



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUCAS ANDREO DIAS DOS SANTOS

EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE REPARO
NEUROMUSCULAR EM LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

São Paulo, SP
2018



LUCAS ANDREO DIAS DOS SANTOS

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE REPARO
NEUROMUSCULAR EM LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

Tese apresentado à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutor em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

São Paulo, SP

2018

Andreo, Lucas.

Efeitos da fotobiomodulação sobre o reparo neuromuscular em lesão nervosa periférica. / Lucas Andreo. 2018.

166 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2018.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari.

São Paulo, 13 de agosto de 2018

TERMO DE APROVAÇÃO

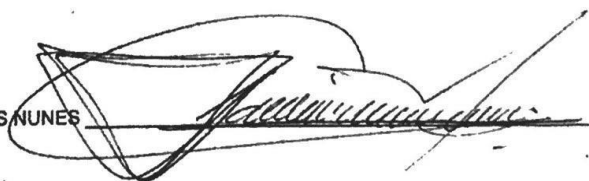
Aluno (a): Lucas Andreo Dias dos Santos

Título da Tese: Efeitos da fotobiomodulação sobre reparo neuromuscular em lesão nervosa periférica"

Presidente: PROF. DR. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI 

Membro: PROF. DR. KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES 

Membro: PROF. DR. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA 

Membro: PROF. DR. FABIO DAUMAS NUNES 

Membro: PROF. DR. FERNANDA ISHIDA CORRÊA 

“A custo se engendra o saber”

(Platão, carta VI)

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Nove de Julho** e ao **Programa de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde** pela oportunidade e infraestrutura.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

À querida Profa. Dra. **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari** por ter me dado um voto de confiança enorme ao acreditar no meu potencial, concordar em orientar um trabalho novo no grupo de pesquisa e principalmente por orientar desse jeito mãe que só ela sabe, muito obrigado, foi um enorme aprendizado!

À coordenadora da Biofotônica Profa. Dra. **Kristianne Porta** por contribuir para o crescimento do programa e da universidade, seu trabalho é exemplar e te admiro muito professora, os professores são um grande exemplo para nós e você é um deles!

Aos professores da casa que foram essenciais para a execução do trabalho: **Anna Horliana, Sandra Kalil, Daniela Teixeira, Rodrigo Labat, Paulo de Tarso.**

Aos professores **Fernanda Ishida Corrêa** e **João Carlos Ferrari Corrêa** pelo estímulo durante a graduação em fazer iniciação científica, creio que sem essa primeira pesquisa eu não teria o incentivo que precisaria para continuar na carreira acadêmica.

À **Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto** e ao **Instituto de Investigação e Inovação em Saúde** por todo o suporte necessário para a execução da pesquisa *in vitro*.

À Profa. Dra. **Maria Helena Fernandes** por ter aceitado me orientar durante o período sanduíche. Essa foi uma oportunidade de ouro e eu pude aproveitar cada momento no laboratório e sua orientação foi essencial para o direcionamento do trabalho.

Ao Prof. Dr. **Pedro Gomes** pela oportunidade, pelo acolhimento e por ser um ótimo paciente (espero que esteja bem!).

Ao Prof. Dr. **Flavio Alves Lara** por ter doado gentilmente a linhagem celular escolhida para este trabalho.

À minha incrível família **Andreo e agregados** por sempre me apoiarem, especialmente minha super **mãe** que sempre teve muita calma e paciência comigo, à minha papi **Cinthia** que me fez companhia e ajudou a platinar alguns jogos, às minhas irmãs **Tata** e **Ju** (na ordem do sermão pra não rolar briga!) que me apoiaram e acreditaram em mim, ao meu querido sobrinho **Gabriel** e todos os meus parentes: vó linda e maravilhosa, cunhados, tias e tio, primos,

irmãozinhos, todos que sempre me apoiavam, ligavam, conversavam, me distraíam e participavam ativamente da minha vida.

À minha deusa, maravilhosa e linda colega/amigona **Beatriz-Andree Guimarães Ribeiro** por estar lá sempre que eu precisei, seja quando eu estava no laboratório ou fora, você sempre foi uma grande amiga e sempre será a melhor colega do mundo, saiba que fez e sempre vai fazer uma falta!

Ao meu namorado **Luiz** que me apoiou incondicionalmente, obrigado por ser meu companheiro para todos os momentos, seja para um passeio na chuva fria, seja na praia ensolarada nunca havia tempo ruim para nós, agradeço mesmo por saber que você faz parte dessa jornada que é a vida, sua presença muda tudo, quando estamos juntos tudo se resolve de um jeito ou de outro porque nós tentamos até conseguir.

À Dra. **Liliana Grenho** pela grande amizade e suporte à pesquisa! Muito obrigado por me incluir, me senti verdadeiramente acolhido e mesmo estando sozinho do outro lado do Atlântico nunca me senti desamparado por causa de você e das meninas, muito obrigado à todas, especialmente: **Angela Carvalho, Joana Barros, Catarina Coelho, Tatiana Padrão, Eri Yoshida, Lilian Siqueira, Bruna Costa (Física), Susana Braga, Belen Arteaga, Rita Araujo, Ana Isabel Magalhães, Cristiane, Marta Laranjeira e Nilza.**

Às meninas da secretaria da pós **Priscila, Lígia, Juliana e Camila** por ajudarem sempre que possível, elas estão por trás de tudo e são essenciais aos programas de pós-graduação.

Aos colegas do laboratório de pesquisa da UNINOVE por terem me ajudado de maneira direta ou indireta na execução do trabalho, especialmente: **Paola, Patty, Sol, Andréia, Zenildo, Mari, Gaby, Amanda, Carlinha, Patrick, Wallace, Agnelo, Kaline, Lorian, Débora, Leandro, Danilo, Izabelinha, Katia e Danilo.** Aos técnicos **Gabriel, Marcio e Eduardo** pelo auxílio.

Aos colegas do anexo C: **Adriano, Gabriela, Regiane, Mô, Zé, Fabio, Otávio e Adilson.**

Aos colegas do LIM-41 Biomecânica e do Laboratório de microcirurgia e cirurgia de mão, especialmente ao **Dr. Raul Bolliger Neto, Ms. Cesar Augusto Lopes Martins, Dr. Tomáz Pugas Leivas, Dra. Consuelo, Dr. Gustavo Bispo, Simone Kneip** e à eterna menininha **Maria do Carmo Nunes** pelo treinamento, sem ele eu não teria o conhecimento para a execução do trabalho, meu tempo no IOT foi curto, mas minha estadia foi essencial para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos **Everton, Felipe, Iris, Fernanda, Jéssica, Mayara, Giovanna e Marcio** por continuarem a ser meus amigos mesmo após anos e por continuarem a ser do meu time #TeamLucas

Aos colegas do IOT por serem os melhores colegas que qualquer aprimorando poderia ter, especialmente **Junia Veloso, Andrey Rodrigues, Mariana Fukuda e Débora Ferrari.**

Aos colegas professores por me auxiliarem nesse processo de adaptação e aos alunos pelo incentivo à docência, vocês me estimulam a ser um profissional melhor.

Enfim, a todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: A lesão nervosa periférica (LNP) que pode gerar um impacto negativo na qualidade de vida pela possibilidade de não ocorrer uma completa regeneração, resultando em distúrbios motores ou sensoriais. O tratamento com fotobiomodulação (FBM) tem demonstrado efeitos positivos nos tratamentos de LNP, especificamente no que se refere à diminuição do tempo de recuperação, porém seus mecanismos de ação ainda não estão bem estabelecidos na literatura. **Objetivo:** Analisar os efeitos da FBM sobre o reparo neuromuscular. **Metodologia:** o levantamento bibliográfico foi realizado por meio de pesquisa nas seguintes bases de dados: PubMed/MEDLINE, SCOPUS e SPIE Digital Library, para artigos originais publicados em inglês de janeiro de 2007 a março de 2016 sobre o uso da FBM em modelos experimentais de LNP. Na pesquisa *in vitro* foi realizado a cultura de células de Schwann de linhagem ST88-14 para análise de viabilidade celular, morfologia e expressão gênica. Para o modelo experimental de LNP foram usados 85 ratos Wistar sendo os grupos lesão analisados após 1, 2, 3 e 4 semanas. O procedimento de lesão do nervo isquiático esquerdo foi realizado pela técnica de esmagamento. O tratamento com FBM foi administrado (780nm, 0.04cm², 1W/cm², 3.2J) na área de lesão nervosa (20J/cm², 0.8J por ponto em 4 pontos), e/ou no músculo tibial anterior (10J/cm², 0.4J por ponto em 8 pontos). Animais não lesionados serviram como controle. **Resultados:** Foram selecionados 18 artigos originais que demonstraram os efeitos da FBM na aceleração da recuperação funcional, nos aspectos morfológicos e na modulação da expressão de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento. Nos estudos *in vitro* a FBM promoveu um aumento na atividade metabólica, migração celular e ciclo celular sem alterar a viabilidade celular, apresentando diferentes resultados de acordo com os parâmetros dosimétricos. A FBM promoveu uma melhora dos aspectos funcionais avaliados no que se refere a análise de marcha, hiperalgesia mecânica e massa muscular, além de promover um aumento no diâmetro e AST e, modulação gênica nos músculos pós LNP, apresentando melhores resultados quando aplicados de maneira combinada.

Palavras-chave: Regeneração nervosa, terapia a laser em baixa intensidade, nervo isquiático, células de Schwann, fotobiomodulação.

ABSTRACT

Introduction: Peripheral nerve injury (PNI) can lead to a negative effect on quality of life because there is no complete reaction from motor or sensory disturbances. The treatment with photobiomodulation (PBM) had its positive results in the treatment of PNI, specifically with regard to the reduction of recovery time, although its mechanisms of action are still not well founded in the literature.

Objective: To analyze the effects of PBM on neuromuscular repair.

Methodology: A bibliographic search was carried out in the following databases: PubMed / MEDLINE, Digital Library SCOPUS and SPIE, for original articles published in January of 2007 to March of 2016 on the use of LLLT in experimental models of PNI. *In vitro* production was performed on Schwann cells, lineage ST88-14 for analysis of cell viability, morphology and gene expression. For the experimental model of PNI it was used 85 Wistar rats which were analyzed at 1, 2, 3 and 4 weeks. PNI was achieved by crushing the left sciatic nerve. Laser treatment (780nm, 0.04 cm², 3.2 J) was realized over the nerve (20J/cm², 0.8 J per point in 4 points) and/or tibialis anterior muscle (10 J/cm², 0.4 J per point in 8 points). **Results:** 18 original articles were selected that demonstrated the effects of PBM on the acceleration of functional recovery, on the morphological aspects and on the modulation of the expression of inflammatory cytokines and growth factors. In the *in vitro* studies PBM promoted an increase in metabolic activity, cell migration and cell cycle without altering cell viability, presenting different results according to the dosimetric parameters. The PBM promoted an improvement of the functional aspects evaluated with regard to gait analysis, mechanical hyperalgesia and muscle mass, besides promoting an increase in the diameter and CSA and, gene modulation in the post LNP muscles, presenting better results when applied in a combined method.

Keywords: Nerve regeneration, low-level laser therapy, sciatic nerve, Schwann cells, photobiomodulation.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Lesão nervosa periférica	1
1.2 Alterações no músculo esquelético desnervado	3
1.3 Células de Schwann e reparo nervoso	5
1.4 Fotobiomodulação.....	8
1.5 Instrumentos avaliativos pós LNP	10
1.6 Justificativa.....	11
2. OBJETIVO	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Revisão da literatura – Artigo 1	14
3.2 Ensaios <i>in vitro</i> –Artigo 2.....	15
3.2.1 Local.....	15
3.2.2 Cultivo celular.....	16
3.2.3 FBM.....	16
3.2.4 Grupos experimentais	17
3.2.5 Ensaio da atividade mitocondrial – MTT.....	17
3.2.6 Ensaio da atividade mitocondrial – Resazurina.....	17
3.2.7 Ensaio de ferida.....	17
3.2.8 Microscopia confocal.....	18
3.2.9 Citometria de fluxo.....	18
3.2.10 RT-qPCR.....	18
3.2.11 Análise dos resultados	19
3.3 Ensaios <i>in vivo</i> –Artigos 3 e 4.....	19
3.3.1 Local.....	19
3.3.2 Animais	19
3.3.3 Grupos experimentais	21
3.3.4 Procedimento cirúrgico.....	21
3.3.5 FBM.....	23
3.3.6 Análise funcional da marcha.....	24

3.3.7	Teste de von Frey	26
3.3.8	Eutanásia	26
3.3.9	Análise da massa muscular.....	27
3.3.10	Avaliação qualitativa e quantitativa dos aspectos morfológicos musculares.....	27
3.3.11	Extração de RNA total	28
3.3.12	Síntese de cDNA e PCR quantitativo.....	29
3.3.13	Análise dos resultados	30
4.	RESULTADOS	31
4.1	Artigo 1	31
4.2	Artigo 2.....	51
4.3	Artigo 3.....	75
4.4	Artigo 4.....	100
5.	DISCUSSÃO.....	130
6.	CONCLUSÃO	133
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
8.	APÊNDICE.....	143
8.1	Apêndice 1	143
8.1	Apêndice 2	144
9.	ANEXOS.....	145
9.1	Anexo 1	145
9.2	Anexo 2	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros utilizados para o tratamento com FBM..... 16

Tabela 2: Parâmetros utilizados para o tratamento com FBM..... 23

Tabela 3: Lista dos primers utilizados na técnica qPCR 30

Artigo 1

Tabela 1: Estudos selecionados que utilizaram laser no modo contínuo (espectro vermelho) 37

Tabela 2: Estudos selecionados que utilizaram laser no modo contínuo (espectro infravermelho)..... 38

Tabela 3: Estudo selecionado que utilizou laser no modo pulsado (espectro infravermelho)..... 38

Tabela 4: Estudos selecionados que utilizaram laser no modo contínuo (espectro vermelho e infravermelho)..... 39

Artigo 2

Tabela 1: Parâmetros utilizados para o tratamento com FBM..... 55

Artigo 3

Tabela 1: Parâmetros utilizados para o tratamento com FBM..... 81

Artigo 4

Tabela 1: Parâmetros utilizados para o tratamento com FBM..... 106

Tabela 2: Lista dos primers utilizados na técnica qPCR 109

Tabela 3: Média e erro padrão da média do diâmetro e área de secção transversa (AST) dos músculos tibial anterior dos ratos Wistar pós lesão nervosa periférica irradiados ou não com LBI na área de lesão nervosa e na área de lesão muscular..... 112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Demonstração esquemática da localização anatômica do nervo isquiático de ratos, sua origem e ramificações.	2
Figura 2. Demonstração esquemática das subunidades dos nAChR.....	5
Figura 3. Demonstração das principais linhagens das CS precursoras.	6
Figura 4. Fluxograma dos procedimentos de busca	15
Figura 5. Fluxograma demonstrando os grupos experimentais.....	17
Figura 6. Fluxograma da metodologia de estudo incluindo as análises e diferentes períodos experimentais	20
Figura 7. Demonstração do local de esmagamento do nervo isquiático	22
Figura 8. Vista isométrica e vista superior do modelo da passarela utilizado para o IFC.....	24
Figura 9. Representação dos parâmetros obtidos para cálculo do IFC	25

