy. **Objective:** To analyze the effects of LED on the nervous and muscular repair of Wistar rats after sciatic nerve crush injury. **Methodology:** 85 Wistar rats, weighing 200-250g, in 5 groups: Control: without any procedure; Injury: carried out only the crushing of the Left Sciatic Nerve (LSN); Injury + LEDn: LSN crushing and LED irradiation in the area corresponding to the nerve injury; Injury + LEDmm: LSN and LED crushing in Tibial Anterior muscle; Injury + LEDn + LEDmm: LSN crushing and LED irradiation in the area corresponding to nerve injury and muscle. The application of the LED in the nervous region was performed with the following parameters: wavelength of 808nm, beam area 1 cm<sup>2</sup>, average power 40Mw, power density 0.04 W/cm<sup>2</sup>, energy density 0.8 J/cm<sup>2</sup>, energy per point 0.8J , total of points 4, time per point 20sec, total time 80sec, energy per point 3.2J and in muscle region was used wavelength of 808nm, beam area 1 cm<sup>2</sup>, average power 40Mw, power density 0.04 W/ cm<sup>2</sup>, density of energy 0.4 J/ cm<sup>2</sup>, energy per point 0.4J, total of points 8, time per point 10sec, total time 80sec, energy per point 3.2J. At the end of the experimental periods, the gait analysis and the mechanical hyperalgesia test were performed. At the end of the experimental periods, gait analysis was performed using the Sciatic Function Index (IFC), as well as the analysis of mechanical hyperalgesia using the von Frey test using the pressure analgesimeter with transducer. After the euthanasia of the animals, the tibial muscles, left and right, were removed and weighed in a semi-analytical balance to determine the degree of muscular atrophy and the muscle mass ratio was calculated. **Result:** After the IFC, within 7 days, all groups treated with LED showed an improvement in gait compared to the lesion group. The group LEDn was the one that presented the best result compared to the control group. After 14 days, the group LEDn and LEDnm presented similar values to the control group. Regarding the muscular atrophy index, in the 7-day period, all the groups treated with LED showed a decrease of the index in relation to the Control group. In 14 days, the LED groups showed an increase in relation to the Injury group. At 21 and 28 days, the injured groups showed a decrease in relation to the Control group. Only the LEDnm group showed a decrease compared to the Injury group. Regarding mechanical hyperalgesia, the results showed that in 7 days, the LEDn group was the one that presented the best result compared to the control group. At 14 days, the LEDn and LEDm groups showed an increase in the threshold, requiring a greater pressure to promote an allergic response compared to the control group, making them more resistant to the stimuli. At 28 days, all lesioned and treated groups showed an increase in hyperalgesia in relation to the control group. **Conclusion:** We can conclude that LED increased gait functionality assessed by IFC after 1 and 2 weeks post LNP, especially when it was used in the nerve region associated or not to the muscle region, induced an increase in muscle mass in relation to the animals that did not receive treatment in the period of 2 weeks post LNP and in the 2 week period post LNP provided an increase in the pain threshold compared to the control group, requiring a nociceptive stimulus of greater intensity to generate the pain stimulus indicating a better recovery.

Keywords: peripheral nerve injury; LED; nerve and muscle regeneration, sciatic nerve

## Sumário

1. Contextualização .....	10
Justificativa .....	15
2. Objetivo .....	16
2.1 Geral .....	16
2.2 Específico .....	16
3. Material e Métodos .....	17
3.1 Local .....	17
3.2 Animais .....	17
3.3 Procedimento cirúrgico .....	18
3.4 Irradiação com LED .....	20
3.5 Eutanásia .....	21
3.6 Análise funcional da marcha .....	21
3.7 Análise da hiperalgesia mecânica (Teste de von Frey) .....	23
3.8 Análise da massa muscular e grau de atrofia .....	24
3.9 Avaliação qualitativa e quantitativa morfológica muscular .....	25
3.10 Análise estatística .....	25
4. Resultados .....	26
5. Discussão .....	39
6. Conclusão .....	44
Referências .....	48
Anexo 1.....	51



**LISTA DE FIGURAS, QUADROS, TABELAS E GRÁFICOS**

<b>Figura 1.</b>	Demonstração esquemática da localização anatômica do nervo ciático de ratos, sua origem e ramificações	Página 11
<b>Figura 2.</b>	Demonstração do local de lesão do nervo ciático	Página 19
<b>Figura 3.</b>	Demonstração do local de lesão do nervo	Página 19
<b>Figura 4.</b>	Demonstração dos diferentes grupos de estudo e locais de aplicação do LED	Página 20
<b>Figura 5.</b>	Vista isométrica e vista superior do modelo da passarela utilizado para a avaliação do IFC	Página 22
<b>Figura 6.</b>	Representação dos parâmetros obtidos para cálculo do IFC	Página 22
<b>Figura 7.</b>	Caixa de acomodação sobre uma tela de arame utilizada na realização do teste de von Frey	Página 23
<b>Figura 8.</b>	Analgesímetro utilizado na realização do teste de von Frey	Página 24
<b>Figura 9.</b>	Resultados encontrados após análise da marcha através do índice funcional do ciático	Página 34
<b>Figura 10.</b>	Resultados encontrados após análise da atrofia muscular	Página 35
<b>Figura 11.</b>	Resultados encontrados após análise funcional de sensibilidade dolorosa	Página 36
<b>Figura 12.</b>	Avaliação qualitativa representando os grupos experimentais controle e lesão nos diferentes períodos avaliados	Página 37
<b>Figura 13.</b>	Avaliação qualitativa representando os grupos experimentais nos diferentes períodos avaliados	Página 38
<b>Quadro 1</b>	Parâmetros utilizados para o tratamento com LED	Página 20

**LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS**

ATP	ADENOSINA TRIFOSFATO
D	MASSA MUSCULAR DO MEMBRO NORMAL
E	MASSA MUSCULAR DO MEMBRO LESIONADO
IFC	ÍNDICE FUNCIONAL CIÁTICO
IT	INTERMEDIATE TOES (DISTÂNCIA ENTRE O 2º E 4º DEDO)
LBP	LASER DE BAIXA POTÊNCIA
LED	LIGHT EMITTING DIODE
LEDm	IRRADIAÇÃO LED NO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR
LEDn	IRRADIAÇÃO LED NA ÁREA CORRESPONDENTE À LESÃO NERVOSA
LEDnm	IRRADIAÇÃO LED NA ÁREA CORRESPONDENTE À LESÃO NERVOSA E MÚSCULO
LNP	LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS
NCE	NERVO CIÁTICO ESQUERDO
PL	PRINT LEGTH (COMPRIMENTO DA PATA)
R	RELAÇÃO DE MASSA MUSCULAR
TA	TIBIAL ANTERIOR
TAE	TIBIAL ANTERIOR ESQUERDO
TC	TECIDO CONJUNTIVO
TOF	TO OTHER FOOT (DISTÂNCIA ENTRE AS PATAS)
TS	TOTAL SPREAD OF TOES (DISTÂNCIA ENTRE O 1º E O 5º DEDO)

## 1. Contextualização

A lesão nervosa periférica (LNP) é um importante problema médico causado por acidentes com veículos automotores, trauma penetrante após incidentes com arma de fogo ou arma branca e por esmagamento ou estiramento do tecido nervoso após quedas, resultando em perda de controle neural nos segmentos desnervados do corpo, e deficiências graves para os pacientes. (KOUYOUMDJIAN, 2006; SOUZA et al., 2010).

No Brasil, não há estatísticas confiáveis acerca do número de pacientes vítimas das lesões neurológicas pós-traumáticas. Estima-se em 500.000, por ano, o número de novos casos nos Estados Unidos, cujo custo de tratamento hospitalar varia de 15.000 a 60.000 dólares por paciente. (SOUZA et al., 2010; RODRÍGUEZ et al., 2004)

Existe um consenso sobre a classificação das lesões nervosas em três classes (ou tipos, ou graus). Lesões leves afetam a bainha de mielina, lesões mais graves afetam o axônio, e as mais severas, o tecido conjuntivo (PARKER, 2002).

De acordo com essa classificação, Seddon (1975) descreve as lesões sendo a neuropraxia uma lesão leve com perda motora e sensitiva, sem alteração estrutural; axoniotmese é comumente vista em lesões por esmagamento ocorrendo perda de continuidade axonal e subsequente degeneração Walleriana do segmento distal (nesse tipo de lesão não ocorre perda de célula de Schwann, e a recuperação irá depender do grau de desorganização do nervo e também da distância do órgão terminal); neurotmeze como separação completa do nervo, com desorganização do axônio causada por uma fibrose tecidual com consequente interrupção do crescimento axonal. (SIQUEIRA, 2007).

O comprometimento na transmissão dos impulsos nervosos é uma das consequências desse tipo de lesão nervosa, que conduz a diversas alterações no sistema muscular, tais como atrofia muscular, proliferação do tecido conjuntivo (TC), mudanças na excitabilidade muscular e modificações nas células satélites. (CAVALCANTE, 2012)

As lesões de nervos periféricos resultam em déficits na transmissão dos impulsos nervosos e podem resultar em comprometimentos motores, sensoriais e autonômicos (MACHADO, 1998; MONTE-RASO et al., 2006). Os pacientes frequentemente queixam-se de dor, de diversa natureza e intensidade, sendo para muitos o sintoma mais significativo da lesão (MURRAY, 2005).

Na atrofia muscular há um aumento da concentração de calcineurina, sendo esta uma proteína ativada pelo aumento da concentração de cálcio. A ativação de

calcineurina altera o padrão de fenótipo de fibras musculares para fibras de fenótipo mais lento (ZHANG et al., 2007). Além disso, há uma alteração na concentração de miostatina, que é um fator regulador negativo de crescimento muscular. (BAUMANN et al., 2003). A miostatina inibe a ativação e diferenciação das células satélites em mioblastos e dos mioblastos em miotubos através da regulação negativa dos fatores regulatórios miogênicos (MRFs), como MyoD e miogenina (RODRIGUEZ et al., 2014).

Muitos modelos experimentais têm sido utilizados para adquirir conhecimentos sobre a regeneração nervosa e muscular e desenvolver estratégias para promover a recuperação (RODRÍGUEZ et al., 2004). O esmagamento, modelo utilizado na presente proposta, possui como característica a vantagem de não envolver as variáveis introduzidas na lesão por secção seguida de sutura. De fato, na lesão por esmagamento controlado há manutenção, ao menos em parte, da estrutura do nervo, o que facilita a regeneração, além de não haver necessidade de realizar a sutura, que requer treinamento prévio com as técnicas microcirúrgicas, além de instrumental e material adequados, em geral de alto custo. (MONTE-RASO, 2009)

De Medinaceli et al 1982, concluíram que uma lesão provocada por esmagamento é uma modalidade útil para o estudo de regeneração dos nervos periféricos, pois ela mimetiza um tipo de axoniotmese, na qual os danos são suficientes para romper o axônio, levando à degeneração Walleriana distal, mas o prognóstico de recuperação funcional é bom, devido à preservação das estruturas de sustentação, como a célula satélite, a membrana basal e o tecido conectivo de suporte.

O nervo ciático de ratos é um modelo confiável para estudar diferentes tipos de lesão e métodos de tratamento e o modelo de lesão por esmagamento é um dos mais utilizados uma vez que causa ruptura das fibras nervosas sem ruptura da maior parte das estruturas de sustentação do nervo, o que facilita a regeneração subsequente à lesão. (MONTE-RASO et al., 2009) Em humanos o nervo ciático se origina de L4-S3 e em ratos sua origem está situada em L4-L6 (BRUNNER et al., 1980; SWETT et al., 1986), sendo os principais ramos similares: tibial, fibular comum e nervo sural. (PRODANOV, 2006) Sabendo se de sua localização anatômica e suas ramificações pode se realizar uma lesão de maneira padronizada e reproduzível.



**Figura 1:** Demonstração esquemática da localização anatômica do nervo ciático de ratos, sua origem e ramificações. 1: n. pudendo, 2: n. glúteo cranial, 3: n. glúteo caudal, 4: n. ciático, 5: n.

sural, 6: n. fibular comum, 7: n. cut. sural med., 8: n. gastrocnêmicos lat., 9: n. gastrocnêmio med., 10: n. fibular superficial, 11: n. fibular profundo, 12: n. tibial (adaptado de Hebel e Stromberg, 1986).

A perda funcional pode ser recuperada se os axônios lesados crescerem, alcançarem o coto distal e restabelecerem conexões funcionais com o alvo muscular apropriado. Isso representa o principal objetivo dos métodos que visam a auxiliar a regeneração nervosa periférica: assegurar o retorno mais eficaz possível dos níveis funcionais existentes anteriormente à lesão. Atualmente, tem-se dado atenção ao desenvolvimento de abordagens não cirúrgicas para auxiliar o retorno funcional após a LNP. (POSSAMAI, 2012)

Clinicamente, as lesões ou doenças do nervo ciático se manifestam com dor de intensidade variável na região lombar baixa, com irradiação para a região glútea e para a região posterior do membro inferior ipsilateral. Alterações de sensibilidade e/ou déficits motores podem estar associadas. (AGONOLLITTO, 2017)

Dada a importância do tempo na recuperação funcional após uma lesão nervosa periférica, diferentes estudos têm sido conduzidos para melhor obter ou acelerar a recuperação do nervo periférico lesado, além de se evitar desajustes no córtex cerebral. (SIQUEIRA, 2007)

Estudos na literatura demonstram que a fototerapia tem sido utilizada como ferramenta para modulação do processo de reparo pós LNPs. Dentre os recursos mais utilizados destaca-se a terapia laser de baixa potência e mais recentemente a terapia com diodo emissor de luz (*LED*).