Artigo 1

Figura 1. Fluxograma dos procedimentos de busca.....	35
---	----

Artigo 2

Figura 1. Efeitos do FBM na atividade metabólica mensurada pelo ensaio MTT após 1, 3 e 7 dias.	57
Figura 2. Efeitos do FBM na atividade metabólica mensurada pelo ensaio de resazurina após 1, 3 e 7 dias.	58
Figura 3. Efeitos de PBM na expressão do gene BDNF após 1, 3 e 7 dias.....	58
Figura 4. Efeitos de PBM na expressão do gene NGF após 1, 3 e 7 dias.....	58
Figura 5. Efeitos da FBM na migração do SC após a lesão.....	59
Figura 6. Fotomicrografias da ferida após 2 e 8 h.....	60
Figura 7. Análise da viabilidade celular por Anexina-V e PI de SC irradiadas com FBM após 1 dia.....	61
Figura 8. Análise da viabilidade celular por Anexina-V e PI de SC irradiadas com FBM após 3 dias.....	62
Figura 9. Análise da viabilidade celular por Anexina-V e PI de SC irradiadas com FBM após 7 dias.....	63

Figura 8. Efeitos da FBM no ciclo celular após 1 dia. A população G2/M aumentou em todos os grupos irradiados.	64
Figura 9. Efeitos da FBM no ciclo celular após 3 dias. A população G2/M aumentou em todos os grupos irradiados.	65
Figura 10. Efeitos da FBM no ciclo celular após 7 dias	66
Figura 11. Efeitos da FBM sobre células ST88-14 após 1 dia.....	67
Figura 12. Efeitos da FBM sobre células ST88-14 após 3 dias.....	68
Figura 13. Efeitos da FBM sobre células ST88-14 após 7 dias.....	69

Artigo 3

Figura 1. Demonstração de esmagamento do nervo isquiático.....	80
Figura 2. Linha do tempo dos procedimentos experimentais.....	83
Figura 3. Efeitos da FBM sobre o IFC de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1, 2, 3 e 4 semanas.	86
Figura 4. Efeitos da FBM sobre o IFP de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1, 2, 3 e 4 semanas.....	87
Figura 5. Efeitos da FBM sobre o IFT de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1, 2, 3 e 4 semanas.	88
Figura 6. Efeitos da FBM sobre a sensibilidade mecânica de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1, 2, 3 e 4 semanas.....	90
Figura 7. Efeitos da FBM sobre a atrofia muscular ($r=E/D$) de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1, 2, 3 e 4 semanas.....	91

Artigo 4

Figura 1. Fotomicrografias dos músculos em cortes transversais corados com hematoxilina e eosina (400X)	111
Figura 2. Efeitos da FBM sobre o diâmetro das fibras musculares	113
Figura 3. Efeitos da FBM sobre a área de secção transversal muscular.....	114
Figura 4. Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de calcineurina.....	115

Figura 5. Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de miostatina.....	116
Figura 6. Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de MyoD.....	117
Figura 7. Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de miogenina.....	118
Figura 8. Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de α -nAChR.....	119
Figura 9. Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de β -nAChR.....	120
Figura 10. Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de δ -nAChR.....	121
Figura 11. Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de γ -nAChR.....	122
Figura 12. Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de ϵ -nAChR.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChR	Receptor de acetilcolina
ADM	Amplitude de movimento
ANOVA	Análise de variância
BDNF	Fator de neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Albumina bovina sérica
CCL2	Quimiocina (C-C motif) ligante 2
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CK	creatino-quinase
cm ²	centímetros quadrados
CMAP	Potencial de ação muscular composto
CPM	Cadeia pesada de miosina
CS	Células de Schwann
D	Direito
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNase	Desoxirribonuclease
Egr2	Proteína de resposta precoce ao crescimento 2
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ENMG	Eletroneuromiografia
FBM	Fotobiomodulação
FMDUP	Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto
FRM	Fator regulatório miogênico
g	gramas
GAP43	Proteína 43 associada ao crescimento
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
HE	Hematoxilina e eosina
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazi neethanesulfonic acid

HIF-1 α	Fator indutor de hipóxia 1 α
IEC	Índice estático do ciático
IFC	Índice funcional do ciático
IFF	Índice funcional do fibular
IFP	Índice funcional do peroneio
IFT	Índice funcional do tibial
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IT	Abertura dos dedos intermediários
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
JNM	Junção neuromuscular
L1	Proteína transmembrana da família L1
LBI	Laser em baixa intensidade
LED	Luz por emissão de diodo
LIF	Fator inibidor leucêmico
LNP	Lesão nervosa periférica
MAP2	Proteína associada ao microtúbulo
MBP	Proteína ligante maltose
MCP-1	Proteína quimioatraente de macrófagos 1
MEC	Matriz extracelular
min	minutos
MMP	Metaloproteinases de matriz
MMP-2	Gelatinase A
MMP-9	Gelatinase B
MPa	Mega Pascal
MRF4	Fator regulatório miogênico 4
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
mW	miliWatts
mW/cm ²	milliWatts por centímetro quadrado
Myf5	Fator miogênico 5

MyoD	Fator determinante de mioblastos
n.	nervo
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
NCAM	Molécula de adesão neuronal
NF	Neurofilamento
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NGF	Fator de crescimento nervoso
NIE	Nervo isquiático esquerdo
nm	nanometros
NT3	Neurotrofina 3
P0	Proteína básica mielínica
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PHEX	Endopeptidase neutra reguladora de fosfato
PL	Comprimento da pegada
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
r	relação
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
rpm	rotações por minuto
RPMI	Meio de Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real
s	segundos
S100	Proteína S100
SFB	Soro fetal bovino
SNP	Sistema nervoso periférico
TA	Músculo tibial anterior
TIMP1	Inibidor de metaloproteinase 1
TLBI	Terapia a laser em baixa intensidade
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TOF	Distância ao pé oposto

TS	Abertura total dos dedos
UNINOVE	Universidade Nove de Julho
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
W	Watt
W/cm ²	Watt/cm ²

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lesão nervosa periférica

Clinicamente, uma lesão nervosa periférica (LNP) não apresenta risco de vida ao indivíduo, porém pode gerar um impacto negativo na qualidade de vida pois há possibilidade de não ocorrer uma completa regeneração, resultando em distúrbios motores ou sensoriais. Aproximadamente 1 a 2% da população atendida nos serviços de pronto socorro apresenta esse tipo de lesão (Taylor et al. 2008; Eser et al. 2009). Após uma LNP, se inicia um processo de reparo, que engloba o crescimento neuronal, a reinervação e a recuperação funcional (Seddon, 1975).

As lesões de nervo periférico podem ser classificadas em três tipos: neuropraxia, onde não há mudanças estruturais, com mínima perda sensorial ou motora em resultado de uma pressão leve; axonotmese, havendo uma degeneração *Walleriana* do axônio distalmente, não havendo perda das células Schwann (CS), mantendo o tecido conjuntivo; e por fim, a neurotmese, resultante da secção completa do nervo, podendo gerar uma fibrose tecidual por degeneração proximal e distal (Seddon, 1975).

Em uma lesão acompanhada de degeneração *Walleriana*, como as lesões do tipo axonotmese e neurotmese, observa-se a ruptura da barreira hemato-nervosa, proliferação das CS, recrutamento de macrófagos, reorganização tissular e alteração nos componentes da matriz extracelular (Dubový, 2013).

Como consequência, os músculos que seriam inervados pela fibra lesionada sofrem deterioração progressiva (Rochkind et al, 2009 e insuficiência no seu reparo (Shen, 2013), as principais alterações decorrentes desta lesão incluem a atrofia muscular, diminuição da área de secção transversa (Silva-Couto et al. 2012) e diminuição dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) da placa motora (Rochkind et al, 2009, Dubový, 2013) resultantes do comprometimento de fibras motoras, podendo levar à um distúrbio funcional (Dubový, 2013).

O modelo de LNP ainda não está padronizado, a literatura mostra diferentes técnicas como o esmagamento (Bobinski, 2015), compressão nervosa (Dubový, 2013; Hsiesh, 2012), laceração, transecções completas (Silva-Couto,

2012; Shen, 2013). Os modelos de axonotmese têm como vantagem maior padronização da lesão (Tos et al, 2009).

O isquiático é um dos nervos mais escolhidos neste tipo de modelo de lesão por ter sua anatomia bem caracterizada e pela facilidade de acesso (Souza, 2007). O nervo isquiático e a medula espinal lombar de alguns mamíferos se organizam de maneira similar. Em humanos o nervo isquiático se origina entre L4-S3 e em ratos sua origem está situada em L4-L6 (figura 1) (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 pode ser realizada de maneira padronizada e reprodutível. O nervo isquiático é composto por fibras motoras e sensitivas, tendo em torno de 27.000 axônios, destes 6% são axônios motores mielinizados, 23 e 48% são axônios sensitivos mielinizados e não mielinizados respectivamente e os 23% restantes são axônios simpáticos não mielinizados (Schamlbruch, 1986).

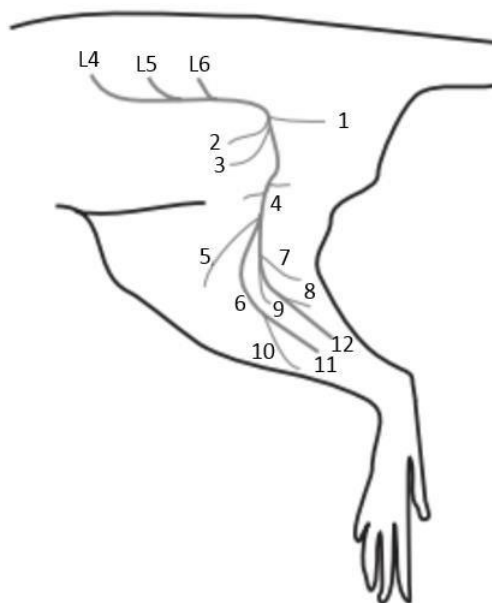


Figura 1: Demonstração esquemática da localização anatômica do nervo isquiático de ratos, sua origem e ramificações. 1: n. pudendo, 2: n. glúteo cranial, 3: n. glúteo caudal, 4: n. isquiático, 5: n. sural, 6: n. fibular comum, 7: n. cut.sural med., 8: n. gastrocnêmio lat., 9: n. gastrocnêmio med., 10: n. fibular superficial, 11: n. fibular profundo, 12: n. tibial (adaptado de Hebel e Stromberg, 1986).

1.2 Alterações no músculo esquelético desnervado

Após uma desnervação o músculo esquelético e a junção neuromuscular (JNM) apresentam alterações severas. A extensão da desnervação é um dos preditores de sucesso do reparo muscular (Wu et al. 2014).

O músculo gradualmente passa por um processo de atrofia, apresentando uma redução de massa muscular, diminuição do diâmetro das fibras e da área de secção transversa (Wu et al. 2014). Simultaneamente, o alterações da morfologia muscular e matriz extracelular (MEC) ocorrem, além do aumento da área do endomísio e perimísio, podendo esta alteração ser associada à diminuição de flexibilidade, fibrose, diminuição da condução das forças de tensão e da massa muscular. A reorganização da MEC é importante para adaptação muscular pós desnervação, essa adaptação é mediada pelas metaloproteinases de matriz (MMP) que são enzimas proteolíticas zinco dependentes, sendo produzidas no músculo esquelético pelas CS, células satélites e fibroblastos especialmente no nervo intramuscular e junção neuromuscular (Silva-Couto, 2012, Rochkind, 2013).

A MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B) são a chave para o processo de remodelamento no músculo esquelético, degradando uma forma não fibrilar de colágeno tipo IV e hidrólise de colágeno intersticial, que interfere na formação de fibrose. As MMPs estão envolvidas no processo de reinervação nas fibras musculares desnervadas provavelmente promovendo o crescimento axonal na MEC (Silva-Couto et al, 2012).

Além disso, os fenótipos de cadeias pesadas de miosina (CPM) e diâmetro das fibras são alterados no músculo desnervado. As fibras musculares de fenótipo I (CPM I) e I a (CPM I a) apresentam um diâmetro menor, quando comparadas às de fenótipo I x (CPM I x) e I b (CPM I b) que apresentam um diâmetro de tamanho intermediário e maior respectivamente. A atrofia de fibras musculares I ocorre mais rapidamente do que fibras do tipo I, sendo seu período de atrofia ainda é desconhecido. Especificamente, no músculo tibial anterior (TA) de ratos, há uma predominância de fibras do tipo I, e após uma desnervação completa as fibras do tipo I B e I C se convertem em fibras de fenótipo I e I A (Wu et al. 2014; Dow et al. 2006).

Se há um processo de reinervação, o córtex motor pode determinar o tipo, proporção e distribuição das fibras musculares. Havendo uma relação inversamente proporcional entre o diâmetro das fibras musculares e o tempo de inervação e uma correlação positiva entre o diâmetro das fibras musculares e entre a velocidade de condução da fibra muscular e presença de fasciculações. Sendo assim, o diâmetro da fibra muscular é considerado um índice importante para investigar a extensão da desnervação e do desuso muscular (Cruz-Martinez e Arpa, 1999; Wu et al. 2014).

Na atrofia muscular também 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 do crescimento muscular. Após a desnervação completa há um aumento inicial da expressão gênica e proteica muscular de ratos e após 2 semanas essa concentração diminui ficando em uma concentração menor que a normal (Baumann et al. 2003). A miostatina inibe a ativação e diferenciação das células satélites em mioblastos e dos mioblastos em miotubos por meio da regulação negativa dos fatores de regulatórios miogênicos (FRMs), como MyoD e miogenina (McCroskery et al. 2003).

Há alterações nas expressões gênicas de FRMs no tecido muscular pós desnervação, aumentando num período mais agudo e depois diminuindo progressivamente. Especificamente, no tecido muscular do TA de ratos Wistar após transecção do nervo isquiático de ratos Wistar, o pico de aumento da expressão gênica de MyoD e Myf5 ocorre após 1 mês e o retorno à normalidade em 7 meses pós desnervação completa. Contudo, o pico da expressão gênica de MRF4 e miogenina ocorre após 9 dias e o retorno à concentração normal em 2 meses (Adams et al. 1995; Wu et al. 2014).

Os FRMs regulam a expressão diferencial dos genes das subunidades de nAChR (Wang et al. 2003). Os nAChR estão presentes no ápice da dobra juncional da JNM (Ruff, 2003) e possuem duas formas de apresentação: a forma extrajuncional imatura, encontrado nas fibras desnervadas ou em fibras

embrionárias, e a forma juncional madura. As subunidades presentes na forma imatura são $\alpha 1$ (2), $\beta 1$, δ e γ e na forma madura $\alpha 1(2)$, $\beta 1$, δ e ϵ (figura 2).