A terapia por diodo emissor de luz (*LEDT*, do inglês Light emitting diode therapy) é uma forma de fototerapia que utiliza como fonte de irradiação os LEDs (VINCK, E. et al., 2005). LEDs são diodos semicondutores (junção P-N) que quando energizados emitem luz (SCHUBERT, 2006)

Com a introdução dos diodos emissores de luz (*LED*) no mercado, muitos trabalhos surgiram em importantes bases de dados, demonstrando resultados promissores desta nova modalidade terapêutica (YEH, WU, CHENG, 2010). Resultados estes que suscitaram interesse para a realização do presente estudo utilizando o *LED* como recurso físico pelas vantagens desta fonte de luz que incluem baixo custo e fácil manipulação. Alguns estudos demonstram que a irradiação com luz não coerente provou ser mais rentável e pode ser tão eficiente quanto a irradiação laser (CASALECHI et al., 2009; CORAZZA et al., 2007).

Alguns estudos demonstram resultados satisfatórios do uso do *LED* em experimentação animal, tais como na cicatrização de feridas (WHELAN et al., 2001), modulação da dor (WHELAN et al., 2003) e neovascularização (CORAZZA et al., 2007),

induz uma redução significativa na inflamação, um aumento nas fibras musculares imaturas, uma diminuição na actividade de MMP-2 e um aumento em fibras de colágeno durante o processo de reparação após uma lesão aguda do músculo (MELO et al., 2016). Resultados positivos também são encontrados em humanos, tais como no rejuvenescimento de pele (LEE et al., 2007; TRELLES et al., 2006), alívio de distúrbios do sono e estresse (GLICKMAN et al., 2006), tratamento de acne (PAPAGEORGIU, KATSAMBAS, CHU, 2000) e mucosites (LANG-BICUDO et al., 2008).

Algumas diferenças importantes entre os aparelhos de LASER e LED podem ser citadas como: no LED encontramos aparelhagem menor; possuem longa vida útil; são confiáveis e requerem pouca energia; produzem feixe de luz incoerente, divergente com grande gama de comprimentos de onda; podem ser feitos para produzir múltiplos comprimentos de onda, estimulando uma ampla gama de tecidos; apresentam resposta rápida; pequeno custo; possui intensidade de geração de luz é menor; e por fim as sondas dos aparelhos de LED podem cobrir uma área de tratamento mais extensa. Já o Laser possui amplificação da Luz por emissão estimulada de radiação; são maiores em tamanho, com vida mais longa, porém necessitam de mais energia; produzem feixe de luz monocromática, coerente e colimada; os aparelhos de Laser são em geral produzidos com um comprimento de onda; resposta é ainda mais rápida; possuem alto custo; sua intensidade de geração de luz é maior e por fim as sondas dos aparelhos de Laser cobrem uma pequena área de tratamento (SCHUBERT, 2006 *apud* SILVA, 2011).

Os LEDs são semicondutores que convertem corrente elétrica em um espectro luminoso não coerente. A luz emitida vai do comprimento de onda do ultravioleta ao visível e ao infravermelho, que vai dos 247 aos 1300 nanômetros (nm). As cores mais usadas são: Azul (400-470nm), Verde (470-550nm), Vermelho (630-700nm), Infravermelho (700-1200nm). Uma diferença significativa entre lasers e LEDs é o modo como a energia luminosa é liberada. (DOURADO, 2011)

O LED dispersa a luz por uma superfície maior comparada com o laser e pode ser usada onde grandes áreas são indicadas ao tratamento, resultando em redução no tempo de tratamento. Segundo os parâmetros utilizados, os efeitos biológicos dependem de: comprimento de onda, dose (fluência), intensidade (densidade de potência), tempo de irradiação, modo contínuo ou pulsado da onda, e padrões de pulso, por exemplo. Clinicamente, fatores como frequência, intervalo entre os tratamentos e número total de tratamentos são considerados. Quanto à segurança, o LED é seguro, não é térmico, nem tóxico e invasivo, e não há relato na literatura de efeitos colaterais. (BAROLET, 2008)

Com a utilização da terapia LED, há o incremento da adenosina trifosfato (ATP), aumento na síntese proteica, estimulação para neoangiogênese, contribuição nutricional, que está associada ao aumento da atividade mitótica e resultando numa facilitação para a multiplicação celular e formação de novos tecidos e vasos. O LED então surgiu como uma inovação por ser portátil e de fácil aplicação e ter maior vida útil em relação às outras modalidades de fototerapia, como o laser. (MOURA, 2015)

O custo de um equipamento de laser comparado a o diodo emissor de luz (LED) é maior, o que dificulta o acesso, no caso de pessoas com baixa condição econômica. Sendo a coerência uma das características que diferencia o laser do LED, este último é considerado uma alternativa ao tratamento a laser de baixa intensidade. (DOURADO, 2011)

## **Justificativa**

O estabelecimento de forma segura e controlada de protocolos em modelos experimentais que permitam otimizar o reparo muscular e nervoso após LNP e o entendimento dos mecanismos envolvidos contribuirá de forma ímpar para os avanços da reabilitação nesta área e será o ponto de partida para que futuros ensaios clínicos possam ser delineados e conduzidos com maior segurança. Dessa forma, este estudo visa investigar os efeitos terapêuticos (morfológicos e funcionais) do LED quando aplicado tanto no tecido muscular quanto nervoso, uma vez que já foi demonstrado na literatura os efeitos positivos deste recurso em cada tecido separadamente, contudo a associação da aplicação deste recurso em ambos tecidos de forma a otimizar o efeito ainda não foi avaliada.



## **2. Objetivo**

### **2.1 Geral**

Analisar os efeitos do LED sobre o reparo neuromuscular de ratos Wistar pós lesão por esmagamento do nervo ciático.

### **2.2 Específico**

Avaliar os efeitos do LED em ratos Wistar pós lesão por esmagamento do nervo ciático no que se refere a:

- ✓ Grau de atrofia muscular
- ✓ Aspectos funcionais, incluindo a análise do Índice Funcional do Ciático e hiperalgesia mecânica.
- ✓ Avaliar comparativamente as diferenças nestes aspectos dependendo da região que recebeu tratamento (nervo, músculo ou ambos)

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Local

O estudo foi realizado no laboratório de pesquisa do curso de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação, localizado na Unidade Vergueiro, 3º subsolo, da Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

#### 3.2 Animais

Foram utilizados 85 ratos da linhagem Wistar, pesando entre 200-250g mantidos no biotério da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, temperatura ambiente entre 22° - 27°C e luminosidade controlada com ciclo de 12 horas (claro/escuro), com comida e água *ad libitum*.

O projeto foi aprovado pelo CEUA – UNINOVE nºAN009.2016.

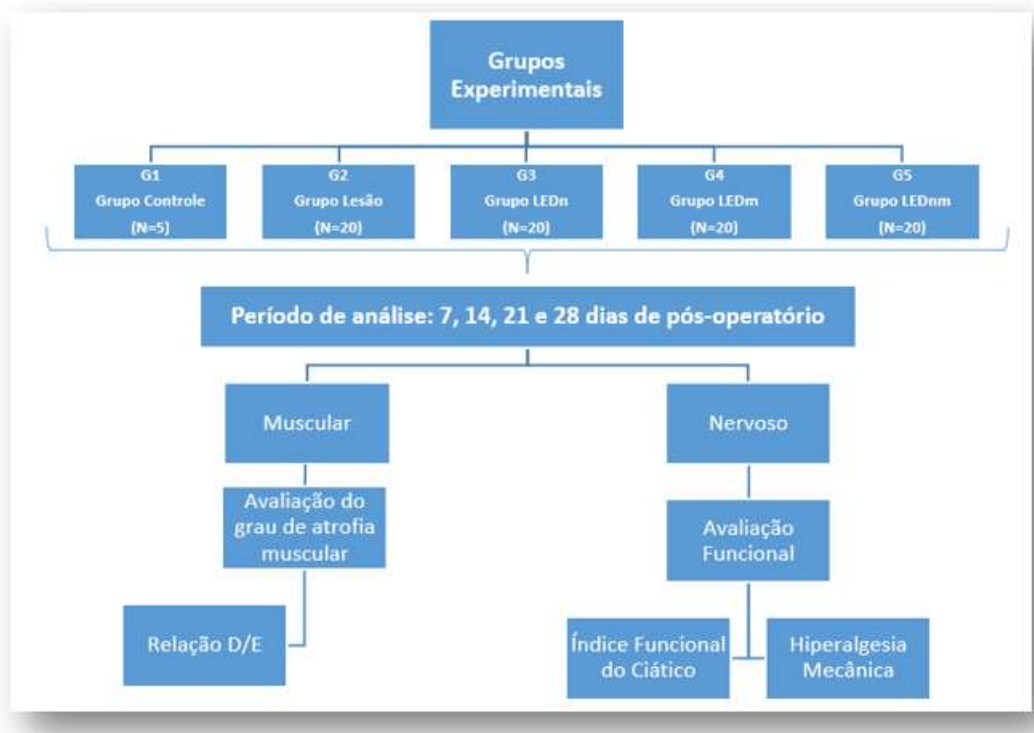
#### Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos:

- **Grupo Controle:** os animais não foram submetidos a nenhum procedimento (n=5);
- **Grupo Lesão:** realizado apenas o esmagamento do NIE dos animais (n=20) sem nenhum tipo de tratamento;
- **Grupo Lesão+LEDn:** realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberam tratamento com irradiação LED na área correspondente à lesão nervosa (n=20);
- **Grupo Lesão+LEDm:** realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberam tratamento com irradiação LED no músculo (n=20);
- **Grupo Lesão+LEDnm:** realizado o esmagamento do NIE dos animais do grupo e estes receberam tratamento com irradiação LED na área correspondente à lesão nervosa e também no músculo (n=20);

Os animais foram eutanasiados em 7, 14, 21 e 28 dias de pós-operatório (cinco animais por período), justificando assim o número de 20 animais por grupo. A lesão foi realizada somente no lado esquerdo, pois o lado direito foi utilizado como controle interno no índice de massa muscular, inviabilizando a bilateralidade da lesão.

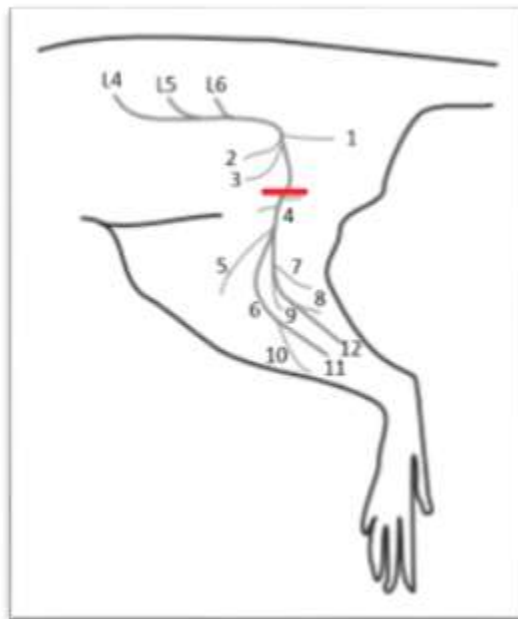
## Fluxograma da Metodologia do Estudo



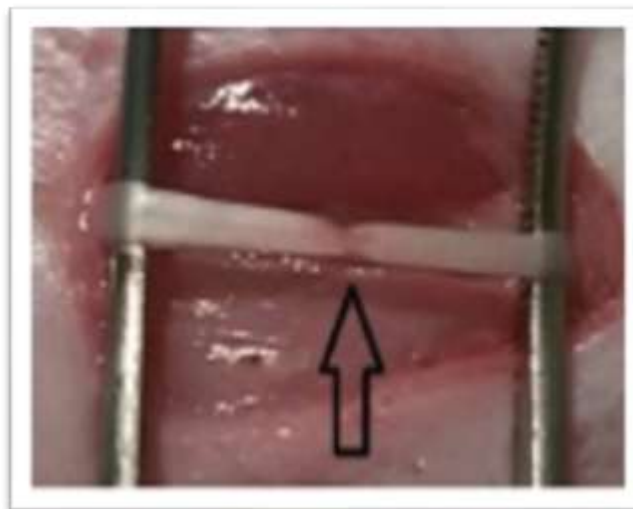
### 3.3 Procedimento cirúrgico

O procedimento de esmagamento do nervo ciático foi realizado conforme descrito por Salgado et al. (2011) e Belchior et al. (2009). Após os animais terem sido anestesiados com injeção intraperitoneal utilizando-se uma mistura de ketamina 10% (100 mg/Kg de peso do animal) e de xylazina 2% (10 mg/Kg de peso do animal). Para aplicação da anestesia foi utilizada seringas da marca BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina com a agulha Ultra-Fine® (regular), comprimento: 12,7 mm, calibre: 0,33 mm e bisel trifacetado.

Os animais foram tricotomizados, posicionados em decúbito lateral direito e limpos com uma solução de clorexidina 2% na face posterior da coxa. Foi realizada uma incisão cutânea retilínea paralela ao ísquio e o nervo ciático foi isolado das demais estruturas, sendo realizado o esmagamento utilizando uma pinça hemostática com trava (Rhosse Instrumentos e Equipamentos Cirúrgicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil) 5mm acima da ramificação por meio de uma compressão com duração de 30s cada exercendo uma pressão de 6.3MPa (Salgado et al. 2011; Belchior et al. 2009). Este procedimento foi realizado pelo mesmo operador em todos os animais. Em seguida foi realizada a sutura das áreas incisadas utilizando-se fio de poliamida (Mononylon 6/0) e os animais foram mantidos em sala de observação em mantas aquecidas.



**Figura 2:** Demonstração do local de lesão do nervo ciático (adaptado de Hebel e Stromberg, 1986).



**Figura 3:** Demonstração do local de lesão do nervo

Este modelo é de fácil execução e alta reprodutibilidade exigindo o mínimo de conhecimento de técnica microcirúrgica e de instrumental e com reduzido custo de material. (BOCCABELLA et al., 1964)

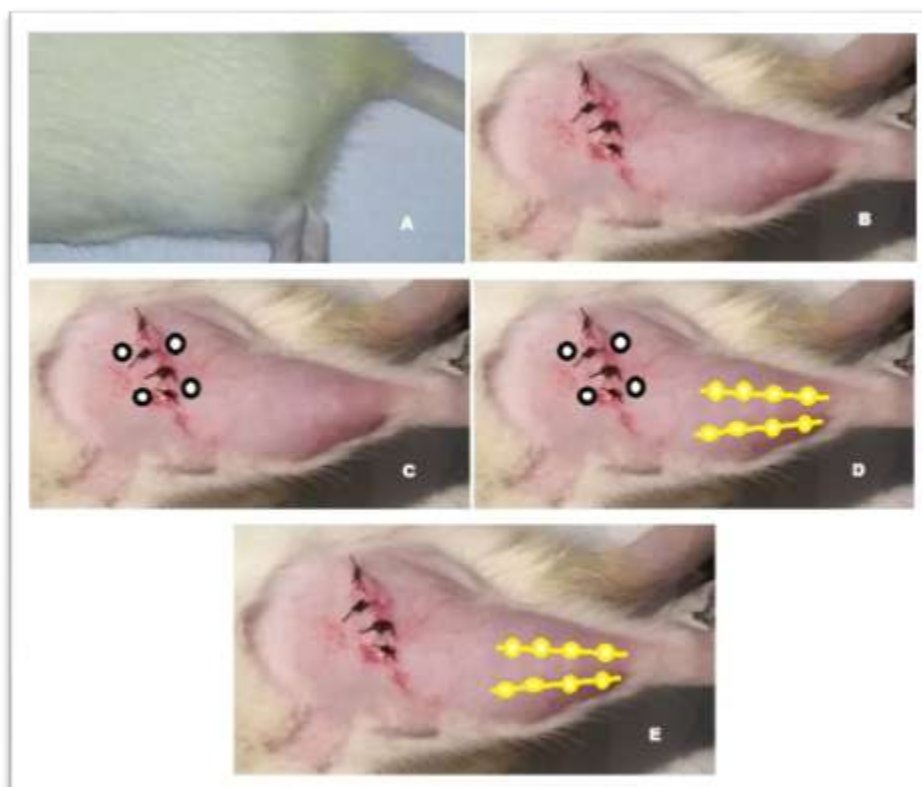
Nos quatro primeiros dias de pós-operatório, cloridrato de tramadol (5mg/kg de peso animal) e dipirona (50mg/kg peso animal) foram administrados por via subcutânea de 8/8h para analgesia e uma dose única de oxitetracina dihidratada subcutânea (0,1mL/kg, Terramicina LA, Pfizer Inc, Guarulhos, SP) foi administrada para profilaxia de complicações secundárias à possíveis infecções (SILVA-COUTO et al. 2012).

### 3.4 Irradiação com LED

A irradiação com LED foi realizada com base nos parâmetros descritos anteriormente por Melo *et al.* (2016) sendo utilizado um protótipo de diodo emissor de luz (LED) desenvolvido pelo professor Alessandro Melo Deana da UNINOVE. Os parâmetros utilizados estão descritos no quadro 1.

Local de irradiação	Muscular	Nervoso
Comprimento de onda	808 nm	808 nm
Área do feixe	1 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>
Potência média	40 mW	40 mW
Densidade de potência	0.04 W/cm <sup>2</sup>	0.04 W/cm <sup>2</sup>
Densidade de energia	0.4 J/cm <sup>2</sup>	0.8 J/cm <sup>2</sup>
Energia por ponto	0.4J	0.8J
Total de pontos	8 pontos	4 pontos
Tempo por ponto	10s	20s
Tempo total	80s	80s
Energia total	3.2J	3.2J

**Quadro 1:** Parâmetros utilizados para o tratamento com LED



**Figura 4:** Demonstração dos diferentes grupos de estudo e locais de aplicação do LED, sendo os pontos amarelos indicativos da irradiação no músculo e pontos brancos na região da lesão nervosa. A- Grupo Controle; B- Grupo Lesão; C- Lesão+LEDn; D- Lesão+LEDnm; E- Lesão+LEDm.

Para evitar refração do feixe do LED foi utilizado para aplicação o ângulo de 90 graus entre o emissor e a pele do animal.

Nos grupos com irradiação LED pós lesão o tratamento foi iniciado 2h após a realização do procedimento, sendo realizada uma única aplicação diária por 5 dias consecutivos semanalmente em cada grupo experimental até a finalização do período experimental de cada grupo. Foi utilizada a técnica pontual diretamente sobre a região da incisão (nos grupos com irradiação na área correspondente à lesão nervosa).

Nos grupos que receberam o tratamento também no músculo, a irradiação foi realizada diretamente no músculo tibial anterior em 8 pontos (ROCHKIND, 2013).

### **3.5 Eutanásia**

Todos os animais foram eutanasiados com superdose anestésica a base de ketamina 10% (300 mg/Kg de peso do animal) e de xylazina 2% (30 mg/Kg de peso do animal) administrado via intraperitoneal. Para aplicação foram utilizadas seringas da marca BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina com a agulha Ultra-Fine® (regular), comprimento: 12,7 mm, calibre: 0,33 mm e bisel trifacetado.

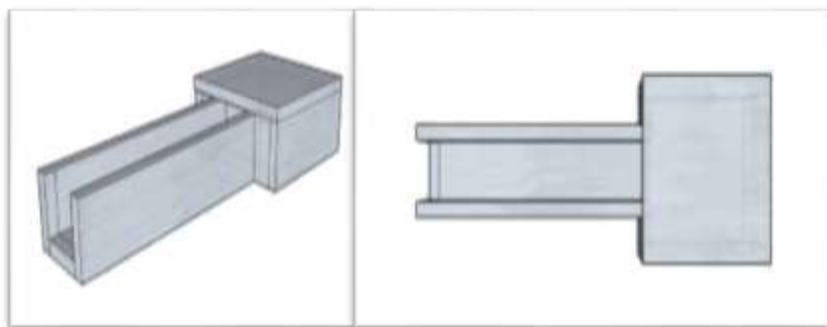
O tecido nervoso correspondente à área de lesão (NIE) foi retirado para futura análise histológica e os músculos TA foram removidos e pesados para análise da massa muscular e o TAE foi seccionado transversalmente, a porção inferior será futuramente utilizada para análises histológica e de colágeno.

### **3.6 Análise funcional da marcha**

A análise funcional de marcha foi realizada utilizando o Índice Funcional Ciático (IFC) (De Medicaneli, Freed e Wyatt, 1982), descrito anteriormente por Bain 1989, sendo obtidas impressões digitais dos animais pelo método de Lowdon 1988.

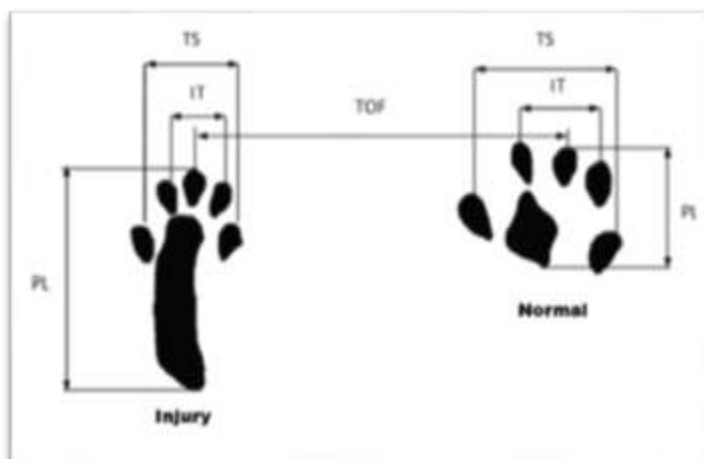
Para este procedimento folhas de papel sulfite foram mergulhadas em solução de azul de bromofenol (1%), para depois de secas ficarem na cor laranja. Foram utilizadas tiras de papel sulfite com 43cmx8,7cm (as dimensões da passarela). Para obtenção das pegadas, as patas foram embebidas em detergente de uso comum, deixando a cor azul impressa nas tiras de sulfite.

Os animais aprenderam a caminhar na passarela antes do procedimento cirúrgico, o dispositivo foi confeccionado seguindo o método de DE MEDICANELI et al. (1982) fechada nas laterais, contendo uma casinhola no final (figura 5).



**Figura 5:** Vista isométrica e vista superior do modelo da passarela utilizado para o IFC (desenhado com o SketchUp make, versão 15.3.331, 2015, Trimble Navigation Limited).

As impressões das patas foram digitalizadas e analisadas os parâmetros sugeridos por Bain et al. (1989), conforme figura 7: comprimento da pegada (PL, ou *print length*), abertura total dos dedos (do 1º ao 5º dedo – TS ou *total spread of toes*), a abertura dos dedos intermediários (do 2º ao 4º dedo (IT ou *intermediate toes*) e a distância ao pé oposto (TOF ou *to other foot*).



**Figura 6:** Representação dos parâmetros obtidos para cálculo do IFC, da esquerda para a direita estão representadas as patas do nervo lesionado e normal. Exemplo da imagem obtida após o teste.

O IFC foi calculado a partir da fórmula:

$$IFC = -38,3 \times \left( \frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109,5 \times \left( \frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13,3 \times \left( \frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8,8$$

Sendo:

E: experimental

N: normal

TOF: distância entre as patas

PL: comprimento da pata

TS: distância entre o 1º e o 5º dedo

IT: distância entre o 2º e 4º dedo

IFC: Índice Funcional do Ciático

Os resultados próximos de zero correspondem à função normal, quanto maior a negatividade do resultado, maior a disfunção, sendo o valor máximo -100 que representaria à maior disfunção (BAIN et al. 1989).

### 3.7 Análise da hiperalgesia mecânica (Teste de von Frey)

O teste de von Frey foi realizado para avaliar a hiperalgesia mecânica, sendo realizada de acordo com o descrito por TAKASAKI et al. (2000).

Os animais foram acondicionados em uma caixa transparente sobre uma tela de arame para acesso à superfície plantar da pata dos mesmos sendo habituados por 20min, antes da execução de cada teste e nos três dias que antecedem a primeira coleta sendo habituados por uma hora em ambiente sem nenhum tipo de interrupção sonora que puder interferir na realização do teste (agitando os animais).

Para realização do teste foi utilizado o analgesímetro digital Insight Ltda (Ribeirão Preto/SP, Brasil) com transdutor com capacidade de 0,1-1000g e tempo de reação de 1ms. O transdutor de pressão foi conectado a um contador digital de força que expressou o resultado da pressão detectada em gramas. O contato do transdutor com a superfície plantar foi realizado por intermédio de uma ponteira descartável de polipropileno de 0,5mm de diâmetro acoplada à ponta do transdutor, sendo percutido por três vezes na região plantar da pata traseira esquerda (correspondente à área acometida) e a média aritmética da resposta de retirada foi obtida a partir dessas três medidas.



**Figura 7:** Caixa de acomodação sobre uma tela de arame para acesso à superfície plantar da pata, utilizada na realização do teste de VonFrey.





**Figura 8:** Analgesímetro utilizado na realização do teste de von Frey.

### 3.8 Análise da massa muscular e grau de atrofia

Após a eutanásia dos animais nos diferentes períodos de análise, os músculos TA direito e esquerdo foram cuidadosamente removidos por meio da ressecção do tendão de origem e da inserção óssea e limpos conforme descrito anteriormente (SHEN, 2013). Os músculos foram pesados em uma balança semi-analítica e para cada animal foi calculada a relação de massa muscular usando a seguinte fórmula:

$$r = \frac{E}{D}$$

Sendo:

R: relação de massa muscular

E: massa muscular do membro lesionado

D: massa muscular do membro normal

Conforme descrito por SHEN et al. (2013).

### **3.9 Avaliação qualitativa e quantitativa dos aspectos morfológicos musculares**

As amostras musculares foram também utilizadas para análise morfológica e para este procedimento serão fixadas e mantidas em temperatura ambiente em formol tamponado a 10% (pH 8,0).

Em seguida, foi realizada a desidratação do material por meio de incubações em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%) num período de 1h cada, passados três vezes em álcool absoluto e três vezes em Xilol (Reagen). As amostras foram incubadas por 12h a 60°C em parafina (paraplast, Sigma, USA) e incluídas transversalmente com as porções centrais posicionadas mais externamente no bloco, 3 cortes de 10µm de espessura foram realizados no micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha) sendo colocados em lâminas de microscopia e mantidos em estufa a 37°C durante 12 horas.

As lâminas foram submetidas às colorações histológicas de hematoxilina e eosina (HE) e avaliadas por microscopia de luz (microscópio Axioplan 2, Zeiss, Alemanha).

Para permitir a análise quantitativa destes aspectos foram consideradas 5 áreas por lâmina de 5 animais/grupo. Esses campos foram fotografados utilizando um microscópio de luz convencional (Zeiss Axioplan2, Alemanha) com aumento final de 400X, para permitir a contagem dos aspectos descritos.

A análise foi realizada através do software Image J (National Institute of Health - NIH, EUA).

### **3.10 Análise estatística**

Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism, versão 5.00 (GraphPad Software San Diego, California, USA). A distribuição de normalidade foi avaliada pelo teste Komolgorov-Smirnov. Os dados foram expressos em média e desvio padrão, sendo submetidos ao teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os níveis de confiança foram ajustados para 95% ( $p \leq 0,05$ ).