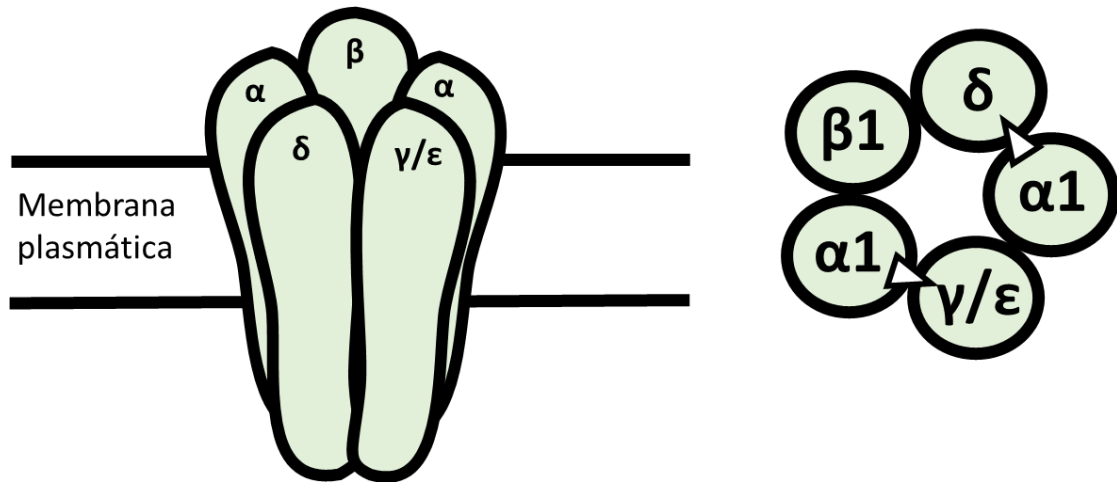


Figura 2: Demonstração esquemática das subunidades dos nAChR.

Após uma desnervação, há um aumento da forma imatura inicialmente e um retorno ao nível normal no processo de reparo, havendo uma reposição da subunidade ϵ -nAChR pelas subunidades γ -nAChR. Especificamente, no músculo TA desnervado por transecção do nervo isquiático de ratos Wistar há um aumento na expressão gênica das subunidades γ e ϵ , com um pico em 9 dias, havendo uma diminuição progressiva da expressão gênica de γ -nAChR e um aumento progressivo na expressão gênica de ϵ -nAChR (Adams et al. 1995; Wu et al. 2004).

Essas alterações do nAChR afeta a estabilidade da JNM e regeneração pós desnervação (Wu et al. 2004). Há uma alteração no número e densidade de axônios regenerativos na JNM, havendo uma degeneração progressiva da bainha axonal do nervo intramuscular, dificultando o infiltrado axonal nas fibras musculares levando à uma diminuição no número de unidades motoras com consequente diminuição dos receptores da JNM (Wu et al. 2004).

1.3 Células de Schwann e reparo nervoso

Durante o desenvolvimento embrionário, as células da crista neural se diferenciam em CS precursoras que por sua vez podem se diferenciar em CS imaturas ou outras linhagens, como os melanoblastos que migrariam dos nervos para a pele, os fibroblastos endoneurais ou neurônios parassimpáticos (Jessen

et al. 2015). A partir da quantidade de neuregulina 1 tipo I liberada pelos axônios, as CS imaturas podem se diferenciar em CS mielínicas ou CS não mielínicas (Remak), axônios com maior diâmetro serão envolvidos por uma única CS mielínica e vários axônios de menor diâmetro serão envolvidos por uma célula Remak (Feltri et al. 2016).

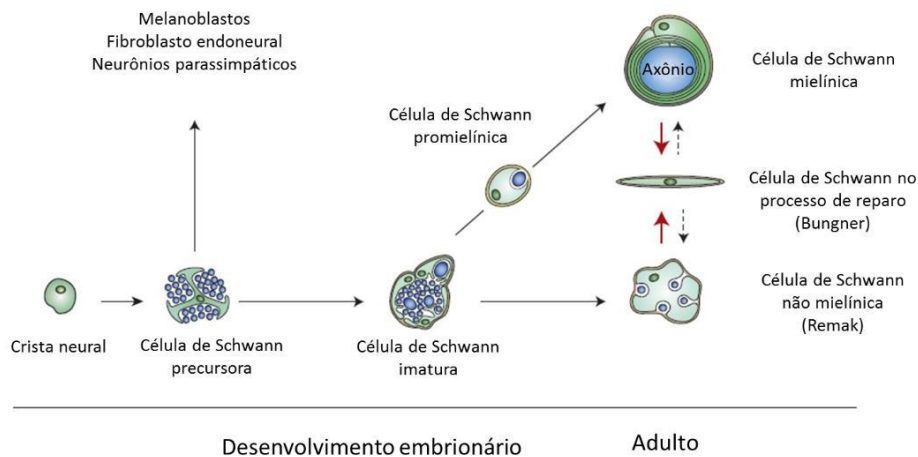


Figura 3: Demonstração das principais linhagens das CS precursoras. (Adaptado de Jessen et al. 2015).

As CS desempenham um papel importante no processo de reparo. Estas células compõem a glia do sistema nervoso periférico (SNP) e sua interação com os neurônios do SNP influenciam no funcionamento e desenvolvimento normal de uma fibra nervosa (Armati, 2007). As CS apresentam papel essencial na regeneração axonal sendo o retardo nesta interação diretamente relacionado a um reparo nervoso mais lento ou a progressão para lesão nervosa crônica com estabelecimento de diversos tipos de sequelas (Namgung et al. 2015). A interação entre o axônio e a CS é importante para a regeneração tecidual, levando à rediferenciação das CS sendo que uma falha nessa interação pode desencadear uma doença neuromuscular ou dor neuropática (Namgung, 2014).

Além disso as CS são importantes para a integridade do tecido nervoso pela capacidade de armazenamento de glicogênio, que provém suporte energético axonal (Lundborg, 1993; Brown et al. 2012). Estas CS por formarem a bainha de mielina que envolve o axônio atuam também como isolante elétrico permitindo uma rápida propagação dos potenciais de ação denominado impulso saltatório, regulam o diâmetro axonal e modulam o sistema imune expressando

moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (Armati, 2007; Morrisey, 1991).

Já após uma lesão, diferentemente do que ocorre no desenvolvimento embrionário, há um processo de desdiferenciação. As CS respondem rapidamente à interrupção axonal, promovendo uma mudança no fenótipo, havendo uma expressão de moléculas expressas por estas células antes da mielinização, contribuindo para o processo de reparo (Namgung, 2014). Moléculas são expressas e genes associados à mielina têm sua expressão diminuída, como o fator transcricional de mielina Egr2 (Krox20), enzimas envolvidas na síntese de colesterol, proteínas associadas de membrana, como periaxina e glicoproteína associada à mielina, e proteínas estruturais, como P0 e proteína básica mielínica (Jessen et al. 2015).

Além disso, há o aparecimento de novos fenótipos, não associados às CS imaturas ou normais, sendo essenciais para a contribuição do processo de reparo. A regulação de fatores neurotróficos, como o BDNF, GDNF, NT3, NGF, VEGF, pleiotrofina e artemina promovem a sobrevivência de neurônios lesionados e o prolongamento axonal no coto proximal. Na região do coto distal, as CS entram no processo de desdiferenciação, havendo uma proliferação celular das CS por entrarem novamente no ciclo celular, expressando citocinas inflamatórias incluindo TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , LIF e MCP-1 (CCL2) que promovem o recrutamento de macrófagos, inicialmente no perfil M1. Além disso, as CS iniciam a ruptura da mielina intrínseca, como um processo de autofagia celular (Jessen et al. 2015; Chen et al. 2015), pois a mielina tem potencial inibitório sobre o crescimento axonal (Jessen et al. 2015).

Algumas citocinas sintetizadas pelas CS, como IL-6 e LIF, atuam sobre os neurônios para promover regeneração axonal, enquanto o infiltrado de macrófagos proporciona uma fonte adicional de liberação de citocinas. Além de promover a vascularização do coto distal, os macrófagos atuam na eliminação da mielina, que inibiria o crescimento axonal. As CS também produzem proteínas que são liberadas na matriz extracelular (MEC), como o colágeno VI e CCL2 que além de atrair mais macrófagos ao local de lesão, estimulam a polarização para o perfil M2 que promovem a regeneração axonal (Chen et al, 2015; Namgung, 2014).

A formação de bandas de regeneração se inicia a partir da alteração da morfologia das CS, que assumem uma morfologia bipolarizada formando uma camada colunar abaixo da lâmina basal, formando as bandas de Bungner, promovendo substratos e guiando a disposição para a regeneração axonal (Namsung, 2014; Chen et al. 2015).

1.4 Fotobiomodulação

A fotobiomodulação (FBM) é um recurso terapêutico utilizado para estimular o reparo tecidual, analgesia e reduzir o processo inflamatório. A FBM estimula cromóforos como citocromo C oxidase e os canais de cálcio celulares, que leva a um aumento na síntese de adenosina trifosfato (ATP), modulação das espécies reativas de oxigênio, aumento do óxido nítrico e modulação dos níveis de cálcio (Hamblin, 2017).

Há diversos tratamentos para LNP, porém somente em lesões do tipo neurotmesa há necessidade de intervenção cirúrgica como neurorrafia (Anders, 2014), enxertia (Moges, 2011) e a tubulização (Shen, 2013). Outros tratamentos, como os biológicos, como fatores de crescimento, inoculação celular (Pan, 2006; Yang, 2015; Askari, 2015) e estímulos físicos, como eletroterapia, ultrassom terapêutico para estimular a reinervação (Kim, 2013) e a FBM (Mohammed, 2007; Barbosa, 2010; Shen, 2011; Moges, 2011; Câmara, 2011, Silva-Couto, 2012; Santos, 2012; Hsieh, 2012; Gomes, 2012; Akgul, 2013; Alcântara, 2013; Rochkind, 2013; Shen, 2013; Anders, 2014), demonstraram efeitos positivos pós LNP.

Shen et al (2013) demonstraram uma redução da atrofia muscular em ratos Wistar desnervados (por transecção seguida por tubulização) tratados com LBI (660nm, 50mW, 2min, próximo à área de lesão nervosa) diariamente por dez dias pós tubulização, quando comparado ao grupo não irradiado, além disso, observaram um aumento no índice funcional do ciático (IFC) em 12 semanas e maior funcionalidade no teste eletromiográfico. Na análise histológica foi observada maior regeneração neural associada à um aumento na área nervosa, no diâmetro da fibra nervosa, maior número de fibras nervosas, diâmetro axonal e espessura da bainha de mielina.

Barbosa et al (2010) demonstraram um aumento da funcionalidade em 8 semanas no nervo fibular de coelhos pós transecção seguida de neurografia tratados com LBI (901nm, 10mW, 6J, na área de lesão nervosa) diariamente por dez dias.

Alcântara et al. (2013) demonstrou um aumento na expressão de TNF- α , MMP-9, MMP-2 axonal no nervo isquiático de ratos Wistar tratados com LBI (660nm, 40mW, 48J) diariamente em 3 dias pós lesão por esmagamento, com irradiação na área correspondente à lesão nervosa.

Com relação às CS, houve um aumento na sua imunomarcção em diversos estudos descritos. Shen et al. (2011) induziram lesão no nervo isquiático de ratos por transecção, pós realização da tubulização, tratados com LBI (660nm, 50mW, 15J) diariamente por 21 dias, Moges et al. (2011) observaram esse aumento no nervo mediano seguido de autoenxertia do nervo sural tratados com LBI (810nm, 140.8mW, 175J) por 14 dias e no estudo de Hsieh (2012) verificaram também esse aumento em ratos com constrição crônica do nervo isquiático tratados com LBI (660nm, 30mW, 1.8J) por 7 dias.

No estudo de Rochkind et al. (2013), foi demonstrado que o LBI (632nm, 35mW, 63J) elevou a concentração de creatino-quinase (CK) e do nAChR no músculo desnervado por neurectomia. A preservação da placa motora e a concentração de CK são parâmetros importantes na recuperação muscular pós traumática em decorrência da contração e do relaxamento muscular acontecerem através da ação de CK, que é uma enzima importante para suprir a fonte de energia muscular. A fosfocreatina resultante da ação do CK constitui uma reserva de fosfato de energia disponível para uma rápida síntese de ATP e após uma LNP o nível de CK e massa muscular diminuem alterando a densidade e distribuição do receptor de acetilcolina.

Nos estudos in vitro que avaliaram o efeito da FBM em células nervosas, especificamente em relação às CS dois estudos descritos na literatura foram conduzidos demonstrando que a FBM influencia diretamente a proliferação e atividade mitocondrial destas células em cultura primária.

Van Breuge et al. (1993) demonstraram um aumento no número de CS obtidas a partir do nervo isquiático de ratos Wistar irradiadas com LBI vermelho (632nm, contínuo, 5.98mW) quando comparado ao grupo não irradiado, mas não

observaram a diferença na concentração da proteína laminina entre os grupos irradiado e não irradiados.

No estudo de Yazdani et al. (2012), foi demonstrado que o LBI infravermelho (810nm, contínuo, 50mW) modulou a atividade mitocondrial de CS obtidas do nervo sural de humanos, havendo uma diminuição na atividade mitocondrial nos períodos de 1 e 4 dias seguido por um aumento em 7 dias, porém não houve alteração na expressão gênica de NGF, BDNF e GDNF.

Em estudos com irradiação em neurônios, o LBI (632.8nm, 8min, 3.6J/cm²) demonstrou um aumento no brotamento neural (Wollman & Rochkind, 1998), aumento na expressão gênica de BDNF (632.8nm, 10mW, 12.74mW/cm²)(Meng et al. 2013) e efeito protetor em ensaios de citotoxicidade (810nm, 25mW/cm², 3J/cm²) (Huang et al. 2014).

Vale ressaltar que os efeitos positivos do LBI no tecido muscular durante o processo de reparo após diversos tipos de lesão estão bem descritos na literatura e estes incluem melhor remodelamento de colágeno, modulação da atividade MMPs, modulação da expressão gênica de FRMs, aumento no número de fibras jovens e angiogênese (Alves et al. 2014) e diminuição da concentração tecidual de citocinas pró-inflamatórias (Almeida et al. 2013).

A produção de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento pelas CS são importantes para o processo de reparo, demonstrando a necessidade de investigação dos efeitos fotobiomodulatórios do LBI nas CS visando a contribuição para o estabelecimento de protocolos eficazes para a recuperação funcional pós LNP e aceleração do processo de reparo no tecido nervoso.

1.5 Instrumentos avaliativos pós LNP

Segundo Monte-Raso et al. (2006) em estudos experimentais a recuperação das LNP é verificada principalmente por meio de análises morfológicas, histológicas e eletrofisiológicas, e destaca a importância de também avaliar o grau de recuperação funcional.

Existem diferentes técnicas de análises morfológicas, tais como coloração por hematoxilina e eosina, tricromo de Masson, tetróxido de ósmio e azul de toluidina, a principal vantagem de se realizar a análise por tetróxido de

ósmio e azul de toluidina é o fato dessas colorações permitirem a quantificação de fibras mielinizadas e o diâmetro das mesmas, enquanto as outras técnicas citadas não permitiriam. Além disso, podem ser realizadas análises de imunomarcção de neurofilamentos e células gliais, principalmente das CS (Raimondo et al. 2009).

Já a análise cinemática de marcha permite quantificar a recuperação funcional da LNP. Em ratos após uma LNP do nervo isquiático há uma diminuição na capacidade de espalhar os dedos da pata traseira, sendo esse um parâmetro confiável para avaliação. A partir desta premissa foi desenvolvido o IFC e suas versões modificadas (Monte-Raso et al. 2006), como a versão de Carlton e Goldberg (1986), havendo a retirada do fator de distância à outra pata e a versão de Bain, Mackinnon e Hunter (1989), tendo o desenvolvimento de novos fatores para avaliação do índice funcional do ciático (IFC) em ratos. As limitações desta análise são somente em casos de autotomia, resultante de uma automutilação do membro desnervado do roedor, podendo resultar em uma disestesia dolorosa com projeção para os três dedos laterais do membro posterior, portanto, animais com esse sinal não teriam um resultado adequado à recuperação funcional (Costa et al. 2009).

Além do distúrbio funcional motor, outra forma de se avaliar a funcionalidade nervosa pós LNP é através da sensibilidade dolorosa, podendo ser avaliada pelo teste de von Frey (teste mecânico) (Austin, Wu, Moalem-Taylor, 2012), e pela hiperalgesia mecânica como descrito por Takasaki et al. (2000).

1.6 Justificativa

A LNP pode gerar um impacto negativo na qualidade de vida dos indivíduos em decorrência das sequelas incapacitantes (Taylor et al. 2008; Eser et al. 2009). O estabelecimento 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.

Este projeto busca preencher a lacuna referente aos efeitos da FBM quando aplicado tanto nos tecidos muscular quanto nervoso, uma vez que já

foram demonstrados os efeitos positivos deste recurso em cada tecido separadamente sendo inédito um estudo que realiza este tratamento combinado, além de avaliar os efeitos da FBM sobre a viabilidade de CS que são fundamentais para o processo de reparo nervoso.

Também foram realizadas análises que permitiram uma avaliação adequada do processo de atrofia do músculo desnervado e sua modulação pela FBM que incluem a regulação de miostatina, calcineurina e a expressão de FRM e nAChR.

Por fim, a avaliação funcional permitirá verificar como este recurso modulou a recuperação funcional que depende tanto da integridade muscular quanto nervosa.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

- Analisar os efeitos da FBM sobre o reparo neuromuscular.

2.2 Específicos

- **Artigo 1.**
 - Compilar uma revisão para demonstrar a aplicabilidade do tratamento com FBM em modelos experimentais de *in vivo*;
- **Artigo 2.**
 - Avaliar o efeito da FBM sobre as CS no que se refere a:
 - Atividade mitocondrial;
 - Viabilidade celular;
 - Expressão gênica de fatores de crescimento neurotróficos e citocinas pró-inflamatórias;
 - Ciclo celular e apoptose.
- **Artigos 3 e 4.**
 - Avaliar os efeitos da FBM em ratos Wistar pós lesão por esmagamento do nervo isquiático no que se refere a:
 - Aspectos funcionais, incluindo a análise do IFC e hiperalgesia mecânica
 - Os aspectos morfológicos do músculo desnervado, incluindo área de secção transversa (AST) e diâmetro das fibras;
 - Expressão de FRMs e proteínas relacionadas ao trofismo muscular incluindo miostatina e calcineurina;
 - Expressão das subunidades de nAChR.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Revisão da literatura – Artigo 1

Para levantamento bibliográfico foram realizadas nas bases de dados PubMed/MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), SCOPUS e SPIE Digital Library para artigos originais que utilizaram modelos experimentais de LNP e FBM. Foram selecionados artigos publicados em inglês de janeiro de 2007 a março de 2016. Os termos utilizados para busca foram "lasers", "laser therapy", "low-level laser therapy", "low intensity laser therapy", "irradiation", "phototherapy", "photobiomodulation"; "repair", "regeneration", "injury" e "peripheral nerve". As referências bibliográficas dos artigos foram analisadas para identificar estudos adicionais.

Os artigos foram selecionados segundo os critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão foram:

1. Artigos publicados entre janeiro de 2007 a março de 2016;
2. Estudos experimentais com modelos animais de lesão nervosa periférica;
3. Estudos com descrição dos parâmetros ou que permitiam calcular os parâmetros não descritos (comprimento de onda, potência média de saída, área do feixe, densidade de potência, densidade de energia, energia por ponto, energia total, quantidade de pontos irradiados e tempo de irradiação por ponto).

Já os critérios de exclusão foram:

1. Ensaio clínico e estudos *in vitro*;
2. Artigos de revisão;
3. Ausência de um grupo lesionado sem tratamento;
4. Modelos de lesão em nervos cranianos;
5. Irradiação não realizada em contato, não permitindo a descrição dos parâmetros reais.

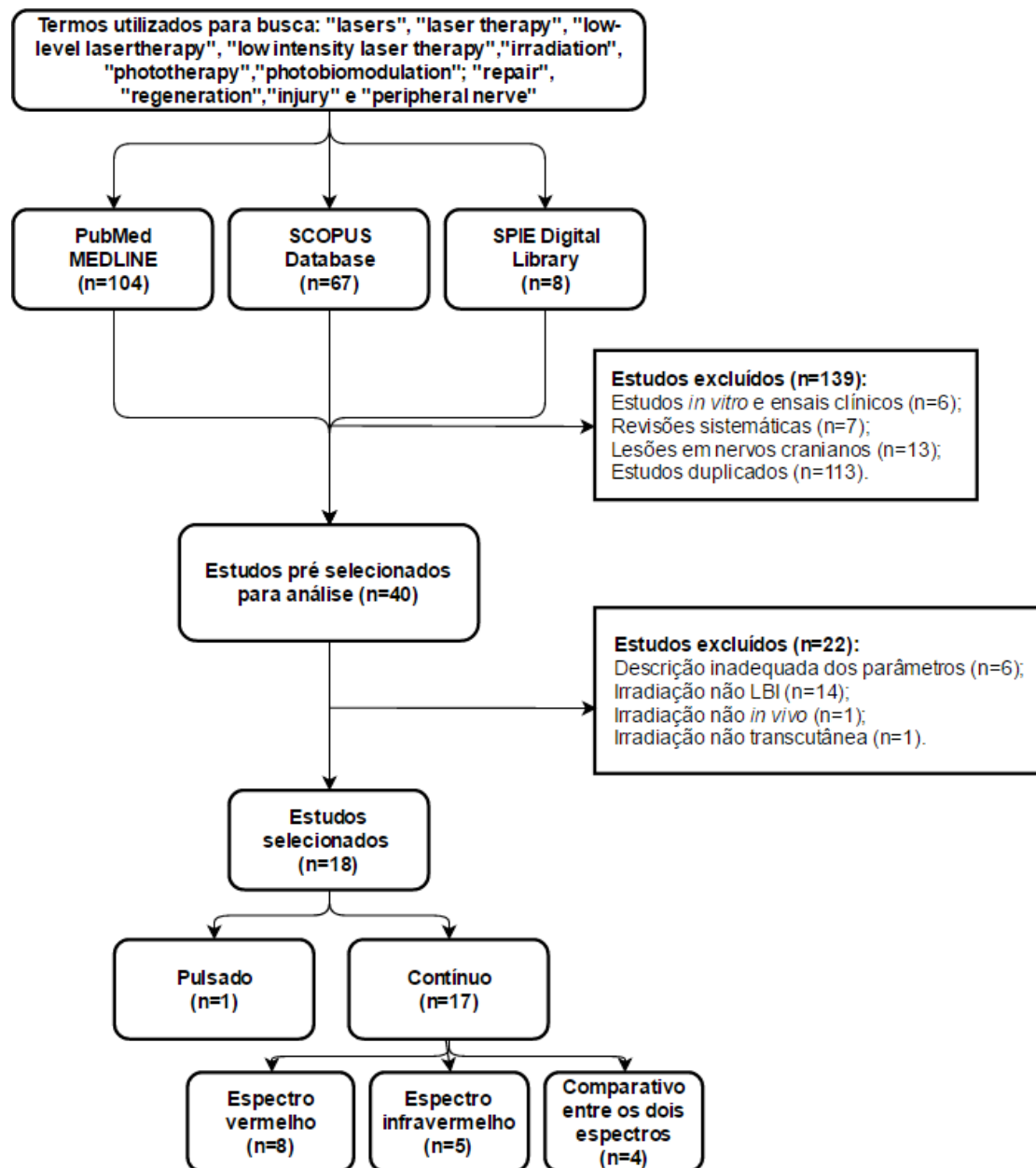


Figura 4. Fluxograma dos procedimentos de busca.

3.2 Ensaios *in vitro* – Artigo 2

3.2.1 Local

O estudo foi realizado no laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP).

3.2.2 Cultivo celular

A linhagem ST88-14 (RRID:CVCL_8916) é uma célula de Schwann isolada de um paciente com neurofibromatose tipo I (Ryan et al. 1994) pelo Dr. Jonathan A. Fletcher (Dana Faber Cancer Institute, Boston, EUA). As células ST88-14 foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado com 10 mM de HEPES, 2 mM de glutamina, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica, mantidas em incubadora de CO₂ a 5%, sempre a 37°C. O monitoramento celular foi realizado a cada dois dias, utilizando um microscópio invertido de fase sendo mantidas em estado de subconfluência.

3.2.3 FBM

As células foram tripsinadas, centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos a 10° C e o botão celular (8×10^4 células/tubo) foi irradiada na extremidade inferior, sendo utilizado o equipamento *Twin Flex*[®] (*MM Optics*, São Carlos – SP, Brasil). Os parâmetros utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros utilizados para o tratamento com FBM.

Meio ativo	InGaAIP		AsGaAl	
Comprimento de onda	660 nm		780 nm	
Área do feixe	0.04cm ²			
Área irradiada	0,196cm ²			
Potência	40 mW			
Densidade de potência	1W/cm ²			
Densidade de energia	160J/cm ²	320J/cm ²	160J/cm ²	320J/cm ²
Energia total	3.2J	6.4	3.2J	6.4
Tempo	80s	160s	80s	160s

3.2.4 Grupos experimentais

A distribuição dos grupos experimentais está ilustrada na figura 5.

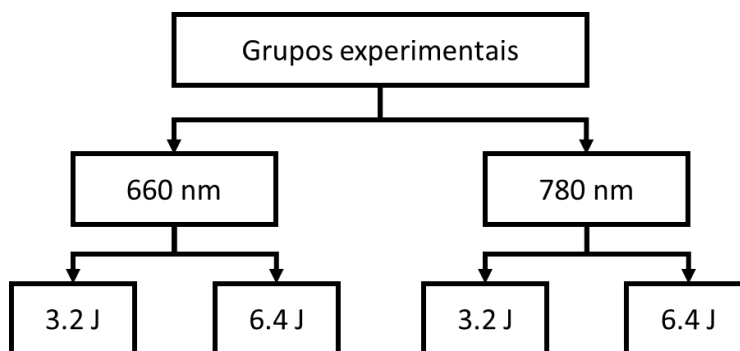


Figura 5: Fluxograma demonstrando os grupos experimentais.

3.2.5 Ensaio da atividade mitocondrial – MTT

As células foram incubadas em placas de cultura de fundo chato de 24 poços (1×10^4 células/poço) e após 1, 3 e 7 dias de incubação foi adicionado 100 ul de MTT (5 mg/ml) em cada poço. Após 3 horas a 37°C o meio foi removido e 200 ul de DMSO foi adicionado em cada poço para leitura da absorbância no leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek) em 550 de densidade óptica.

3.2.6 Ensaio da atividade mitocondrial – Resazurina

As células foram incubadas em placas de cultura de fundo chato de 24 poços (1×10^4 células/poço) e após 1, 3 e 7 dias de incubação foi adicionado meio fresco com 10% (v/v) de resazurina em cada poço. Após 3 horas a 37°C 100 ul foi transferido para uma placa de 96 poços e a intensidade da fluorescência foi mensurada no leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek) em excitação no comprimento de onda de 535 nm e emissão em 590 nm.

3.2.7 Ensaio de ferida

As células foram incubadas em placas de cultura de fundo chato de 24 poços (1×10^4 células/poço) e após 3 dias estavam em confluência adequada para ser realizado o ensaio. Uma ponteira de 10 ul foi utilizada para realização da ferida. Os poços foram fotografados no momento da lesão, 2, 4, 6 e 8 h após. Para quantificação da distância entre a área lesionada o fundo do poço foi

marcado para ser fotografada a mesma área e foi utilizado o software ImageJ (National Institute of Health – NIH, EUA) na versão standard, plugin básico.

3.2.8 Microscopia confocal

As culturas celulares foram fixadas com 3.7% de paraformaldeído. Após, a lamínula circular foi incubada por 30 min com 0,1% (v/v) de solução de Triton X-100 e por 30 min com solução de albumina bovina sérica 1% (BSA) . Após, 100 uL de anticorpo S-100 (1:50 in BSA 1%) foi adicionado e incubado overnight em câmara úmida a 4° C e conjugadas com Alexa Fluor 488 (1:500 em BSA 1%) por 1 h. Os filamentos de F-actina foram visualizados por tratamento das células com Alexa Fluor 594-conjugated phalloidin (diluição 1:20; 1 h) e os núcleos com iodeto de propídio (1 ug/mL; 10 min). As amostras coradas foram montadas em Vectashield® e examinadas por microscopia de fluorescência (Leica SP2 AOBS) e analisadas com o software Leica Application Suite X 3.3.0.16799 (Leica Microsystems CMS GmbH, 2017).

3.2.9 Citometria de fluxo

As amostras foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 5 min a 10° C, o pellet foi lavado duas vezes com PBS (10% SFB), após ressuspenso em Annexin Binding Buffer, então foi adicionado 10 uL de iodeto de propídio e 5 uL de FITC Annexin V em cada amostra. Após 15 minutos 400 uL de Annexin Binding Buffer foi adicionado e as amostras foram filtradas para análise em citômetro de fluxo BD FACSAria™ II High Speed Cell Sorter, as amostras foram analisadas para o ciclo celular e apoptose através do software FlowJo 10.4.2 (FlowJo, LLC, 2018).