## 4. Resultados

### Artigo 1: EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO DO NERVO PERIFÉRICO. Artigo publicado na revista *Lasers in Medical Science* (Anexo 1)

Lasers Med Sci  
<http://doi.org/10.1007/s10103-017-2359-7>



REVIEW ARTICLE

## Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury

L. Andreo<sup>1</sup> · C. B. Soldera<sup>2</sup> · B. G. Ribeiro<sup>2</sup> · P. R. V. de Matos<sup>3</sup> · S. K. Bussadori<sup>1,2</sup> · K. P. S. Fernandes<sup>1</sup> · R. A. Mesquita-Ferrari<sup>1,2</sup>

Received: 19 June 2017 / Accepted: 10 October 2017  
© Springer-Verlag London Ltd. 2017

**Abstract** Phototherapy has demonstrated positive effects in the treatment of peripheral nerve injury, but there is a need to investigate the dosimetric parameters. Thus, the aim of the present study was to conduct a literature review on the effects of photobiomodulation with the use of low-level laser therapy (LLLT) on the treatment of peripheral nerve injury in experimental models. The databases of PubMed/MEDLINE, SCOPUS, and SPIE Digital Library were searched for articles on the use of LLLT in experimental models of peripheral nerve injury published in English between January 2007 and March 2016. The laser parameter variability was wavelength (632.8 to 980 nm), power (10 to 190 mW), and total energy (0.15 to 90 J) in pulsed or continuous wave and single or multiple points. Eighteen original articles demonstrating the effects of LLLT on the acceleration of functional recovery, morphological aspects as well as the modulation of the expression inflammatory cytokines, and growth factors were selected. LLLT is a viable phototherapeutic modality for the treatment of peripheral nerve injury, demonstrating positive effects on the neuromuscular repair process using either red or infrared light. The majority of studies used a power of up to 50 mW and total energy of up to 15 J administered to multiple points. The determination of these parameters is important to the

## Artigo 2: Artigo submetido

---

### EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO UTILIZANDO LED SOBRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS MUSCULARES E REPARO DO TECIDO NERVOSO PÓS LESÃO DE NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS WISTAR

---

**Carla Bernardo Soldera<sup>1\*</sup>; Lucas Andreo Dias dos Santos<sup>2</sup>; Beatriz Guimarães Ribeiro<sup>2</sup>; Paula Binda Sousa<sup>3</sup>; Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana<sup>2</sup>; Sandra Kalil Bussadori<sup>2</sup>; Alessandro Melo Deana<sup>2</sup>; Kristianne Porta Santos Fernandes<sup>2</sup>; Raquel Agnelli Mesquita Ferrari<sup>1,2</sup>**

*1 - Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade Nove de Julho, rua Vergueiro, 235 São Paulo, SP*

*2 - Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, rua Vergueiro, 235 São Paulo, SP*

*3 - Graduation in Physiotherapy, Universidade Nove de Julho, rua Vergueiro, 235 São Paulo, SP*

*\*Corresponding author: carlabs@uninove.br*

A lesão nervosa periférica (LNP) é um importante problema médico causado por acidentes com veículos automotores, trauma penetrante após incidentes com arma de fogo ou arma branca e por esmagamento ou estiramento do tecido nervoso após quedas, resultando em perda de controle neural nos segmentos desnervados do corpo, e deficiências graves para os pacientes. (KOUYOUMDJIAN, 2006; SOUZA et al., 2010).

Muitos modelos experimentais têm sido utilizados para adquirir conhecimentos sobre a regeneração nervosa e muscular e desenvolver estratégias para promover a recuperação (RODRÍGUEZ et al, 2004). No esmagamento, modelo utilizado na presente proposta, há manutenção, ao menos em parte, da estrutura do nervo, o que facilita a regeneração, além de não haver necessidade de realizar a sutura, que requer treinamento prévio com as técnicas microcirúrgicas, além de instrumental e material adequados, em geral de alto custo. (MONTE-RASO, 2009)

O nervo isquiático de ratos é um modelo confiável para estudar diferentes tipos de lesão e métodos de tratamento e o modelo de lesão por esmagamento é um dos mais utilizados uma vez que causa ruptura das fibras nervosas sem ruptura da maior parte das estruturas de sustentação do nervo, o que facilita a regeneração subsequente à lesão. (MONTE-RASO et al., 2009)

A perda funcional pode ser recuperada se os axônios lesados crescerem, alcançarem o coto distal e restabelecerem conexões funcionais com o alvo muscular apropriado. Isso representa o principal objetivo dos métodos que visam a auxiliar a regeneração nervosa periférica: assegurar o retorno mais eficaz possível dos níveis funcionais existentes anteriormente à lesão. Atualmente, tem-se dado atenção ao desenvolvimento de abordagens não cirúrgicas para auxiliar o retorno funcional após a LNP. (POSSAMAI, 2012)

Estudos na literatura demonstram que a fototerapia tem sido utilizada como ferramenta para modulação do processo de reparo pós LNPs. Dentre os recursos mais

utilizados destaca-se a terapia laser de baixa potência e mais recentemente a terapia com diodo emissor de luz (*LED*).

Com a introdução dos diodos emissores de luz (*LED*) no mercado, muitos trabalhos surgiram em importantes bases de dados, demonstrando resultados promissores desta nova modalidade terapêutica (YEH, WU, CHENG, 2010). Resultados estes que suscitaram interesse para a realização do presente estudo utilizando o *LED* como recurso físico pelas vantagens desta fonte de luz que incluem baixo custo e fácil manipulação. Alguns estudos demonstram que a irradiação com luz não coerente provou ser mais rentável e pode ser tão eficiente quanto a irradiação laser (CASALECHI et al., 2009; CORAZZA et al., 2007).

O estabelecimento de forma segura e controlada de protocolos em modelos experimentais que permitam otimizar o reparo muscular e nervoso após LNP e o entendimento dos mecanismos envolvidos contribuirá de forma ímpar para os avanços da reabilitação nesta área e será o ponto de partida para que futuros ensaios clínicos possam ser delineados e conduzidos com maior segurança. Dessa forma, este estudo visa investigar os efeitos terapêuticos (morfológicos e funcionais) do LED quando aplicado tanto no tecido muscular quanto nervoso, uma vez que já foi demonstrado na literatura os efeitos positivos deste recurso em cada tecido separadamente, contudo a associação da aplicação deste recurso em ambos tecidos de forma a otimizar o efeito ainda não foi avaliada.

O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos do LED sobre o reparo neuromuscular de ratos Wistar pós lesão por esmagamento do nervo isquiático no que se refere a avaliação do grau de atrofia muscular, aspectos funcionais, incluindo a análise do Índice Funcional do Ciático e hiperalgesia mecânica.

## **MATERIAIS E MÉTODO**

O estudo foi realizado no laboratório de pesquisa do curso de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação, localizado na Unidade Vergueiro, 3º subsolo, da Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

Foram utilizados 85 ratos da linhagem Wistar, pesando entre 200-250g mantidos no biotério da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, temperatura ambiente entre 22° - 27°C e luminosidade controlada com ciclo de 12 horas (claro/escuro), com comida e água *ad libitum*.

O projeto foi aprovado pelo CEUA – UNINOVE nºAN009.2016.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: Grupo Controle: os animais não foram submetidos a nenhum procedimento (n=5); Grupo Lesão: realizado apenas o esmagamento do NIE dos animais (n=20) sem nenhum tipo de tratamento; Grupo Lesão+LEDn: realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberam tratamento com irradiação LED na área correspondente à lesão nervosa (n=20); Grupo Lesão+LEDmm: realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberam tratamento com irradiação LED no músculo (n=20); Grupo Lesão+LEDn+LEDmm: realizado o esmagamento do NIE dos animais do grupo e estes receberam tratamento com irradiação LED na área correspondente à lesão nervosa e também no músculo (n=20);

Os animais foram eutanasiados em 7, 14, 21 e 28 dias de pós-operatório (cinco animais por período), justificando assim o número de 20 animais por grupo. A lesão foi realizada somente no lado esquerdo, pois o lado direito foi utilizado como controle interno no índice de massa muscular, inviabilizando a bilateralidade da lesão.

O procedimento de esmagamento do nervo isquiático foi realizado conforme descrito por Salgado et al. (2011) e Belchior et al. (2009). Após os animais terem sido anestesiados com injeção intraperitoneal utilizando-se uma mistura de ketamina 10% (100 mg/Kg de peso do animal) e de xylazina 2% (10 mg/Kg de peso do animal). Para aplicação da anestesia foi utilizada seringas da marca BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina com a agulha Ultra-Fine® (regular), comprimento: 12,7 mm, calibre: 0,33 mm e bisel trifacetado.

Os animais foram tricotomizados, posicionados em decúbito lateral direito e limpos com uma solução de clorexidina 2% na face posterior da coxa. Foi realizada uma incisão cutânea retilínea paralela ao ísquio e o nervo isquiático será isolado das demais estruturas, sendo realizado o esmagamento utilizando uma pinça hemostática com trava (Rhosse Instrumentos e Equipamentos Cirúrgicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil) 5mm acima da ramificação por meio de uma compressão com duração de 30s cada exercendo uma pressão de 6.3MPa (Salgado et al., 2011; Belchior et al., 2009). Este procedimento foi realizado pelo mesmo operador em todos os animais. Em seguida foi realizada a sutura das áreas incisadas utilizando-se fio de poliamida (Mononylon 6/0) e os animais foram mantidos em sala de observação em mantas aquecidas.

Nos quatro primeiros dias de pós-operatório, cloridrato de tramadol (5mg/kg de peso animal) e dipirona (50mg/kg peso animal) foram administrados por via subcutânea de 8/8h para analgesia e uma dose única de oxitetracina dihidratada subcutânea (0,1mL/kg, Terramicina LA, Pfizer Inc, Guarulhos, SP) foi administrada para profilaxia de complicações secundárias à possíveis infecções (SILVA-COUTO et al., 2012).

A irradiação com LED foi realizada com base nos parâmetros descritos anteriormente por Melo *et al.* (2016) sendo utilizado um protótipo de diodo emissor de luz (LED) desenvolvido pelo professor Alessandro Melo Deana da UNINOVE. Os parâmetros utilizados estão descritos no quadro abaixo.

Local de irradiação	Muscular	Nervoso
Comprimento de onda	808 nm	808 nm
Área do feixe	1 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>
Potência média	40 mW	40 mW
Densidade de potência	0.04 W/cm <sup>2</sup>	0.04 W/cm <sup>2</sup>
Densidade de energia	0.4 J/cm <sup>2</sup>	0.8 J/cm <sup>2</sup>
Energia por ponto	0.4J	0.8J
Total de pontos	8 pontos	4 pontos
Tempo por ponto	10s	20s
Tempo total	80s	80s
Energia total	3.2J	3.2J

Quadro 1: Parâmetros utilizados para o tratamento com LED

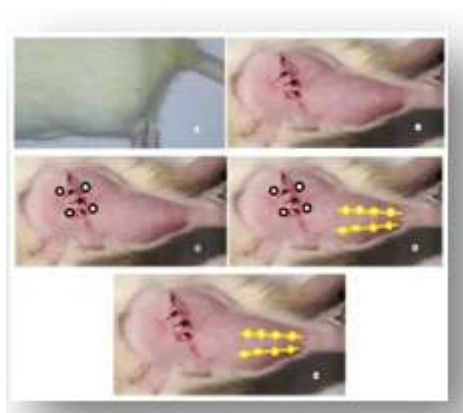


Figura1: Demonstração dos diferentes grupos de estudo e locais de aplicação do LED, sendo os pontos amarelos indicativos da irradiação no músculo e pontos brancos na região da lesão nervosa. A- Grupo Controle; B- Grupo Lesão; C- Lesão+LEDn; D- Lesão+LEDnm; E- Lesão+LEDm.

Para evitar refração do feixe do LED foi utilizado para aplicação o ângulo de 90 graus entre o emissor e a pele do animal.

Nos grupos com irradiação LED pós lesão o tratamento foi iniciado 2h após a realização do procedimento, sendo realizada uma única aplicação diária por 5 dias consecutivos semanalmente em cada grupo experimental até a finalização do período experimental de cada grupo. Foi utilizada a técnica pontual diretamente sobre a região da incisão (nos grupos com irradiação na área correspondente à lesão nervosa).

Nos grupos que receberam o tratamento também no músculo, a irradiação foi realizada diretamente no músculo tibial anterior em 8 pontos (ROCHKIND, 2013).

Todos os animais foram eutanasiados com superdose anestésica a base de ketamina 10% (300 mg/Kg de peso do animal) e de xylazina 2% (30 mg/Kg de peso do animal) administrado via intraperitoneal. Para aplicação foram utilizadas seringas da marca BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina com a agulha Ultra-Fine® (regular), comprimento: 12,7 mm, calibre: 0,33 mm e bisel trifacetado.

O tecido nervoso correspondente à área de lesão (NIE) foi retirado para futura análise histológica e os músculos TA foram removidos e pesados para análise da massa muscular e o TAE foi seccionado transversalmente, a porção inferior foi utilizada para análises histológica.

### Análise funcional da marcha

A análise funcional de marcha foi realizada utilizando o Índice Funcional Ciático (IFC) (De Medicaneli, Freed e Wyatt, 1982), descrito anteriormente por Bain 1989, sendo obtidas impressões digitais dos animais pelo método de Lowdon 1988.

Para este procedimento folhas de papel sulfite foram mergulhadas em solução de azul de bromofenol (1%), para depois de secas ficarem na cor laranja. Foram utilizadas tiras de papel sulfite com 43cmx8,7cm (as dimensões da passarela). Para obtenção das pegadas, as patas foram embebidas em detergente de uso comum, deixando a cor azul impressa nas tiras de sulfite.

Os animais aprenderam a caminhar na passarela antes do procedimento cirúrgico, o dispositivo foi confeccionado seguindo o método de DE MEDICANELI et al., (1982) fechada nas laterais, contendo uma casinhola no final.