3.2.10 RT-qPCR

O RNA total foi isolado de placas usando TRIzol (Invitrogen, CA, USA), de acordo com instruções do fabricante. A quantidade e integridade do RNA foi mensurada em um leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek). A síntese de cDNA foi realizada com o iScript® Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR e a RT-qPCR foi realizada usando SSoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix e CFX96 Touch Real Time Detection System (BIO-RAD). As condições

de ciclagem térmica foram 96° C por 2 min, seguido de 40 ciclos em 96° C por 5 s e 60° C por 30 s. Foi adquirido placas customizadas de 96 poços (BIO-RAD) contendo os primers BDNF, GDNF, IL1B, MCP-1, NGF e NTF3 que já estavam previamente no site do fabricante. O gene de referência GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) foi utilizado para normalizar os dados usando a mesma quantidade de cDNA. A quantificação foi realizada usando o método 2- $\Delta\Delta$ CT.

3.2.11 Análise dos resultados

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 erro padrão da média, sendo submetidos ao teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os níveis de confiança foram ajustados para 95% ($p \leq 0,05$).

3.3 Ensaios *in vivo* – Artigos 3 e 4

3.3.1 Local

O estudo foi realizado no laboratório de pesquisa do curso de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação e em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde, localizado na Unidade Vergueiro, 3º subsolo, da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) que foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da UNINOVE (CEUA 2/2016).

3.3.2 Animais

Foram utilizados 85 ratos da linhagem Wistar, pesando entre 200-250g mantidos no biotério da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) aprovado pelo CEUA (2/2016). 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*.

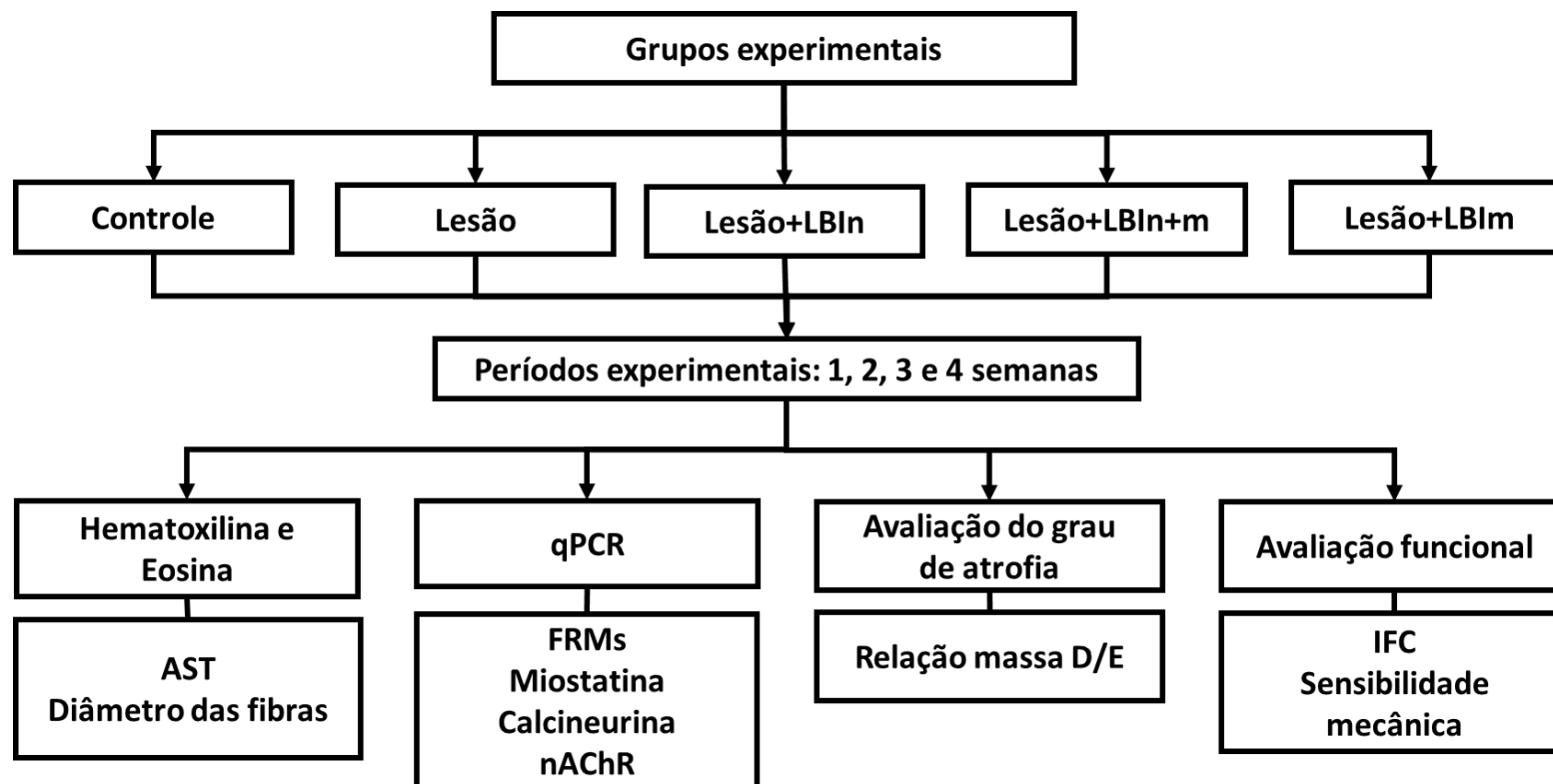


Figura 6: Fluxograma da metodologia de estudo incluindo as análises e diferentes períodos experimentais.

3.3.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais:

- **Grupo Controle:** os animais não foram submetidos a nenhum procedimento (n=5);
- **Grupo Lesão:** foi realizado o esmagamento do nervo isquiático esquerdo (NIE) dos animais (n=20);
- **Grupo Lesão+LBI:** foi realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberam tratamento com irradiação LBI na área correspondente à lesão nervosa (n=20);
- **Grupo Lesão+LBImm:** foi realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberam tratamento com irradiação LBI no músculo tibial anterior esquerdo (TAE) (n=20);
- **Grupo Lesão+LBI+LBImm:** foi realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberam tratamento com irradiação LBI na área correspondente à lesão nervosa e no músculo TAE (n=20);

3.3.4 Procedimento cirúrgico

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 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.

Os animais foram tricotomizados, posicionados em decúbito ventral 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 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 observação.

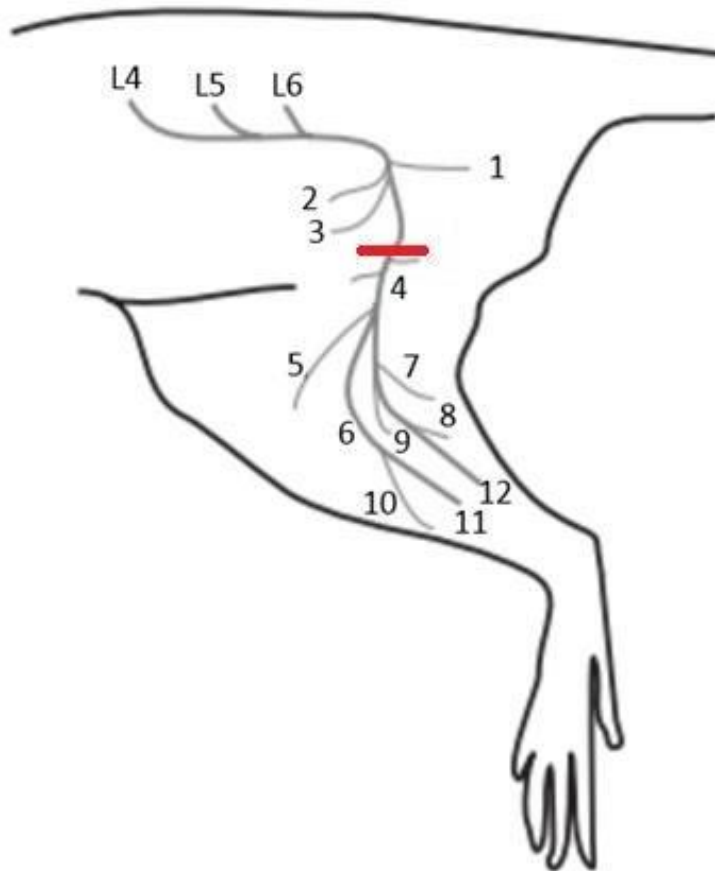


Figura 7: Demonstração do local de esmagamento do nervo isquiático (em vermelho) (adaptado de Hebel e Stromberg, 1986).

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 tetraciclina 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).

3.3.5 FBM

A FBM foi realizada com base nos parâmetros descritos anteriormente por Alves et al. (2014) para a irradiação muscular e adaptado de Sousa et al. (2009) para a irradiação área de LNP, sendo utilizado o equipamento Twi n Laser® (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil). Os parâmetros utilizados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros utilizados para o tratamento com FBM.

Meio ativo	Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)	
Local de irradiação	Muscular	Nervoso
Comprimento de onda	780 nm	780 nm
Área do feixe	0.04cm ²	0.04cm ²
Potência média	40 mW	40 mW
Densidade de potência	1W/cm ²	1W/cm ²
Densidade de energia	10J/cm ²	20J/cm ²
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

Para evitar refração do feixe do laser foi utilizado para aplicação o ângulo de 90 graus entre o emissor e a pele do animal ou entre o emissor e o microtubo. No início e final do procedimento experimental, a potência de emissão de luz do laser foi aferida utilizando o “LaserCheck power meter” (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil).

Nos grupos com irradiação LBI pós LNP o tratamento foi iniciado 2h após a realização da indução da lesão, sendo realizada uma única aplicação diária por 5 dias consecutivos semanalmente em cada grupo experimental até a finalização dos diferentes períodos de análise (Silva-Couto et al. 2012; Alves et al. 2014). Foi utilizada a técnica pontual diretamente sobre a região da incisão, ao redor da área da lesão em quatro pontos, dois acima e dois abaixo da incisão

com 1 cm de distância (nos grupos com irradiação na área correspondente à lesão nervosa).

Os grupos que receberam a irradiação no músculo tibial anterior, tiveram a aplicação realizada em 8 pontos, conforme descrito por Alves et al. (2014).

3.3.6 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.

Para obtenção das pegadas, as patas foram em tinta, deixando a cor 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 8).

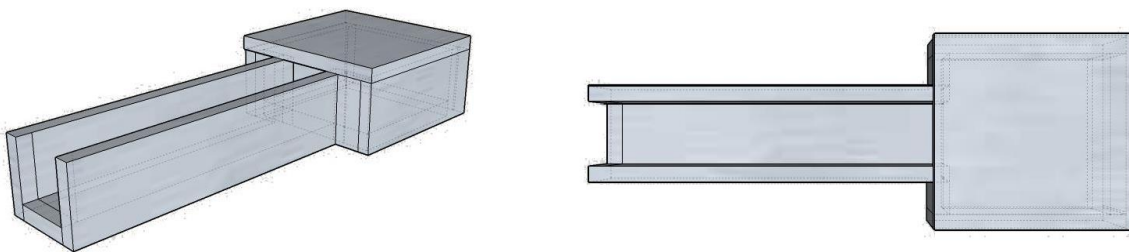


Figura 8: Vista isométrica e vista superior do modelo da passarela utilizado para o IFC (desenhado com o SketchUp make, versão 15.3.331, 2015, Trimble Navigation Limited).

As impressões das patas foram digitalizadas e foram analisados os parâmetros sugeridos por Bain et al. (1989), conforme figura 9: 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*).

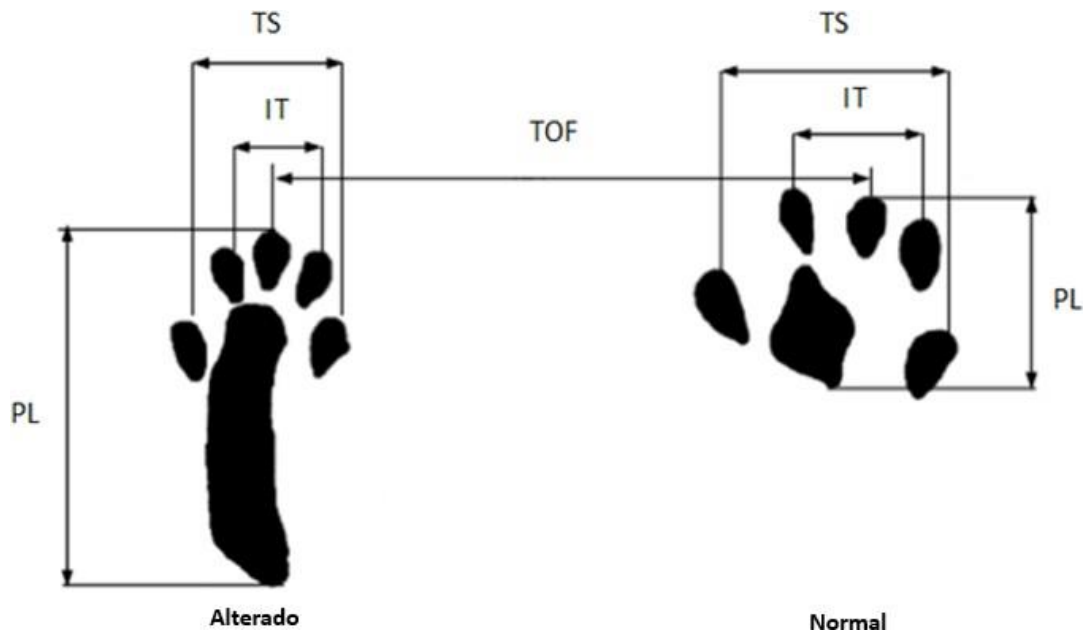


Figura 9: Representação dos parâmetros obtidos para cálculo do IFC, da esquerda para a direita estão representadas as patas do nervo lesionado e normal.

O IFC foi calculado a partir da fórmula:

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

$$IFC = -37,2 \times \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 104,4 \times \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13,3 \times \left(\frac{EIT - NIT}{EIT - NIT} \right) - 8,8$$

$$IFP = -174,9 \times \left(\frac{EPL - NPL}{L} \right) + 80,3 \times \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 45,6 \times \left(\frac{EIT - NIT}{EIT - NIT} \right) - 13,4$$

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

IFT: Índice Funcional do Tibial

IFP: Índice Funcional do Peroneio (fibular)

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).

3.3.7 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 e foram habituados por 20min, antes da execução de cada teste e nos três dias que antecedem a primeira coleta foram 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) pelo mesmo operador e a média aritmética da resposta de retirada foi obtida a partir dessas três medidas.

3.3.8 Eutanásia

Todos os animais foram eutanasiados com superdose de anestésico 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 análise histológico 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 e de colágeno e a restante para expressão gênica e Elisa.

3.3.9 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).

3.3.10 Avaliação qualitativa e quantitativa dos aspectos morfológicos musculares

As amostras musculares foram também utilizadas para análise morfológica e para este procedimento foram 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 serem avaliados os seguintes aspectos morfológicos: diâmetro das fibras musculares, área de secção transversa (AST) e localização do núcleo.

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) e os dados foram submetidos à análise estatística.