As impressões das patas foram digitalizadas e analisadas os parâmetros sugeridos por Bain et al., (1989), conforme figura 7: comprimento da pegada (PL, ou *print length*), abertura total dos dedos (do 1º ao 5º dedo – TS ou *total spread of toes*), a abertura dos dedos intermediários (do 2º ao 4º dedo (IT ou *intermediate toes*) e a distância ao pé oposto (TOF ou *to other foot*).

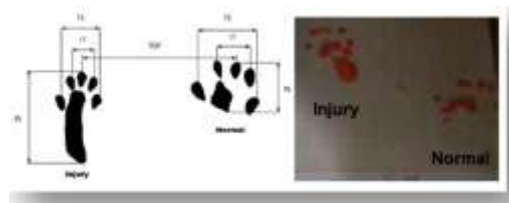


Figura3: Representação dos parâmetros obtidos para cálculo do IFC, da esquerda para a direita estão representadas as patas do nervo lesionado e normal. Exemplo da imagem obtida após o teste.

O IFC foi calculado a partir da fórmula:

$$IFC = -38,3 \times \left( \frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109,5 \times \left( \frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13,3 \times \left( \frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8,8$$

Sendo:  
E: experimental  
N: normal



TOF: distância entre as patas  
 PL: comprimento da pata  
 TS: distância entre o 1º e o 5º dedo  
 IT: distância entre o 2º e 4º dedo  
 IFC: Índice Funcional do Ciático

Os resultados próximos de zero correspondem à função normal, quanto maior a negatividade do resultado, maior a disfunção, sendo o valor máximo -100 que representaria à maior disfunção (BAIN et al., 1989).

### **Teste de von Frey**

O teste de von Frey foi realizado para avaliar a hiperalgesia mecânica, sendo realizada de acordo com o descrito por Takasaki et al., (2000).

Os animais foram acondicionados em uma caixa transparente sobre uma tela de arame para acesso à superfície plantar da pata dos mesmos sendo habituados por 20min, antes da execução de cada teste e nos três dias que antecedem a primeira coleta sendo habituados por uma hora em ambiente sem nenhum tipo de interrupção sonora que puder interferir na realização do teste (agitando os animais).

Para realização do teste foi utilizado o analgesímetro digital Insight Ltda (Ribeirão Preto/SP, Brasil) com transdutor com capacidade de 0,1-1000g e tempo de reação de 1ms. O transdutor de pressão foi conectado a um contador digital de força que expressou o resultado da pressão detectada em gramas. O contato do transdutor com a superfície plantar foi realizado por intermédio de uma ponteira descartável de polipropileno de 0,5mm de diâmetro acoplada à ponta do transdutor, sendo percutido por três vezes na região plantar da pata traseira esquerda (correspondente à área acometida) e a média aritmética da resposta de retirada foi obtida a partir dessas três medidas.

### **Análise da massa muscular**

Após a eutanásia dos animais nos diferentes períodos de análise, os músculos TA direito e esquerdo foram cuidadosamente removidos por meio da ressecção do tendão de origem e da inserção óssea e limpos conforme descrito anteriormente (SHEN, 2013). Os músculos foram pesados em uma balança semi-analítica e para cada animal foi calculada a relação de massa muscular usando a seguinte fórmula:

$$r = \frac{E}{D}$$

Sendo:

R: relação de massa muscular

E: massa muscular do membro lesionado

D: massa muscular do membro normal

Conforme descrito por SHEN et al. (2013).



Figura4: Análise macroscópica de músculo lesionado sem tratamento com sinais de atrofia muscular no período de 14dias.

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism, versão 5.00 (GraphPad Software San Diego, California, USA). A distribuição de normalidade foi avaliada pelo teste Komolgorov-Smirnov. Os dados foram expressos em média e desvio padrão, sendo submetidos ao teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os níveis de confiança foram ajustados para 95% ( $p \leq 0,05$ ).

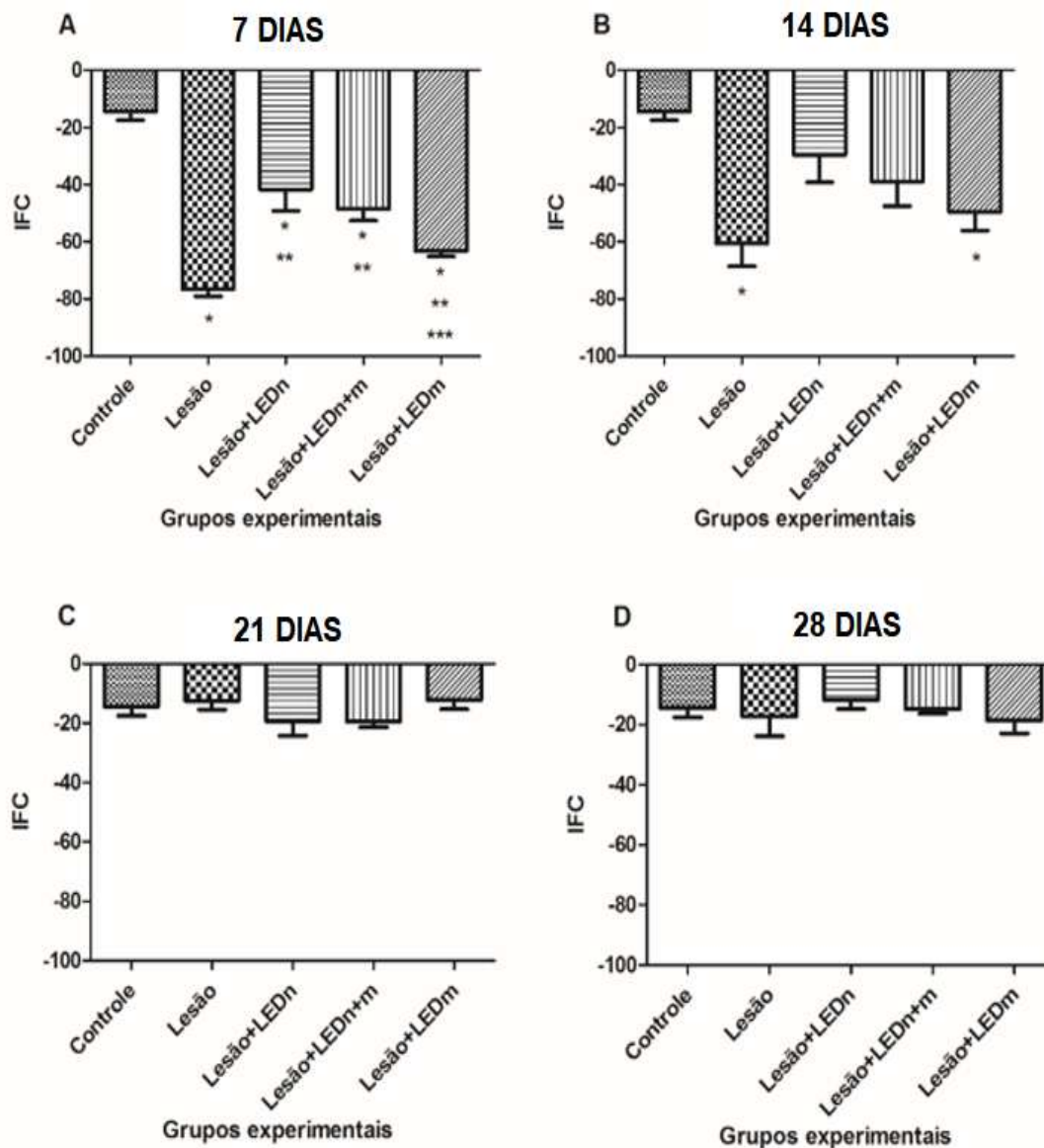
### **Resultados**

Após a realização dos testes para avaliação funcional, foi possível por meio do índice funcional do ciático observar que em 7 dias, todos os grupos lesionados apresentaram uma piora da marcha em relação ao grupo controle, como esperado para uma lesão nervosa periférica. Da mesma forma que todos os grupos tratados com LED apresentaram uma melhora da marcha em relação ao grupo Lesão sem tratamento neste mesmo período. O grupo tratado apenas na região da lesão nervosa (LEDn) foi o que apresentou o melhor resultado comparado ao grupo controle.

Após 14 dias, o grupo Lesão+LEDn e Lesão+LEDnm apresentaram aumento no SFI com valores semelhantes ao grupo controle, enquanto os grupos Lesão e Lesão+LEDm mostraram uma diminuição na funcionalidade da marcha quando comparados ao grupo controle.

Em 21 e 28 dias não ocorreu diferença estatisticamente relevante entre os grupos (figura 9).

Pode-se concluir que o LED aumentou a funcionalidade da marcha avaliada pelo IFC após 7 e 14 dias pós lesão nervosa periférica, especialmente quando é usado na região nervosa associada ou não à região muscular.



**Figura 9:** Resultados encontrados após análise da marcha através do índice funcional do ciático. O IFC normal é igual a zero (0), enquanto que a disfunção total é igual a menos cem (-100), de modo que quanto mais próximo de zero melhor a função.

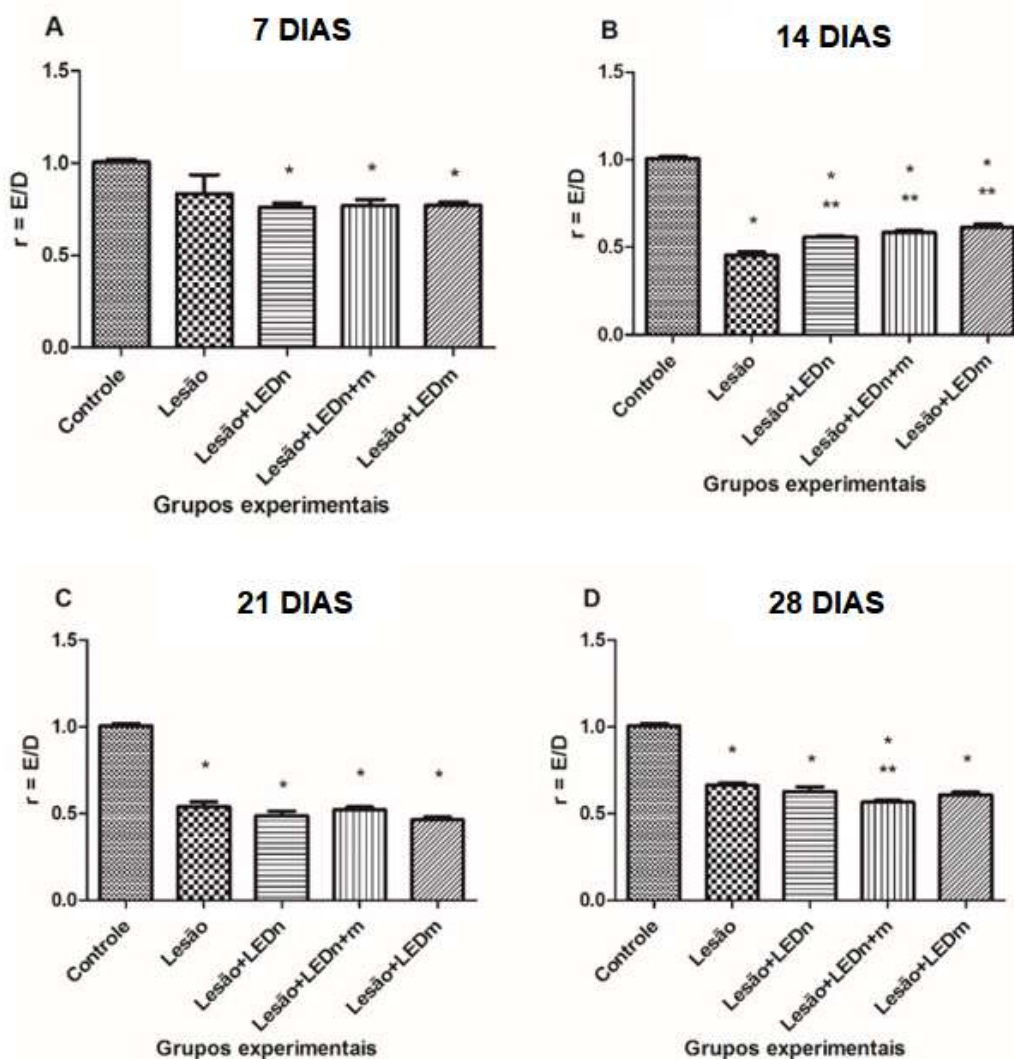
Já em relação ao índice de atrofia muscular (figura 10), verificamos que em 7 dias, todos os grupos lesionados e tratados com LED demonstraram uma diminuição do índice em relação ao grupo Controle.

Em 14 dias, todos os grupos lesionados demonstraram uma diminuição em relação ao grupo Controle, e todos os grupos tratados com LED demonstraram um aumento em relação ao grupo Lesão.

Em 21 dias os grupos lesionados demonstraram uma diminuição em relação ao grupo Controle.

Em 28 dias os grupos lesionados demonstraram uma diminuição em relação ao grupo Controle. E apenas o grupo Lesão+LEDnm apresentou uma diminuição em relação ao grupo Lesão.

Podemos concluir que o LED induziu um aumento na massa muscular em relação aos animais que não receberam tratamento no período de 14 dias pós LNP.



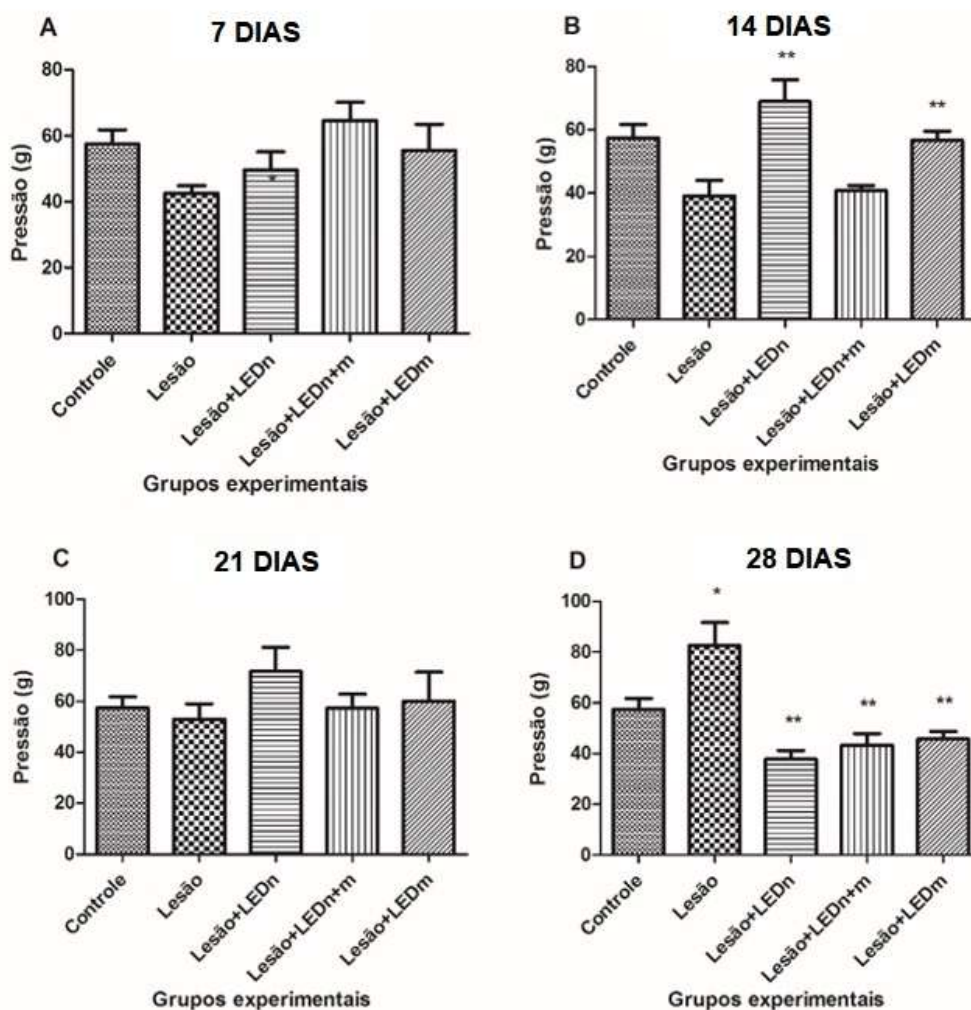
**Figura 10:** Análise da atrofia muscular em diferentes grupos experimentais e períodos avaliados.

No que diz respeito a hiperalgesia mecânica (figura 11), os resultados obtidos demonstraram que em 7 dias, O grupo tratado apenas na região da lesão nervosa (LEDn) foi o que apresentou o melhor resultado comparado ao grupo controle.

Em 14 dias, os grupos Lesão+LEDn e Lesão+LEDm apresentaram um aumento no limiar sendo necessário uma pressão maior para promover uma resposta álgica comparados ao grupo controle, tornando-os mais resistentes aos estímulos.

Em 21 dias não ocorreu diferença estatisticamente relevante entre os grupos.

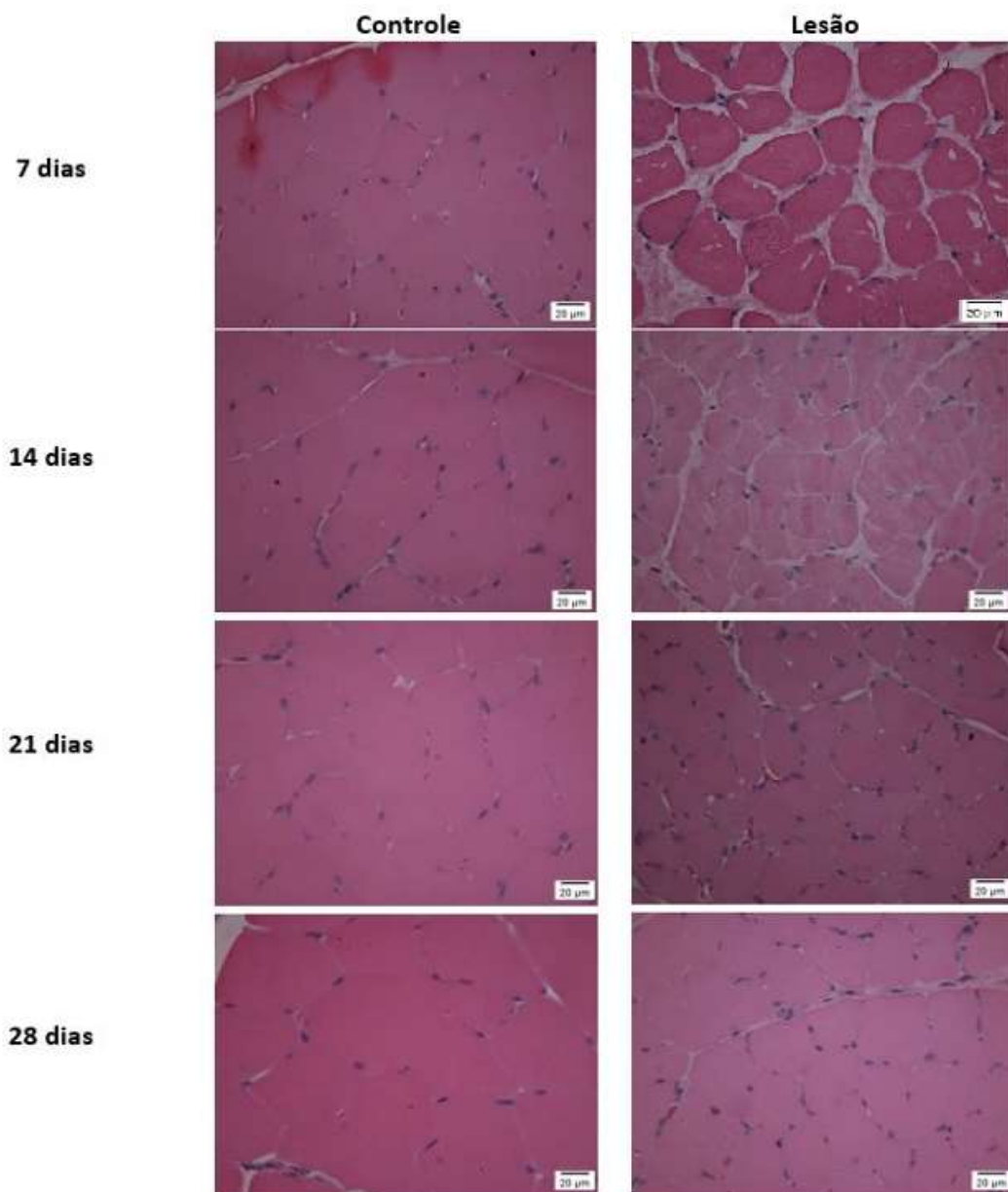
Em 28 dias todos os grupos lesionados e tratados apresentaram uma piora álgica em relação ao grupo controle sendo que uma pressão menor já apresentava uma resposta tornando esses grupos mais sensíveis aos estímulos.



**Figura 11:** Análise funcional de sensibilidade dolorosa através da hiperalgesia mecânica realizada com o teste de Von Frey utilizando o analgesímetro com transdutor de pressão.

A avaliação qualitativa da atrofia muscular nos diferentes grupos experimentais evidenciou que esta ocorreu em todos os períodos analisados no grupo lesão, além do aumento do tecido conjuntivo especialmente no endomísio e perimísio (figura 12), o grupo controle apresentou um aspecto histológico normal com presença de fibras com

formato poligonal, com núcleos periféricos, sem sinais de lesão ou processo inflamatório.



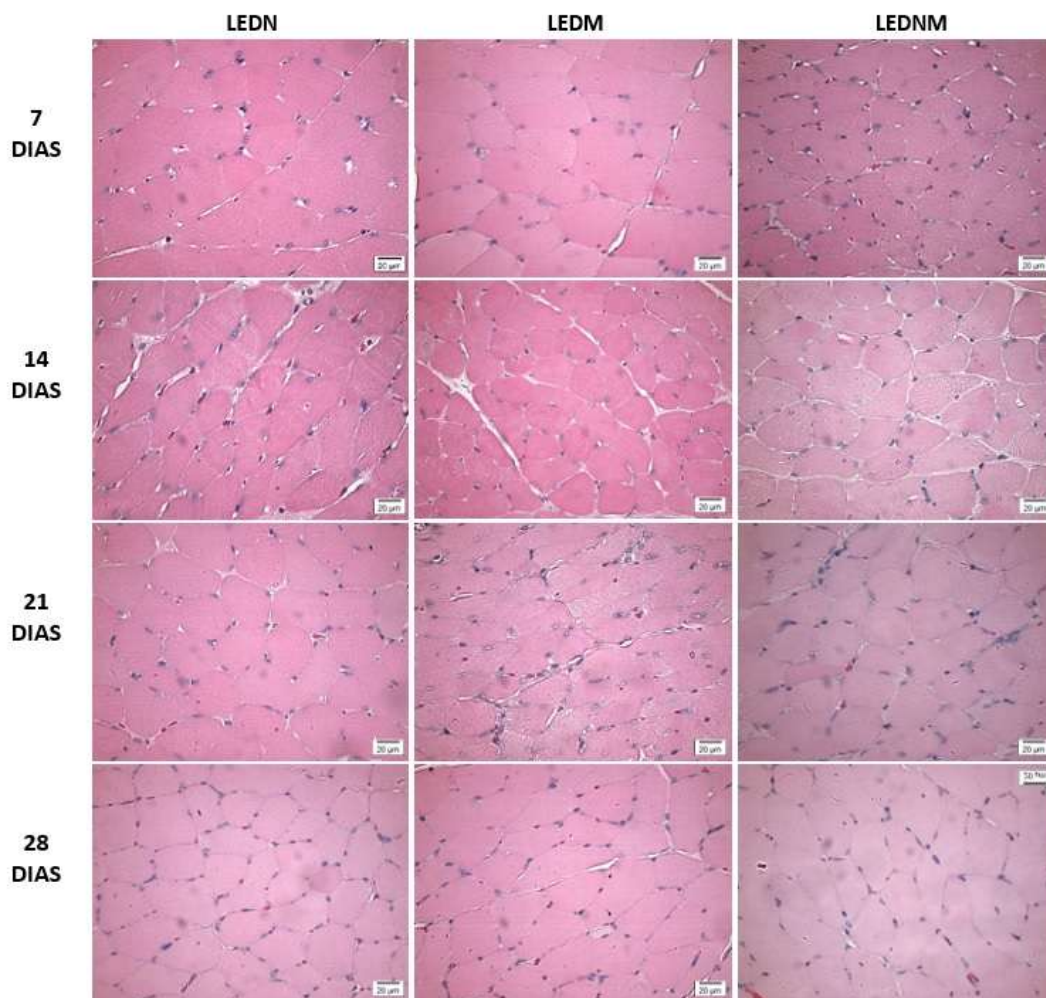
**Figura 12:** avaliação qualitativa representando os grupos controle e lesão nos diferentes períodos avaliados

Considerando os grupos lesionados que receberam tratamento, é possível observar que em 7 e 14 dias, os grupos apresentam um aspecto histológico normal com presença de fibras com formato poligonal, com núcleos periféricos, sem sinais de lesão ou processo inflamatório.

Já em 28 dias os cortes apresentam fibras em forma de mosaico, sendo as fibras dos grupos tratados na região nervosa, associados ou não a região muscular



apresentando diferentes diâmetros, contornos poligonais e vários núcleos em posição periférica ao citoplasma, bem como uma diminuição no espaço entre as fibras no endomísio, como observado na figura 13.



**Figura 13:** avaliação qualitativa representando os grupos experimentais nos diferentes períodos avaliados

## 5. Discussão

As lesões por esmagamento são de ocorrência relativamente grande, do ponto de vista clínico, razão para conhecê-la com mais detalhes do que os atualmente disponibilizados na literatura médica. Por outro lado, são um modelo praticamente ideal para uso experimental, particularmente na pesquisa sobre modalidades terapêuticas das lesões dos nervos periféricos em geral, pois não há aqui o fator complicador da secção total seguida de sutura. (MAZZER, 2006)

O modelo do esmagamento do nervo ciático utilizado neste estudo é decorrente de uma lesão física (por esmagamento) dirigida ao nervo. (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009). Neste modelo a estrutura do nervo é preservada ao menos em parte, facilitando a regeneração e seu estudo, bem como a avaliação da hipersensibilidade aos estímulos mecânicos que são sinais considerados como representativos da dor neuropática observada em humanos. (KONTINEN; MEERT, 2002)

ANDREO et al. (2017), realizou uma revisão da literatura sobre os efeitos da fotobiomodulação utilizando terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) em modelos experimentais de lesão nervosa periférica sendo observado a seguinte variabilidade de parâmetro do laser como comprimento de onda (632,8 a 980 nm), potência (10 a 190 mW) e energia total (0,15 a 90J) em ondas pulsadas ou contínuas e um ou vários pontos. Outro dado observado foi que a LLLT é uma modalidade fototerapêutica viável para o tratamento de lesões do nervo periférico, demonstrando efeitos positivos no processo de reparo neuromuscular tanto quando utilizado no espectro vermelho ou infravermelho. A maioria dos estudos utilizou aplicação em múltiplos pontos.