3.3.11 Extração de RNA total

Para este procedimento foram utilizados 80-100mg do músculo gastrocnêmio removido após eutanásia, utilizando para tal procedimento 5 amostras musculares correspondentes a 5 animais de cada grupo. O tecido foi homogeneizado em 1ml do reagente TRIzol (Life Technologies, São Paulo, Brasil), para iniciar o isolamento do RNA total, seguindo as orientações do fabricante. Na sequência, foi realizada a centrifugação das amostras e feita à transferência do sobrenadante para um novo microtubo. Foram adicionados 200µl de clorofórmio para separação das diferentes frações (DNA, RNA e proteína) e transferência da fase aquosa superior contendo o RNA total para um novo microtubo.

Por fim, foram adicionados 500µl de isopropanol para precipitação do RNA total. A ressuspensão do RNA total precipitado foi feita utilizando água livre de RNase e as amostras foram armazenadas a -80° C.

Para verificação do sucesso do procedimento de extração, as amostras de RNA total foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1%. O RNA total foi quantificado por espectrometria em 260nm no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) e todas as amostras foram tratadas com DNase (Life Technologies) para evitar contaminação com DNA genômico. Todas as soluções utilizadas para os procedimentos descritos foram preparadas com água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC (Diethyl

pirocarbonato) e, além disso, os materiais plásticos e vidraria também receberam tratamento contra RNase.

3.3.12 Síntese de cDNA e PCR quantitativo

O RNA total foi submetido à reação com a enzima transcriptase reversa utilizando o Kit High Capacity (Life Technologies) para a obtenção do cDNA e este foi utilizado para a reação de PCR em tempo real utilizando o “SYBR Green Kit” (Applied Biosystems, EUA). Para este procedimento as amostras foram analisadas em duplicata. O software usado foi o “7500 Fast Real-Time PCR System” (Applied Biosystem, EUA).

Os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) foram usados para a realização deste procedimento, os mesmos estão descritos na tabela 2. Para normalização dos dados foram utilizados primers para GAPDH e para a comparação entre os dados entre os grupos (controle e tratado), unidades arbitrárias foram calculadas da seguinte forma:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{amostra} - \Delta CT_{controle}$$

$$Unidade\ arbitrária = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Sendo:

CT: *threshold cycle*.

Tabela 3: Lista dos primers utilizados na técnica qPCR.

Gene	Sequência	Nº amplicon	Nº acesso
MyoD	F: 5'-GGAGACATCCTCAAGCGATGC-3' R: 5'-AGCACCTGGTAAATCGGATTG-3'	105	NM_176079.1
Miogenina	F: 5'-ACTACCCACCGTCCATTAC-3' R: 5'-TCGGGGCACTCACTGTCTCT-3'	233	NM_017115.2
Miostatina	F: 5'-CTACCACGGAAACAATCATTA-3' R: 5'-AGCAACATTTGGGCTTTCCAT-3'	78	NM_019151.1
Calcineurina	F: 5'-AGGCGATTGATCCCAAGTTG-3' R: 5'-GGAAATGGAACGGCTTTTCCAC-3'	58	NM_017041.1
AchR Gama	F: 5'-CCACCAGAAGGTGGTGTCT-3' R: 5'-TGAGGAGATGAGCACACAGG-3'	91	NM_019145.1
AchR Alfa 1	F: 5'-TCCCTTCGATGAGCAGAACT-3' R: 5'-AGCCGTCATAGGTCCAAGTG-3'	56	NM_024485.1
AchR Épsilon	F: 5'-GGCTCAACTTCAGCAAGGAC-3' R: 5'-AGCCATACATGTTCCGGAAGG-3'	70	NM_017194.1
AchR Beta 1	F: 5'-CATCGAGTCTCTCCGTGTCA-3' R: 5'-GGCAACGTCAAAGTTTCCAT-3'	88	NM_012528.
AchR Delta	F: 5'-ACCACCAAGACGTCACCTTC-3' R: 5'-CCGAGGTCTTCTCTCCACAG-3'	144	NM_019298.1
GAPDH	F: 5'-GCATCCTGGGCTACACTGA-3' R: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	162	NM_017008.4

3.3.13 Análise dos resultados

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 erro padrão da média se paramétricos, 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

4.1 Artigo 1

Efeitos da fotobiomodulação em modelos experimentais de lesão nervosa periférica (artigo publicado pela Lasers in Medical Science)

Andreo L¹, Soldera CA², Ribeiro BG², Raoul P³, Bussadori SK^{1,2}, Fernandes KPS¹, Mesquita-Ferrari RA^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil

³ Programa de Graduação em Fisioterapia, UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil

Correspondência:

Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari

raquel.mesquita@gmail.com

Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde;
Universidade Nove de Julho – UNINOVE

www.uninove.br

Rua Vergueiro, 349, CEP 01504001, São Paulo – SP, Brasil

Tel. +55 11 3385-9222

Financiamentos: Este trabalho teve apoio da UNINOVE e das seguintes agências de financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (www.cnpq.br; número do processo: 305739/2014 RAMF); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (www.capes.gov.br; número do processo: 1550120 LA; 1510536 BGR); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (www.fapesp.br; número do processo: 2014/12381-1 RAMF,417 2013/07502-1 KPSF).

RESUMO

Introdução: O tratamento com fototerapia tem demonstrado efeitos positivos nos tratamentos de lesão nervosa periférica, porém há uma necessidade da investigação dos seus parâmetros dosimétricos. Dessa forma, este estudo visa revisar os efeitos terapêuticos da fotobiomodulação com o uso do laser em baixa intensidade (LBI) no tratamento de LNP em modelos experimentais.

Metodologia: O levantamento bibliográfico foi realizado nas seguintes bases de dados: PubMed/MEDLINE, SCOPUS e SPIE Digital Library, para artigos originais publicados em inglês de janeiro de 2007 a março de 2016 sobre o uso de LBI em modelos experimentais de LNP.

Resultados: Foram selecionados 18 artigos originais, demonstrando os efeitos do LBI na aceleração da recuperação funcional, nos aspectos morfológicos e na modulação na expressão de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento.

Conclusão: O LBI é um recurso fototerapêutico viável para o tratamento de uma LNP, demonstrando efeitos positivos sobre o reparo neuromuscular através do uso do LBI vermelho e do infravermelho. A maioria dos estudos utilizou uma potência de até 50 mW e energia total de até 15 J aplicado no modo de múltiplos pontos. O levantamento desses parâmetros é importante para a padronização de um protocolo de irradiação com objetivo de evidenciar os efeitos do LBI na regeneração pós LNP.

Palavras-chave: Regeneração nervosa, terapia a laser em baixa intensidade, nervo isquiático, fotobiomodulação

INTRODUÇÃO

As lesões nervosas periféricas são mais frequentes que as lesões medulares. Clinicamente, uma lesão nervosa periférica (LNP) não apresenta risco de vida ao indivíduo, mas pode gerar um impacto negativo na qualidade de vida já que existe a possibilidade de não ocorrer uma completa regeneração deste tecido, resultando em distúrbios motores (paralisia) ou sensoriais (anestesia, parestesia, neuropatia dolorosa), portanto há um grande interesse na investigação do tratamento mais adequado, visto que as fibras nervosas têm potencial regenerativo [1-5].

Em situação de LNP, se inicia o processo de reparo englobando o crescimento neuronal, reinervação e recuperação funcional. As lesões de nervo periférico podem ser classificadas em três tipos: neuropraxia, onde não há mudanças estruturais, com mínima perda sensorial ou motora em resultado de uma pressão leve; axonotmese, havendo uma degeneração *Walleriana* do axônio distalmente, não havendo perda das células Schwann, mantendo o tecido conjuntivo; e, por fim, a neurotmese, resultante da secção completa do nervo, podendo gerar uma fibrose tecidual por degeneração proximal e distal [6].

Há diferentes modelos de LNP para estudos experimentais, como o esmagamento [7], compressão nervosa [8, 9], laceração e transecções completas [10, 11]. Sendo que o maior desafio está na padronização dessas lesões. Nos estudos onde é realizado uma axonotmese ou neuropraxia, a garantia de uma lesão padronizada é menor quando comparada à neurotmese, pois não há garantia da lesão da mesma quantidade de fibras em todos os experimentos [12, 13]. Na neurotmese, há interrupção da continuidade nervosa e os músculos que seriam inervados por aquela fibra sofrem deterioração progressiva por desnervação [14], ocorrendo uma insuficiência na reposição da perda degenerativa tecidual [11]. Essas incapacidades regenerativas demonstram a necessidade de uma terapêutica adequada a fim de otimizar e acelerar o processo de reparo nervoso.

Recentemente, o Laser em Baixa Intensidade (LBI) tem ganhado destaque na literatura devido ao seu efeito fotobiomodulatório (FBM) que pode causar uma inibição ou estimulação do metabolismo tecidual. Acredita-se que seu mecanismo de ação consista na absorção da luz (fótons) pelos

fotorreceptores, alterando a síntese de ATP na mitocôndria através da aceleração da cadeia transportadora de elétrons e, assim, modulando as reações celulares [15, 16]. Dessa forma, o LBI pode gerar um aumento da funcionalidade pós lesão [17], aumento do diâmetro axonal [18, 19], aumento da espessura da bainha de mielina [19], diminuição do infiltrado inflamatório mononuclear [20], aumento do número de células de Schwann [21], aumento de fatores de crescimento neurotróficos [22] e remodelamento da matriz extracelular (MEC) [23].

Contudo, não há uma padronização no tratamento com LBI sendo utilizados diferentes parâmetros de irradiação em diferentes modelos de LNP, resultando em uma diversidade dos efeitos fotobiomodulatórios. Portanto, o objetivo do presente estudo foi compilar uma revisão para demonstrar a aplicabilidade do tratamento com LBI em modelos experimentais de LNP.

METODOLOGIA

As pesquisas foram realizadas nas bases de dados PubMed/MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), SCOPUS e SPIE Digital Library para artigos originais que utilizaram modelos experimentais de LNP e irradiados com LBI. Foram selecionados artigos publicados em inglês de janeiro de 2007 a março de 2016. Os termos utilizados para busca foram "lasers", "laser therapy", "low-level laser therapy", "low intensity laser therapy", "irradiation", "phototherapy", "photobiomodulation"; "repair", "regeneration", "injury" e "peripheral nerve". As referências bibliográficas dos artigos foram analisadas para identificar estudos adicionais.

Os artigos foram selecionados segundo os critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão foram:

1. Artigos publicados entre janeiro de 2007 a março de 2016;
2. Estudos experimentais com modelos animais de lesão nervosa periférica;
3. Estudos com descrição dos parâmetros ou que permitiam calcular os parâmetros não descritos (comprimento de onda, potência média de saída, área do feixe, densidade de potência, densidade

de energia, energia por ponto, energia total, quantidade de pontos irradiados e tempo de irradiação por ponto).

Já os critérios de exclusão foram:

1. Ensaios clínicos e estudos *in vitro*;
2. Artigos de revisão;
3. Ausência de um grupo lesionado sem tratamento;
4. Modelos de lesão em nervos cranianos;
5. Irradiação não realizada em contato, não permitindo a descrição dos parâmetros reais.

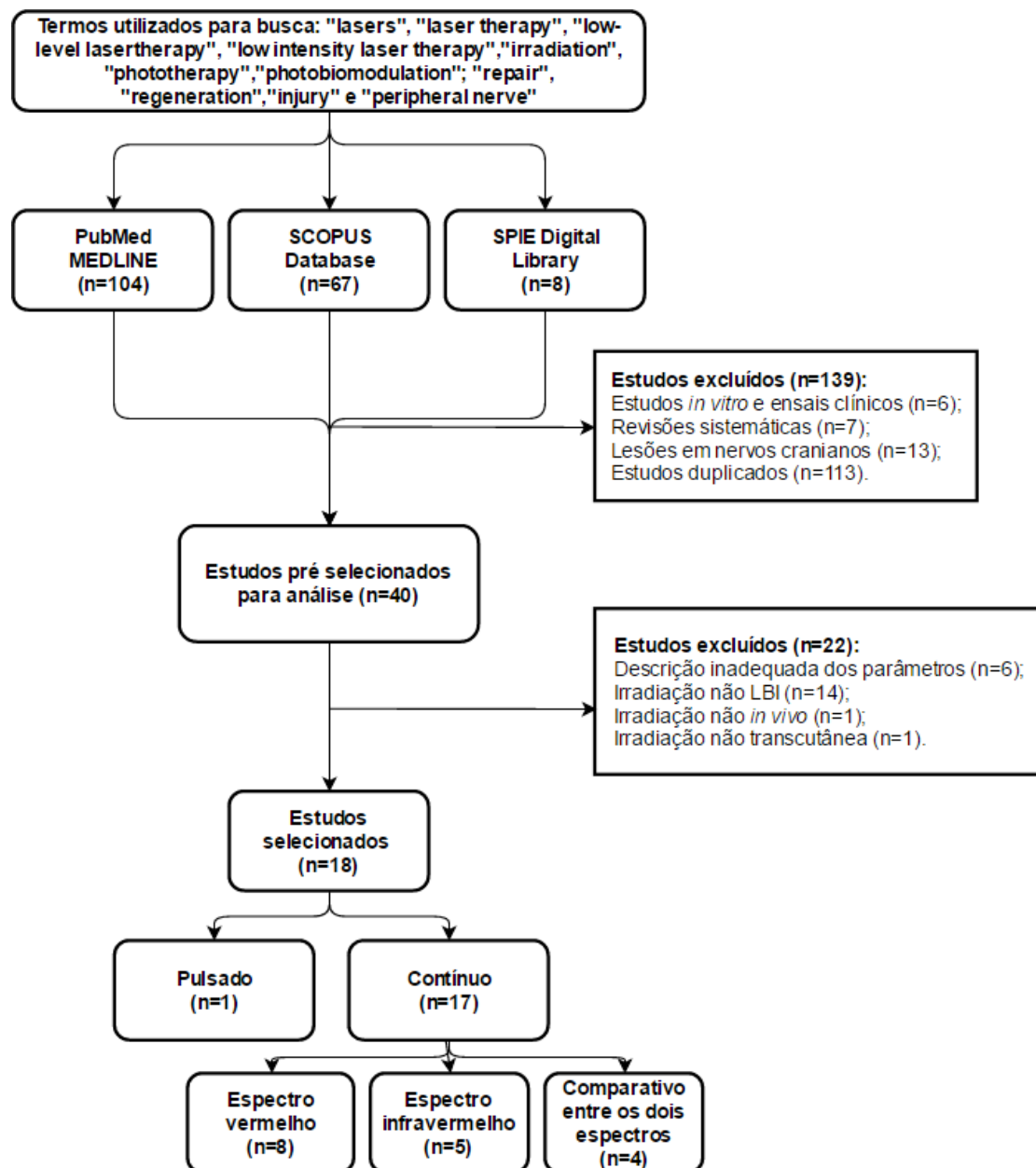


Figura 1. Fluxograma dos procedimentos de busca.