Conforme destacado nessa revisão, os resultados encontrados no presente estudo também se mostram bastante favoráveis a modulação do processo de reparo após LNP, especialmente no que se refere a funcionalidade, sensibilidade dolorosa e atrofia muscular.

EELLS et al., (2004) sugerem que a LEDT na faixa espectral (600-1200 nm) altera a expressão de genes envolvidos na cicatrização de tecidos e modulação da transmissão dolorosa. Estes achados estão de acordo com os presentes resultados relacionados com a sensibilidade dolorosa uma vez que observamos que a utilização do LED pós LNP proporcionou um aumento no limiar algico dos animais que receberam tratamento quando comparados ao grupo controle. Ao 7º dia o grupo tratado apenas na região da lesão nervosa (LEDn) foi o que apresentou o melhor resultado, enquanto que no 14º dia, os grupos Lesão+LEDn e Lesão+LEDnm apresentaram um aumento no limiar



necessitando de um estímulo nociceptivo de maior intensidade para gerar o uma resposta álgica quando comparados ao grupo controle deste mesmo período indicando assim uma melhor recuperação.

Em nosso estudo, a avaliação funcional da marcha no grupo controle não atingiu o valor zero, como se era esperado, e sim uma oscilação em torno de -10. MEDONÇA et al. 2003 também encontraram essa mesma oscilação.

ANDERS et al. (2004), propuseram que o efeito da irradiação do laser de baixa intensidade na recuperação nervosa periférica pode ser aumentado se além do trajeto do nervo, o segmento correspondente da medula espinhal também for irradiado. Futuros trabalhos investigaram a influência do laser na regeneração nervosa quando irradiado em ambos os locais, na medula e no nervo, assim como os estudos de ROCHKIND et al. (2013) realizado em ratos e em humanos, os quais mostraram uma melhora na regeneração nervosa, quando comparados com seus respectivos placebos.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o LED aumentou a funcionalidade da marcha avaliada pelo IFC após 1 e 2 semanas pós lesão nervosa periférica, especialmente quando é usado na região nervosa associada ou não à região muscular. Estes achados estão de acordo com os achados de SERAFIM et al. 2012 que demonstraram uma melhora significativa no índice de recuperação funcional após 7 dias, sugerindo que a fototerapia LED a um comprimento de onda de 940 nm acelera o processo de regeneração nervosa. A redução em número de células inflamatórias e áreas de edema sugere que fototerapia de 940 nm apresenta um efeito anti-inflamatório que pode melhorar a regeneração nervosa, concluindo que os resultados indicam que a aplicação imediata de fototerapia LED em um comprimento de onda de 940 nm após danos nos nervos melhora o processo de regeneração.

Oliveira et al. (2012) estudaram a ação do laser terapêutico e do ultrassom na regeneração nervosa periférica utilizando 24 ratos, sendo que 18 foram submetidos ao procedimento cirúrgico de lesão do nervo ciático por compressão, através de uma pinça hemostática acima da fossa poplítea. Os animais foram divididos e receberam tratamento com laser e ultrassom, sendo iniciados 24 horas após a lesão, com aplicações diárias por um período de quatorze dias consecutivos. Os resultados desse estudo demonstraram que após a lesão nervosa por compressão, ocorreu perda funcional em todos os grupos experimentais. A primeira análise do IFC, realizada 24 horas após a lesão, mostrou perda da função motora de 100% em todos os animais dos grupos pós-cirurgia, o que fez com que houvesse grande alteração no padrão de marcha dos ratos. As pegadas foram longas e estreitas no lado lesado em comparação com o lado normal, isso porque os animais usaram ambos os calcanhares e encolheram os artelhos para a fase de apoio intermediário. Os ratos foram capazes de andar sobre os

artelhos, mas incapazes de transferir o peso sobre ele. Além disso, as pegadas também mostraram adução dos artelhos, e a queda da pata direita pôde ser vista durante a fase oscilatória da deambulação. A recuperação das variáveis individuais do IFC ocorreu simultaneamente no decorrer dos 14 dias de experimento, mostrando a cada análise melhora no padrão da marcha.

No estudo de OLIVEIRA et al. (2012), após lesão nervosa, houve uma tendência a uma adução dos artelhos da pata comprometida, como observado na 1ª avaliação em todos os grupos lesados. Todos os animais apresentaram queda do calcanhar durante a marcha. Nas avaliações subsequentes, todos os grupos apresentaram uma melhora no IFC, sendo esse resultado o mesmo encontrado em nosso estudo, especialmente no período de 7 e 14 dias.

SERAFIM et al. (2012) avaliaram o efeito do LED com comprimento de onda de 940 nm (utilizou LED com uma dose de  $4\text{J}/\text{cm}^2$  sendo aplicado por 10 dias consecutivos começando no primeiro dia de pós-operatório) na regeneração nervosa em ratos após esmagamento do nervo ciático direito. A fototerapia com LED infravermelho 940 nm induziu um aumento da recuperação funcional avaliada pelo IFC em 7, 14, 21 e 28 dias além de reduzir as áreas de edema, o número de células mononucleares presentes no infiltrado inflamatório. Este estudo está em concordância com os presentes achados e sugerem que o uso de fototerapia com LED infravermelho após a lesão do nervo ciático favorece a recuperação funcional.

BAGIS et al. (2002), não encontraram nenhum efeito da laserterapia na recuperação nervosa periférica. Os nervos ciáticos dos ratos foram submetidos a esmagamento bilateral, um dos lados foi estimulado com laser de comprimento de onda 904nm, com diferentes doses e avaliados com eletrofisiologia e morfologia; porém todas as análises não revelaram diferenças significativas entre os grupos. Considerando estes resultados observados, é importante hipotetizar a possível interferência do efeito sistêmico que o laser pode ter causado e que possa ter minimizado as diferenças entre os dois lados analisados. Em nosso estudo o modelo de lesão escolhido foi unilateral para afastarmos a interferência do efeito sistêmico.

Em relação a atrofia muscular os presentes achados evidenciaram que houve no período de 14 dias em todos os grupos lesionados uma diminuição de massa muscular em relação ao grupo Controle, e todos os grupos tratados com LED demonstraram um aumento de massa muscular em relação ao grupo Lesão. Em acordo com nossos estudos, no que se relaciona ao grau de atrofia muscular, Sene et al., (2013) relataram que o tratamento com o laser promove uma recuperação funcional significativa, aumenta a quantidade de tecido conectivo (colágeno), aumenta o número de fibroblasto no local da lesão e o de axônios mielinizados acelerando a condução nervosa, acelera a cura,

induz uma recuperação mais rápida do trofismo muscular atuando tanto na regeneração quanto na prevenção da degeneração das fibras nervosas.

CIDRAL-FILHO et al. (2014) avaliaram o efeito analgésico do LEDT no modelo de incisão plantar (PI) em ratos e de dor pós-operatória, bem como para investigar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos neste efeito, isto é, receptores de opióide periférico e central; migração de leucócitos contendo opióides para o local de PI e via o óxido de L-arginina / nítrico (NO). Para esse fim, os ratos foram submetidos a PI e tratada com LEDT (950 nm, 80 mW / cm<sup>2</sup>, 1 a 13 J / cm<sup>2</sup>). A hipersensibilidade mecânica foi avaliada como percentagem de frequência de retirada através de filamento de von Frey onde ele conclui que a terapia de diodo emissor de luz (LEDT) foi clinicamente utilizada como alternativa à terapia a laser de baixa potência, sendo que na dose de 9J/cm<sup>2</sup> LEDT apresentou os resultados mais significativos através da ativação de receptores de opióides periféricos que envolvem, pelo menos parcialmente, o recrutamento de leucócitos contendo opióides para o local PI. Esses resultados corroboram nossos estudos uma vez que os resultados presentes evidenciaram que o LED no período de 2 semanas pós LNP proporcionou um aumento no limiar algíco comparados ao grupo controle, tornando-os mais resistentes aos estímulos sendo necessário um estímulo nociceptivo de maior intensidade para gerar o estímulo doloroso indicando uma melhor recuperação.

Em acordo com os estudos previamente citados, KERPPERS et al. (2014) avaliaram o efeito antinociceptivo de um diodo emissor de luz (LED) na fase aguda da dor induzida por capsaicina. O processo da dor foi induzido em ambos os grupos, aplicando 50 microlitros de uma solução a 2% de capsaicina na região plantar da pata traseira direita. No grupo experimental, uma única aplicação de LED 627nm (70mw, 7 Joule/cm<sup>2</sup>) também foi realizada. A nocicepção foi avaliada 30 minutos e 24 horas após a aplicação de LED por meio de um analgesímetro digital. Vinte e quatro horas após a irradiação, observou-se um aumento do limiar nociceptivo no grupo de LED, em comparação com o valor observado 30 min após a aplicação bem como na comparação entre os grupos, concluindo assim que a utilização de LED pode ser considerada como um método analgésico não-invasivo, uma vez que aumenta o limiar nociceptivo de 24 horas após a indução da dor. Nossos resultados também demonstraram uma redução da dor, contudo nossa avaliação não foi aguda como neste estudo citado.

Em adição, FERRARESI et al. (2016) evidenciaram também efeitos positivos da terapia LED no que se refere a massa muscular, contudo seu modelo de estudo utilizou humanos e não realizou LNP e sim treinamento físico. Em seu estudo, comparou a resposta de um par de gêmeos monozigóticos, com os mesmos hábitos de vida, frente a terapia de diodos emissores de luz (LEDT) em um programa de treinamento de força

durante 12 semanas. A terapia com diodos emissores de luz ou placebo foi aplicado com os seguintes parâmetros  $\lambda=850$  nm, total energia = 75 J,  $t = 15$  segundos para ambos os músculos do quadríceps femoral de cada gêmeo imediatamente após cada sessão de treinamento de força (3 vezes / semana por 12 semanas). Biópsias musculares, ressonância magnética, testes de carga máxima e testes de resistência à fadiga foram realizados antes e depois do programa de treinamento para avaliar a expressão gênica, hipertrofia muscular e desempenho, respectivamente. Em comparação com o placebo, o LEDT aumentou a carga máxima no exercício e fadiga reduzida, creatina quinase e escala analógica visual. As análises mostraram diminuição nos marcadores de inflamação (interleucina 1A) e atrofia muscular (miostatina) com LEDT. Síntese de proteínas e do estresse oxidativo foram reguladas positivamente com LEDT, juntamente com aumentos na hipertrofia do músculo da coxa. Pode-se concluir que a terapia de diodos emissores de luz pode ser útil para reduzir o dano muscular, reduzir a dor e atrofia, além de aumentar a massa muscular, recuperação e desempenho atlético em programas de reabilitação e medicina esportiva.

Nossos resultados evidenciaram que a fotobiomodulação utilizando LED reduziu a atrofia muscular, especialmente quando houve a aplicação na região nervosa, associada ou não a região muscular. Em nosso levantamento de bibliográfico não encontramos estudos que avaliassem o efeito do LED sobre esse parâmetro.

## 6. Conclusão

Podemos concluir que o LED aumentou a funcionalidade da marcha avaliada pelo IFC após 1 e 2 semanas pós LNP, especialmente quando foi usado na região nervosa associada ou não à região muscular.

O LED induziu um aumento na massa muscular em relação aos animais que não receberam tratamento no período de 2 semanas pós LNP.

Além disso, o LED no período de 2 semanas pós LNP proporcionou um aumento no limiar algico comparado ao grupo controle, tornando os animais menos responsivos aos estímulos dolorosos sendo necessário um estímulo nociceptivo de maior intensidade para gerar o estímulo doloroso indicando uma melhor recuperação.

Embora o uso de dispositivos emissores de luz como LED seja amplamente utilizado clinicamente em diversas áreas, seus mecanismos de ação e valores de eficácia terapêutica ainda são controversos, indicando que mais pesquisas precisam ser realizadas nessa área.

No momento estão sendo finalizados análises adicionais de alterações morfológicas dos diferentes grupos experimentais de forma a permitir a comparação qualitativa e quantitativa desses aspectos.

## Referências

- Agonollitto PM, Chu MWK, Simão MN, Nogueira-Barbosa MH. **Sciatic neuropathy: findings on magnetic resonance neurography**. Radiol Bras. 2017 June, 50(3): 190-196.
- Anders JJ, Geuna S, Rochkind S. **Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve**. Neurol Res. 2004 Mar, 26(2):233-9.
- Andreo L, Soldera CB, Ribeiro BG, Matos PRV, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA. **Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve Injury**. Lasers Med Sci, 2017.
- Bagis S, Comelekoglu U, Sahin G, Buyukakilli B, Erdogan C, Kanik A. **Acute electrophysiologic effect of pulsed gallium-arsenide low energy laser irradiation on configuration of compound nerve action potential and nerve excitability**. Lasers Surg Med. 2002, 30(5):376-80.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter RT. **Function evaluation of complete sciatic, peroneal e posterior tibial nerve lesion in the rat**. Plastic and Reconst. Surgery. 1989, 83: 129-38
- Barolet D. **Light-emitting diodes (led) in dermatology**. Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery, v.27, p.227-238, 2008.
- Baumann AP, Ibebunjo C, Grasser WA, Paralkar VM. **Myostatin expression in age and denervation-induced skeletal muscle atrophy**. J Musculoskel Neuron Interact, 2003, 3(1):8-16.
- Belchior ACG, Reis FA, Nicolau RA, Silva IS, Perreira DM, Carvalho PTC. **Influence of laser (660nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion**. Lasers Med Sci, 2009, 24:893-9.
- Boccabella AV et al. **Influence of Hormones on Recovery of Electrical Activity of Crushed Sciatic Nerves in Hypophysectomized Rats**. Proc Soc Exp Biol Med, v. 117, p. 800-3, Dec 1964.
- Brunner R, Zimmermann P, Klussman FW. **Localization and neurophysiological properties of motoneurons of the m. triceps surae of the rat after retrograde labelling with Evans Blue**. Cell Tissue. 1980, 212:73-81.
- Casalechi HL, Nicolau RA, Casalechi VL, Silveira L, De Paula AMB, Pacheco MTT. **The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats**. Lasers in Medicine Science. 2009. 24:659-65. PMID:18795398.
- Cavalcante EVV et al. **Efeito da eletroestimulação no músculo desnervado de animais: revisão sistemática**. Fisioter. mov., Curitiba, v. 25, n. 3, p. 669-678, Sept. 2012.