RESULTADOS

Foram identificados 179 artigos potencialmente relevantes. Após a leitura e análise dos resumos, 139 artigos foram excluídos pelas seguintes razões: modelos de lesão em nervos cranianos (n=13), estudos *in vitro* (n=4), estudos com radioterapia (n=2), ensaios clínicos (n=2), revisões sistemáticas (n=7), irradiação realizada na prótese (n=1), irradiação LED (n=4), estudos com laser em alta potência (n=8), descrição inadequada de parâmetros (n=6), irradiação não transcutânea (n=1) e estudos duplicados em bases de dados diferentes (n=113).

Dessa forma, 18 artigos foram incluídos para análise dos efeitos do LBI na LNP. Dos 18 artigos selecionados, a maioria realizou irradiação no modo contínuo (n=17). Destes, a maioria dos estudos (n=8; 44,4%) utilizaram, a irradiação no espectro de luz vermelha, cinco estudos (27,8%) utilizaram o laser infravermelho, e quatro estudos (22,2%) utilizaram os dois espectros, sendo somente um estudo (5,55%) realizado no modo pulsado com comprimento de onda no espectro infravermelho.

Além disso, os estudos realizaram diferentes modelos experimentais de lesão nervosa periférica: esmagamento (n=9; 50%), transsecção seguida por neurorrafia ou anastomose (n=4; 22,2%), constrição crônica (n=3; 16,7%) e transsecção seguida por tubulização (n=2; 11,1%). Os tipos de nervos utilizados foram em sua maioria o nervo isquiático (n=16; 88,9%), um estudo o nervo fibular (5,55%) e um estudo (5,55%) o gânglio da raiz dorsal (L4-L5). Os animais utilizados nos modelos experimentais foram ratos Wistar (n=12; 66,7%), ratos Sprague-Dawley (n=5; 27,8%) e coelhos Nova Zelândia (n=1; 5,55%).

A seguir, estão apresentados os artigos que utilizaram o laser no modo contínuo no espectro vermelho na tabela 1, na tabela 2 os que utilizaram o espectro infravermelho no modo contínuo, na tabela 3 no modo pulsado (espectro infravermelho) e na tabela 4 os artigos que compararam os dois espectros de laser (vermelho e infravermelho) no modo contínuo.

Tabela 1: Estudos selecionados que utilizaram laser no modo contínuo (espectro vermelho).

Autores	Nervo e Animal	Modelo de lesão	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Área do feixe (cm ²)	Densidade de Energia (J/cm ²)	Energia total por tratamento (J)	Único ou Múltiplos pontos	Início e frequência do tratamento	Períodos de análise	Resultados
Alcântara et al. (2013)	n. isquiático (ratos Wistar)	Esmagamento	660	40	0.04	60	4.8	Múltiplos pontos (2)	24h pós lesão, diariamente por 2 dias consecutivos	3 dias	↑ TNF-α e da MMP9 ativa
Belchior et al. (2009)	n. isquiático (ratos Wistar)	Esmagamento	660	26.3	0.63	4	7.6	Múltiplos pontos (3)	Após a operação por 20 dias consecutivos	7, 14 e 21 dias	↑ Funcionalidade (IFC)
Gomes et al. (2012)	n. isquiático (ratos Wistar)	Esmagamento	632.8	5	0.1	10	1	Múltiplos pontos (10)	24h pós lesão, diariamente por 21 dias consecutivos	7, 14 e 21 dias	↑ RNAm de BDNF e NGF ↓ RNAm de iNOS
Hsieh et al. (2012)	n. isquiático (ratos Sprague-Dawley)	Constricção crônica	660	30	≈0.2	9	7.2	Múltiplos pontos (4)	7 dias pós lesão por 7 dias consecutivos	Pré, pós 7 e 14 dias	↑ S100, VEGF e NGF ↓ Expressão de HIF-1α, TNF-α e IL-1β ↑ Funcionalidade (von Frey, IFC, IFF e IFT)
Reis et al. (2009)	n. isquiático (ratos Wistar)	Transecção seguida de anastomose	660	26.3	0.63	4	7.6	Múltiplos pontos (3)	Após a operação por 20 dias consecutivos	21 dias	↑ Bainha de Mielina
Shen et al. (2011)	n. isquiático (ratos Sprague-Dawley)	Transecção seguida de tubulização	660	50	314	3,84	15	Único ponto	Primeiro dia pós operatório por 21 dias consecutivos	1, 2, 4, 6, 8 semanas (IFC) e 8 semanas	↑ Funcionalidade (IFC) ↑ Pico de amplitude e CMAPs (ENMG) ↑ Fibras nervosas, diâmetro axonal e bainha de mielina
Shen et al. (2013)	n. isquiático (ratos Sprague-Dawley)	Transecção seguida de tubulização	660	50	314	5.76 0.96	90 15	Único ponto	Imediatamente pós cirurgia e por 9 dias consecutivos	12 semanas	↑ S100 e MAP2 ↑ Funcionalidade (IFC) ↑ CMAPs (ENMG) ↓ Atrofia muscular ↑ Imunomarcagem de S100 e NF ↑ Diâmetro e número de fibras nervosas, diâmetro axonal, espessura da bainha de mielina
Takhtfooladi et al. (2015)	n. isquiático (ratos Wistar)	Esmagamento	685	15	0.028	3	0.15	Único ponto	Após a operação por 21 dias consecutivos	7, 14 e 21 dias	↑ Funcionalidade (IFC, IEC)

TNF-α: fator de necrose tumoral α; MMP9: metaloproteinase de matriz 9; IFC: índice funcional do ciático; BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; NGF: fator de necrose neuronal; iNOS: óxido nítrico sintase induzida; S100: marcador de células de Schwann; VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular; HIF-1α: fator induzido por hipóxia 1α; IL-1β: interleucina 1β; IFF: índice funcional do fibular; IFT: índice funcional do tibial; ENMG: eletroneuromiografia; MAP2: proteína associada ao microtúbulo; CMAP: potencial de ação muscular composto; NF: neurofilamento; IEC: índice estático do ciático.

Tabela 2: Estudos selecionados que utilizaram laser no modo contínuo (espectro infravermelho).

Autores	Nervo e Animal	Modelo de lesão	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Área do feixe (cm ²)	Densidade de Energia (J/cm ²)	Energia total por tratamento (J)	Único ou Múltiplos pontos	Início e frequência do tratamento	Períodos de análise	Resultados
Chen et al. (2014)	Gânglio da raiz dorsal L4-L5 (ratos Sprague-)	Constricção crônica	808	190	0.5	72	36	Único ponto	24h pós lesão, diariamente por 8 dias	4 e 8 dias 8 dias	↓ Hiperalgia mecânica e térmica ↓ RNAm de TNF- α , IL-1 β e GAP43 ↑ GAP43 e ↓ TNF- α
Dias et al. (2013)	n. isquiático (ratos Wistar)	Esmagamento	780	30	0.04	15	1.8	Múltiplos pontos (3)	A cada 48h, totalizando 6 sessões	4 e 8 semanas	↑ Mielina/área de secção transversa ↑ Vasos sanguíneos
Dias et al. (2015)	n. isquiático (ratos Wistar)	Esmagamento	780	30	0.04	15	1.8	Múltiplos pontos (3)	A cada 48h, totalizando 6 sessões	4 e 8 semanas	↑ Diâmetro das fibras nervosas
Sousa et al. (2009)	n. isquiático (ratos Wistar)	Esmagamento	830	40	0.03464	20	2.77	Múltiplos pontos (4)	Diariamente por 28 dias	Pré-operatório, 2, 3 e 4 semanas	↑ Funcionalidade (IFF)
Wang et al. (2014)	n. isquiático (ratos Sprague-Dawley)	Esmagamento	808	170	3.8	3 8 15	11.4 30.4 57	Único ponto	Diariamente por 20 dias	20 dias	↑ Funcionalidade (IFC) ↑ ADM ↑ Espessura da bainha de mielina e GAP43

TNF- α : fator de necrose tumoral α ; IL-1 β : interleucina 1 β ; GAP43: proteína associada ao crescimento 43; IFF: Índice funcional do fibular; ADM: amplitude de movimento.

Tabela 3: Estudo selecionado que utilizou laser no modo pulsado (espectro infravermelho).

Autores	Nervo e Animal	Modelo de lesão	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Potência média (mW)	Área do feixe (cm ²)	Densidade de Energia (J/cm ²)	Energia total por tratamento (J)	Único ou Múltiplos pontos	Início e frequência do tratamento	Períodos de análise	Resultados
Mohammed et al. (2007)	n. fibular (coelhos Nova Zelândia)	Transecção seguida por Neurorrafia	901	10	2	16	0.075	1.2	Único ponto	Pós operatório e por 10 dias consecutivos	2, 4, 6 e 8 semanas	↑ Comprimento da fibra e diâmetro internodal

Tabela 4: Estudos selecionados que utilizaram laser no modo contínuo (espectro vermelho e infravermelho).

Autores	Nervo e Animal	Modelo de lesão	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Área do feixe (cm ²)	Densidade de Energia (J/cm ²)	Energia total por tratamento (J)	Único ou Múltiplos pontos	Início e frequência do tratamento	Períodos de análise	Resultados
Barbosa et al. (2010)	n. isquiático (ratos Wistar)	Esmagamento	660	30	0.06	10	0.6	Único ponto	Imediatamente pós cirurgia e por 20 dias consecutivos	Pré-operatório, pós 1, 2 e 3 semanas	↑ Funcionalidade (IFC)
			830		0.116		1.16				
Masoumipoor et al. (2014)	n. isquiático (ratos Wistar)	Constricção crônica	660	100	≈0.238	4	3.4	Múltiplos pontos (3)	Pós cirúrgico, diariamente por 2 semanas	Pré-operatório, pós 1 e 2 semanas	↑ Limiar térmico e mecânico de retirada da pata
			980	70							
Medalha et al. (2012)	n. isquiático (ratos Wistar)	Transecção seguida de anastomose	660	30	0.028	10	0.81	Múltiplos pontos (3)	24h pós operatório, 5 irradiações semanais por 3 semanas	A cada 3 semanas (IFC) e 4 meses	↑ Funcionalidade (IFC) ↑ Diâmetro da fibra nervosa e axonal ↑ Densidade da fibra nervosa, espessura da mielina e mielina/axônio
			808				4.23				
Silva-Couto et al. (2012)	n. isquiático (ratos Wistar)	Transecção seguida de Neurorafia	660	40	0.04	10	2.4	Múltiplos pontos (4)	Pós operatório por 10 dias consecutivos e em dias alternados por mais um mês	Pré-operatório, pós 1 e 84 dias (IFC) e 84 dias	
			60			4.8					
			120			9.6					
			10			2.4					
			60			4.8					
780	120	9.6									

IFC: índice funcional do ciático.

DISCUSSÃO

Anualmente nos Estados Unidos da América e na Europa, aproximadamente 100.000 pessoas são submetidas a operações com objetivo de recuperação nervosa periférica, havendo um avanço tecnológico na área de microcirurgia. Porém, sem uma recuperação funcional satisfatória, demonstrando a necessidade de maior investigação do processo de reparo neste tecido [3].

Há diversos tratamentos cirúrgicos, como a neurorrafia [24], enxertia [25] e a tubulização [11]. Além da cirurgia, há outros tipos de terapia, como o LBI [24], eletroterapia e ultrassom terapêutico, que são estímulos físicos com objetivo de modular a reinervação [1], além das terapias biológicas, como inoculação celular e de fatores de crescimento na região lesionada [26, 27].

Especificamente, o LBI demonstra efeitos variados em diferentes parâmetros de aplicação, como aumento de funcionalidade [9], amplitude de movimento [28], atenuação da disestesia [29] e modulação da concentração de citocinas inflamatórias [30]. Assim, a necessidade da compreensão dos mecanismos de ação envolvidos na modulação do processo inflamatório se torna evidente, a fim de atingir os efeitos desejados.

A descrição inadequada dos parâmetros impossibilitou a inclusão de muitos estudos com resultados promissores. A ausência da descrição do modo de aplicação, da frequência (modo pulsado), área do feixe, fluência e energia impossibilitam a reprodutibilidade dos experimentos, assim como a frequência e início do tratamento, já que esses parâmetros levam a diferentes efeitos, deixando assim uma barreira na interpretação dos resultados.

Nos artigos selecionados, verifica-se que não há uma padronização dos parâmetros. Além disso, modelos experimentais diferentes testariam aspectos diferentes de uma LNP. Em modelos de constrição crônica há uma predominância de alterações sensitivas [9, 30], enquanto modelos de transsecção e esmagamento [19, 22] possuem alterações mistas, sendo importante para a investigação dos aspectos motores e sensitivos de uma LNP de acordo com o modelo experimental escolhido. Ressaltando que em modelos de neurotmesa, há uma garantia do processo de degeneração walleriana, com

consequente atrofia muscular, alterando a distribuição de colágeno muscular e consequentemente a função muscular [10, 31, 32].

Modelos de axonotmese tem como vantagem a maior padronização da lesão e a ausência de treinamento microcirúrgico, porém devido à alta velocidade de retorno às condições basais, há uma maior dificuldade em obter diferenças significantes da terapêutica proposta em relação ao grupo submetido somente à lesão, em contrapartida, modelos de neurotmese apresentam velocidade de regeneração mais lenta, sendo mais crítico para transposição do modelo para ensaios clínicos [31].

Efeitos do LBI na funcionalidade

Após uma LNP, a recuperação funcional se inicia após 12 dias em uma axonotmese e em 30 dias em uma neurotmese, atingindo um platô em 28 e 120 dias respectivamente [31].

O LBI demonstrou um aumento na velocidade de recuperação funcional, tanto no espectro vermelho, quanto infravermelho. Em modelos experimentais de axonotmese por esmagamento, o LBI vermelho demonstrou melhora na funcionalidade através do estudo de Belchior et al. [33], onde o grupo irradiado após a operação por 20 dias consecutivos (660 nm, 26.3 mW, 7.6 J) demonstrou um aumento do índice funcional do ciático (IFC) pós 21 dias de lesão, corroborando com Takhfooladi et al. [34] que demonstraram esse aumento no grupo irradiado após a operação por 21 dias consecutivos (660 nm, 15 mW, 0.15 J) em 14 e 21 dias pós lesão, tanto no IFC, quanto no IEC (índice estático do ciático), entretanto, Barbosa et al. [17] observaram esse aumento no índice somente em 14 dias pós lesão no grupo irradiado imediatamente após a cirurgia por 20 dias consecutivos (660 nm, 30 mW, 0.6 J). Já em grupos irradiados com LBI infravermelho, foi demonstrado um aumento no índice funcional do fibular (IFF) nos estudos de Sousa et al. [35] com irradiação diária por 28 dias (830 nm, 40 mW, 2.77 J) em 14 dias e no IFC no estudo de Wang et al. [28] (808 nm, 170 mW) nos grupos irradiados diariamente por 20 dias consecutivos com 3 e 8 J, além de um aumento na amplitude de movimento no grupo 8J.