Cidral-Filho FJ, Mazzardo-Martins L, Martins DF, Santos AR. **Light-emitting diode therapy induces analgesia in a mouse model of postoperative pain through activation of peripheral opioid receptors and the L-arginine/nitric oxide pathway.** Lasers Med Sci. 2014 Mar;29(2):695-702. doi: 10.1007/s10103-013-1385-3. Epub 2013 Jul 6.

Cidral-Filho FJ. **Avaliação dos mecanismos fotobiológicos envolvidos na antinocicepção induzida pela terapia por diodo emissor de luz em camundongos.** 2013. 151 f. Tese (Doutorado em Neurociências) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. **Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources.** Photomed Laser Surgery. 2007, 25(2):102-6.

De Medicanelli L, Freed WJ, Wyatt RJ. **An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks.** Exp. Neuro. 1982, 77: 6634-43.

Desmet KD et al. **Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation.** Photomed Laser Surg, v. 24, n. 2, p. 121-8, abr. 2006.

Dourado KBV, Gomes AC, Carnevali Junior LC, Paulo RJF. **Ledterapia: uma nova perspectiva terapêutica ao tratamento de doenças da pele, cicatrização de feridas e reparação tecidual.** Ensaio e Ciência: Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, Vol. 15, Nº. 6, Ano 2011 • p. 231-248

Eells JT et al. **Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy.** Mitochondrion, v. 4, n. 5-6, p. 559-67, 2004.

Ferraresi C, Bertucci D, Schiavinato J, Reiff R, Araujo A, Panepucci R, Matheucci E, Cunha AC, Arakelian VM, Hamblin MR, Parizotto N, Bagnato V. **Effects of Light-Emitting Diode Therapy on Muscle Hypertrophy, Gene Expression, Performance, Damage, and Delayed-Onset Muscle Soreness: Case-control Study with a Pair of Identical Twins.** American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation. 95(10):746–757, OCT 2016

Glickman GBB, Pineda C, Hauck WW, Brainard GC. **Light therapy for seasonal affective disorder with blue narrow-band light-emitting diodes (LEDs).** Biol Psychiatry. 2006, 59:502–7

Hebel R, Stromberg MW. **Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat.** Worthsee: Biomed. 1986. Verlag.

Kerppers II, Paz IA, Pires JAW, Ribeiro LG, Rolão MPP, Furmann M et al. **Antinociceptive action of Light Emitting Diode in an experimental model with hyperalgesia by capsaicin.** MedicalExpress (São Paulo, online) 2014 Oct, 1(5): 268-270.

Klusakova I, Dubovy P. **Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective.** Ann Anat, v. 191, n. 3, p. 248-59, jun. 2009.

Kotinen VK, Meert TF. **Vocalization Responses After Spinal Administration of Bicuculline or Strychnine in Rats.** Neuromodulation: Technology at the Neural Interface, V.5, n.4, p. 221- 230, 2003.

Kouyoumdjian JA. **Lesões nervosas periféricas: Um estudo retrospectivo de 456 casos.** Nerve músculo, 2006, 34: 785-788. doi: 10.1002 / mus.20624.

Lang-Bicudo L, Eduardo FDP, Eduardo CDP, Zezell DM. **LED phototherapy to prevent mucositis: a case report.** Photomed Laser Surg. 2008,26(6):609–13

Lee SY, Park KH, Choi JW, Kwon JK, Lee DR, Shin MS, Lee JS, You CE, Park MY. A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blinded, and split-face clinical study on **LED phototherapy for skin rejuvenation: Clinical, profilometric, histologic, ultrastructural, and biochemical evaluations and comparison of three different treatment settings.** J Photochem Photobiol B. Biol. 2007, 88:51-67

Machado ABM. **Neuroanatomia Funcional.** 2. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 1998

Mazzer PY, Cantalejo N, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. **Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato.** Acta ortop. bras. [Internet]. 2006, 14(4): 220-225.

Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer N. **Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats.** J Neurosci Methods. 2003,129(2):183-90.

Melo CAV, Alves AN, Terena SML, Fernandes, KPS, Nunes FD, Silva DFT, Bussadori SK, Deana AM, Mesquita-Ferrari RA. **Light-emitting diode therapy increases collagen deposition during the repair process of skeletal muscle.** Lasers Med Sci (2016) 31:531–538

Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N. **Índice funcional do ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos.** Acta Ortopédica Brasileira, 2006, 14:133-6.

Monte-Raso VV, Moro CA, Mazzer N, Fonseca MCR, Fasan VPS, Barbieri G et al. **Uma nova pinça regulável para a produção de lesões por esmagamento do nervo ciático do rato.** Acta Ortop Bras. 2009,17(4):236-8

Moura RO, Nunes LCC, Carvalho MEIM, Bruno R. **Efeitos da luz emitida por diodos (LED) e dos compostos de quitosana na cicatrização de feridas Revisão Sistemática.** Ver. Ciênc. Farm. Básica apl, 35(4), dez 2015.

Murray B. **Trauma of the nervous system: Pheripheral nerve trauma.** In: BRADLEY, W. G. et al. (Ed.). Neurology in Clinical Praticce: Principles of diagnosis and management. 4. ed. London: Butterworth Heinemann, 2005. p. 1179-1198.



Oliveira FB, Pereira VMD, Trindade APNT, Shimano AC et al. **Ação do laser terapêutico e do ultrassom na regeneração nervosa periférica.** Acta ortop. bras. [Internet]. 2012, 20(2): 98-103.

Papageorgiou P, Katsambas A, Chu A. **Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of acne vulgaris** From British Journal of Dermatology Volume 142 Issue 5 Page 973 - May 2000 doi:10.1046/j.1365-2133.2000. 03481. x

Parker J P, **The patient's sourcebook on peripheral neuropathy.** San Diego: ICON Group International, Inc., 2002.

Possamai F, Pacheco DR, Santos TS, Andre ES. **Repercussões morfológicas e funcionais do exercício sobre a regeneração nervosa periférica.** Fisioterapia Movimento. 2012, vol.25, n.3, pp. 617-627. ISSN 1980-5918.

Prodanov DP. **Morphometric analysis of the rat lower limb nerves anatomical data for neural prosthesis design.** Tese (Doutorado em Biomedical Signals and System group – Faculty of Electrical Engineering, Mathematics and Informatics), Leiden University Medical Center, Leiden, Netherlands, 2006.

Rochkind S, Geunas SA. **Phototherapy and Nerve Injury: Focus on Muscle Response.** International Review of Neurobiology, 2013, 109:99-109.

Rochkind S, Shainberg A. **Protective Effect of Laser Phototherapy on Acetylcholine Receptors and Creatine Kinase Activity in Denervated Muscle.** Photomedicine and Laser Surgery, 2013, 31(10):499-504.

Rodriguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. **Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury.** Drug Discovery Today: Disease Models, Amsterdam, New York, v. 1, n. 2, p. 177-85, 2004.

Salgado ASI, Alves ACA, Kerppers II, Gomes MHT, Barreto AB, Martins FL, Júnior NSF, Oliveira CS, Oliveira LVF, Zângaro RA, Carvalho PTC. **Comparative analysis of stimulated sciatic nerve regeneration by ultrasound and therapeutic low-level laser therapy.** Clin Exp Med Lett, 2011, 52(3-4):103-7.

Schubert E. **Light-Emitting Diodes.** 2. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

Sene GAL, Sousa FFA, Fazan VS, Barbieri CH. **Efeitos da laserterapia na regeneração nervosa periférica.** Acta ortop. bras. [Internet]. 2013, 21(5): 266-270.

Serafim KG, Ramos SP, Lima FM, Carandina M, Ferrari O, Dias IF, Toginho Filho DO, Siqueira CP. **Effects of 940 nm light-emitting diode (led) on sciatic nerve regeneration in rats.** Lasers Med Sci. 2012 Jan,27(1):113-9. doi: 10.1007/s10103-011-0923-0. Epub 2011 May 6

Shen CC, Yang YC, Huang TB, Chan SC, Liu BS. **Neural regeneration in a novel nerve conduit across a large gap of the transected in rats with low-level laser phototherapy.** J Biomed Mater Res A, 2013, 10(10):2763-77.

Silva JMN, Carvalho JP, Moura Junior MJ. **Estudo morfométrico da terapia LED de baixa potência em tendinite de ratos.** Fisioter. Pesqui. [online]. 2011, vol.18, n.4, pp. 365-370. ISSN 1809-2950.

Silva-Couto MA, Gigo-Benato D, Tim CR, Parizotto NA, Salvini TF, Russo TL. **Effects of low-level laser therapy after nerve reconstruction in rat denervated soleus muscle adaptation.** Rev Bras Fisioter, 2012, 16(4):320-7.

Siqueira R. **Peripheral Nerve Injury: A Review.** Rev Neurocienc 2007,15/3:226–233.

Sousa AM, Lages GV, Pereira CL, Slullitel A. **Experimental models for the study of neuropathic pain.** Rev. dor ISSN 1806-001. 2016, 17(Suppl 1): 27-30.

Souza FI, Zumiotti AV, Silva CF. **Neuregulinas 1-alfa e 1-beta na regeneração de nervos periféricos.** Acta Ortop Bras. 2010,18(5):250-4

Swett JE, Wikholm RP, Blanks RH, Swett AL, Conley LC. **Motoneurons of the rat sciatic nerve.** Exp Neurol. 1986, 93:227-52.

Takasaki I, Andoh T, Shiraki K, Kuraishi Y. **Allodynia and hyperalgesia induced by herpes simplex virus type-1 infection in mice.** Pain. 2000, 86(1-2):95-101.

Trelles MA, Allones I, Mayo E. **Combined visible light and infrared lightemitting diode (LED) therapy enhances wound healing after laser ablative resurfacing of photodamaged facial skin.** Medical Laser Application. 2006, 21:165–75(a)

Vinck E, Cagnie B, Coorevits P, Vanderstraeten G, Cambier D. **Pain reduction by infrared light-emitting diode irradiation: a pilot study on experimentally induced delayed-onset muscle soreness in humans.** Lasers Med Sci. 2006 Apr,21(1):11-8. Epub 2006 Mar 15.

Whelan HT, Buchmann EV, Dhokalia A *et al.* **Effect of NASA Light Emitting Diode Irradiation on Molecular Changes for Wound Healing in Diabetic Mice.** Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery, v. 21, n. 2, p. 67-74, 2003.

Whelan HT, Buchmann EV, Dhokalia A, Kane MP, Whelan NT, Wong-Riley MT, Eells JT, Gould LJ, Hammamieh R, Das R, Jett M. **Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice.** Journal of Clinical Laser medicine & Surgery. 2003, 21(2):67-74

Whelan HT, Smits RL, Buchmann EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA, Cevenini V, Stinson H, Ignatius R, Martin T, Cwiklinski J, Philippi AF, Graf WR, Hodgson B, Gould LJ, Kane M, Chen G, Caviness J. **Effect of Nasa Light-Emitting Diode Irradiation on Wound Healing.** Journal of Clinical Laser medicine & Surgery. 2001, 19(6):305-14

Xavier M, David DR, Souza RA, Arriero AN, Miranda H, Santana ET et al. **Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats.** Lasers Surg Med. 2010 Aug,42(6):553-8. doi: 10.1002/lsm.20896

Yeh NG, Wu CH, Cheng TC. **Light-emitting diodes – Their potential in biomedical applications.** Renew Sustain Energy Rev. 2010, 14:2161-66

Zhang P, Chen X, Fan M. **Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy.** Medical Hypotheses, 2007, 69:310-21.

## Anexo 1

Artigo publicado na revista Lasers in Medical Science

Lasers Med Sci  
<http://doi.org/10.1007/s10103-017-2359-7>



REVIEW ARTICLE

## Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury

L. Andreo<sup>1</sup> · C. B. Soldera<sup>2</sup> · B. G. Ribeiro<sup>2</sup> · P. R. V. de Matos<sup>3</sup> · S. K. Bussadori<sup>1,2</sup> · K. P. S. Fernandes<sup>1</sup> · R. A. Mesquita-Ferrari<sup>1,2</sup>

Received: 19 June 2017 / Accepted: 10 October 2017  
© Springer-Verlag London Ltd. 2017

**Abstract** Phototherapy has demonstrated positive effects in the treatment of peripheral nerve injury, but there is a need to investigate the dosimetric parameters. Thus, the aim of the present study was to conduct a literature review on the effects of photobiomodulation with the use of low-level laser therapy (LLLT) on the treatment of peripheral nerve injury in experimental models. The databases of PubMed/MEDLINE, SCOPUS, and SPIE Digital Library were searched for articles on the use of LLLT in experimental models of peripheral nerve injury published in English between January 2007 and March 2016. The laser parameter variability was wavelength (632.8 to 980 nm), power (10 to 190 mW), and total energy (0.15 to 90 J) in pulsed or continuous wave and single or multiple points. Eighteen original articles demonstrating the effects of LLLT on the acceleration of functional recovery, morphological aspects as well as the modulation of the expression inflammatory cytokines, and growth factors were selected. LLLT is a viable phototherapeutic modality for the treatment of peripheral nerve injury, demonstrating positive effects on the neuromuscular repair process using either red or infrared light. The majority of studies used a power of up to 50 mW and total energy of up to 15 J administered to multiple points. The determination of these parameters is important to the