Com relação aos modelos de constrição crônica, Hsieh et al. [9] demonstraram um aumento da funcionalidade nos grupos irradiados 7 dias pós

lesão por 7 dias consecutivos com LBI vermelho (660 nm, 30 mW, 7.2 J) no aspecto motor (IFC, IFF e índice funcional do tibial – IFT) e no aspecto sensitivo (hiperalgesia mecânica) em 7 dias pós lesão. No estudo de Chen et al. [30] foi demonstrado uma diminuição da hiperalgesia mecânica e térmica em 4 e 8 dias nos grupos irradiado 24h pós lesão diariamente por 8 dias com LBI infravermelho (808 nm, 190 mW, 36 J), esses estudos corroboram com Masoumpoor et al. [29] que demonstraram um aumento no limiar térmico e mecânico de retirada da pata dos animais nos grupos irradiados pós cirúrgico e diariamente por 2 semanas com LBI vermelho (660 nm, 100 mW, 3.4 J) e infravermelho (980 nm, 70 mW, 3.4 J).

Em modelos de neurotmeze seguida por tubulização como no estudo de Shen et al. [19] foi demonstrado um aumento do IFC e do pico de amplitude e potencial de ação muscular composto (CMAP) em 8 nos grupos irradiados no primeiro dia pós-operatório por 21 dias consecutivos com LBI vermelho (660 nm, 50 mW, 15 J). Já em outro estudo deste mesmo grupo [11] os mesmos resultados foram obtidos em animais irradiados no primeiro dia pós cirurgia e por 9 dias consecutivos, porém após 12 semanas (660 nm, 50 mW, com diferentes doses de energia; imediatamente pós lesão a energia foi de 90 J e nos 9 dias seguintes de 15 J). O aumento na velocidade de recuperação funcional também foi demonstrado em modelos de neurotmeze seguida por anastomose em animais irradiados 24h pós-operatório com frequência de 5 irradiações semanais por 3 semanas, como no estudo de Medalha et al. [36] os grupos irradiados (660 nm, 30 mW, 0.81 e 4.23 J) demonstraram um aumento no IFC em 4 meses. Porém no estudo de Silva-Couto et al. [10] em ratos lesionados por neurotmeze seguida por neurorrafia, nenhum dos parâmetros de irradiação (660 e 780 nm, 40 mW, 2.4, 2.4 e 9.6 J) demonstrou uma alteração na recuperação funcional avaliados através do IFC.

Esses achados demonstram que diferentes parâmetros alteram a velocidade de recuperação funcional motora e sensorial, sendo assim, a necessidade de um protocolo de irradiação se faz necessário para uma otimização dessa recuperação.

Efeitos do LBI nos aspectos morfológicos

A quantificação dos aspectos morfológicos das fibras nervosas, principalmente das fibras mielinizadas, é um parâmetro importante para investigação do processo regenerativo [4]. O número de fibras nervosas, densidade de fibras nervosas, diâmetro axonal e das fibras, área de secção transversa axonal e de fibras nervosas, perímetro axonal e das fibras nervosas e espessura da bainha de mielina são importantes para a análise da recuperação pós LNP [37]. Após uma LNP, mudanças morfológicas e metabólicas se tornam evidentes no sítio de lesão. Há alterações no corpo celular, no segmento distal e proximal da lesão nervosa, segmento distal na placa motora ou no receptor sensorial. Lesões por axonotmese e por neurotmese apresentam taxas de regeneração diferentes, sendo 3.0-4.4 mm/dia e 2.0-3.5 mm/dia em ratos e coelhos, respectivamente [37].

Em modelos de lesão por esmagamento, no estudo de Dias et al. [38] o LBI infravermelho com irradiação a cada 48h totalizando 6 sessões (780 nm, 30 mW, 1.8 J) demonstrou um aumento na concentração de mielina por área de secção transversa e no número de vasos sanguíneos em 4 e 8 semanas pós lesão. No estudo de Dias et al. [39] com os mesmos parâmetros (780 nm, 30 mW, 1.8 J) os achados demonstraram um aumento no diâmetro das fibras nervosas após 4 e 8 semanas pós lesão. Entretanto, Wang et al. [28] realizou irradiação com LBI infravermelho (808 nm, 170 mW, 11.4 e 30.4 J) demonstrando um aumento na espessura da bainha de mielina pós 20 dias de lesão.

Nos modelos de lesão por neurotmese, Mohammed et al. [18] demonstraram um aumento no comprimento da fibra e diâmetro internodal do nervo fibular de coelhos lesionados com transsecção seguida por neurorrafia após irradiação no pós-operatório e por 10 dias consecutivos com LBI infravermelho no modo pulsado (901 nm, 2 mW, 1.2 J) em 2, 4, 6 e 8 semanas pós lesão. No estudo de Shen et al. [19], o LBI vermelho (660 nm, 50 mW, 15 J) demonstrou um aumento no número de fibras nervosas, diâmetro axonal e da bainha de mielina em 8 semanas pós transsecção do n. isquiático de ratos seguida por tubulização. Shen et al. [11] realizaram irradiação no primeiro dia pós-operatório por 21 dias consecutivos com os mesmos parâmetros (660 nm, 50 mW, 15 J) por 9 dias consecutivos, porém com maior energia no pós-operatório imediato (660 nm, 50

mW, 90 J) demonstrando diferentes achados: aumento no número de células de Schwann, neurofilamento, diâmetro axonal, espessura da bainha de mielina, diâmetro e número de fibras nervosas no mesmo modelo de lesão em 12 semanas, demonstrando que uma alteração nos parâmetros de irradiação pode levar à diferentes achados. Em modelos de transecção seguida por anastomose, Reis et al. [40] utilizaram o LBI vermelho com irradiação após a operação por 20 dias consecutivos (660 nm, 26.3 mW, 7.6 J) tendo um aumento na bainha de mielina em 21 dias, diferente do estudo de Medalha et al. [36] com irradiação 24h pós-operatório, sendo 5 irradiações semanais por 3 semanas, utilizaram dois comprimentos de onda, com LBI vermelho (660 nm, 30 mW, 4.23 J) e com LBI infravermelho (808 nm, 30 mW, 4.23 J), e demonstrou um aumento no diâmetro axonal e das fibras nos animais irradiados com estes comprimentos de onda quando comparados ao grupo lesionado.

Os efeitos fotobiomodulatórios do LBI vermelho e infravermelho são positivos sobre os aspectos morfológicos dos estudos selecionados, sendo necessário a investigação dos mecanismos de ação dos diferentes parâmetros para confirmar as vias de sinalização.

Efeitos do LBI na expressão de citocinas e fatores de crescimento

Em uma LNP, há um aumento da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) resultando em um aumento no recrutamento de células inflamatórias para o local de lesão, levando a um aumento na produção e liberação de citocinas pró inflamatórias [22], como as associadas à dor neuropática, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β) [9, 30]. Essa liberação pode ser estimulada pelo fator induzido por hipóxia 1 alfa (HIF-1 α), sua concentração aumenta durante um processo inflamatório, isquemia e hipóxia [9].

Concomitantemente à liberação das citocinas pró inflamatórias, fatores neurotróficos são liberados para evitar a necrose do tecido nervoso e promover a regeneração axonal. Dentre estes o Fator de crescimento nervoso (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e neurotrofinas 3, 4 e 5 (NT3, NT4, NT5), além de outros fatores de crescimento, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) ganham destaque [9, 22]. Além disso, a concentração da proteína 43 associada ao crescimento (GAP-43) pode ser usada como um

indicativo de regeneração nervosa pois é proporcional a frequência do brotamento nervoso, exclusivamente na regeneração nervosa do organismo adulto [30].

Especificamente em modelos de constrição crônica, Hsieh et al. [9] demonstraram que o LBI vermelho (660 nm, 30 mW, 7.2 J) aumentou a concentração de VEGF e NGF e diminuiu a expressão de HIF-1 α , TNF- α e IL-1 β . Essa diminuição de TNF- α corrobora com os resultados de Chen et al. [30], onde o LBI infravermelho (808 nm, 190 mW, 36 J) diminuiu a expressão gênica e tecidual de TNF- α em 3 dias pós lesão, além da diminuição da expressão gênica de GAP-43 e IL-1 β . Entretanto, a concentração tecidual de GAP-43 aumentou.

Nos modelos experimentais de lesão por esmagamento, Wang et al. [28] realizaram irradiação com LBI infravermelho (808 nm, 170 mW, 11.4 e 30.4 J) que demonstrou aumento na concentração de GAP-43 em 20 dias pós lesão. Gomes et al. [22] realizaram irradiação com LBI vermelho (632.8 nm, 5 mW, 1 J) levando à diminuição da expressão gênica de iNOS em 21 dias, aumento da expressão gênica de BDNF e NGF em 14 e 21 dias pós lesão, entretanto não houve uma alteração na expressão gênica de NT3 em nenhum dos períodos experimentais. Alcântara et al. [23] realizaram irradiação com LBI vermelho (660 nm, 40 mW, 4.8 J) aumentando a concentração de TNF- α .

Em geral, os resultados demonstram os efeitos positivos da fotobiomodulação com LBI, porém a necessidade de um parâmetro ideal se confirma com a divergência de resultados. Enquanto a terapia com LBI visa a diminuição de citocinas pró-inflamatórias e o aumento de fatores de crescimento, o LBI pôde levar ao aumento na concentração de TNF- α , demonstrando um efeito modulatório no tecido nervoso como verificado nos estudos de Alcântara et al. [23], sendo necessário mais estudos para a investigação dos mecanismos de ação do LBI.

CONCLUSÃO

O LBI é um recurso fototerapêutico viável para o tratamento de uma LNP, demonstrando efeitos positivos sobre o reparo neuromuscular através do uso do LBI vermelho e do infravermelho, havendo melhora nos índices funcionais, nos

aspectos morfológicos e na expressão de citocinas e fatores de crescimento. A maioria dos estudos utilizou uma potência de até 50 mW e energia total de até 15 J aplicado no modo de múltiplos pontos. O levantamento desses parâmetros é importante para a padronização de um protocolo de irradiação com objetivo de evidenciar os efeitos do LBI na regeneração pós LNP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kim JR, Oh SH, Kwon GB, Namgung U, Song KS, Jeon BH, Lee JH (2013) Acceleration of peripheral nerve regeneration through asymmetrically porous nerve guide conduit applied with biological/physical stimulation. *Tissue Eng Part A* 19:2674–2685
2. Li R, Liu Z, Pan Y, Chen L, Zhang Z, Lu L (2014) Peripheral nerve injuries treatment: a systematic review. *Cell Biochem Biophys* 68:449–454
3. Martínez de Albornos P, Delgado PJ, Forriol F, Maffulli N (2011) Non-surgical therapies for peripheral nerve injury. *Br Med Bull* 100:73–100
4. Raimondo S, Fornaro M, Di Scipio F, Ronchi G, GiacobiniRobecchi MG, Geuna S (2009) Chapter 5: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part I — morphological techniques. *Int Rev Neurobiol* 87:81–103
5. Xiao L, Tsutsui T (2013) Human dental mesenchymal stem cells and neural regeneration. *Hum Cell* 26:91–96
6. Seddon HS (1975) *Surgical disorders of the peripheral nerves*, 2nd edn. Churchill Livingstone, Edinburgh
7. Bobinski F, Ferreira TA, Córdova MM, Dombroski PA, da Cunha C, Santo CC, Poli A, Pires RG, Martins-Silva C, Sluka KA, Santos AR (2015) Role of brainstem serotonin in analgesia produced by low-intensity exercise on neuropathic pain after sciatic nerve injury in mice. *Pain* 156:2595–2606
8. Dubový P, Brázda V, Klusáková I, Hradilová-Svíženská I (2013) Bilateral elevation of interleukin-6 protein and mRNA in both lumbar and cervical dorsal root ganglia following unilateral chronic compression injury of the sciatic nerve. *J Neuroinflammation* 10:55
9. Hsieh YL, Chou LW, Chang PL, Yang CC, Kao MJ, Hong CZ (2012) Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function

- recovery in rats with chronic constriction injury: possible involvements in hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α). *J Comp Neurol* 520:2903–2916
10. Silva-Couto MA, Gigo-Benato D, Tim CR, Parizotto NA, Salvini TF, Russo TL (2012) Effects of low-level laser therapy after nerve reconstruction in rat denervated soleus muscle adaptation. *Rev Bras Fisioter* 16:320–327
 11. Shen CC, Yang YC, Huang TB, Chan SC, Liu BS (2013) Neural regeneration in a novel nerve conduit across a large gap of the transected sciatic nerve in rats with low-level laser phototherapy. *J Biomed Mater Res A* 101:2763–2777
 12. Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF (2004) Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials* 25:1583–1592
 13. Pachioni CAS, Mazzer N, Barbieri CH, Fazan VP, Padovani CR, Moro CA, da Silva CA (2006) Rats' ischiatic nerve injury caused by smashing: a vascularization study. *Acta Ortop Bras* 14:203–207
 14. Rochkind S, Geuna S, Shainberg A (2009) Chapter 25: Phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol* 87:445–464
 15. Passarella S, Karu T (2014) Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *J Photochem Photobiol B* 140:344–358
 16. Karu TI (2008) Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol* 84:1091–1099
 17. Barbosa RI, Marcolino AM, de Jesus Guirro RR, Mazzer N, Barbieri CH, de Cássia Registro Fonseca M (2010) Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci* 25:423–430
 18. Mohammed IFR, Al-Mustawfi N, Kaka LN (2007) Promotion of regenerative processes in injured peripheral nerve induced by lowlevel laser therapy. *Photomed Laser Surg* 25:107–111

19. Shen CC, Yang YC, Liu BS (2011) Large-area irradiated low-level laser effect in a biodegradable nerve guide conduit on neural regeneration of peripheral nerve injury in rats. *Injury* 42:803–813
20. Akgul T, Gulsoy M, Gulcur HO (2014) Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. *Lasers Med Sci* 29:351– 357
21. Câmara CN, Brito MV, Silveira EL, Silva DS, Simões VR, Pontes RW (2011) Histological analysis of low-intensity laser therapy effects in peripheral nerve regeneration in Wistar rats. *Acta Cir Bras* 26:12–18
22. Gomes LEA, Dalmarco EM, André ES (2012) The brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, neurotrophin-3, and induced nitric oxide synthase expression after low-level laser therapy in an axonotmesis experimental model. *Photomed Laser Surg* 11: 642–647
23. Alcântara CC, Gigo-Benato D, Salvini TF, Oliveira AL, Anders JJ, Russo TL (2013) Effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute neural recovery and inflammation-related gene expression after crush injury in rat sciatic nerve. *Lasers Surg Med* 45:246–252
24. Anders JJ, Moges H, Wu X, Erbele ID, Alberico SL, Saidu EK, Smith JT, Pryor BA (2014) *In vitro* and *in vivo* optimization of infrared laser treatment for injured peripheral nerves. *Lasers Surg Med* 46:34–45
25. Moges H, Wu X, McCoy J, Vasconcelos OM, Bryant H, Grunberg NE, Andes JJ (2011) Effect of 810 nm light on nerve regeneration after autograft repair of severely injured rat median nerve. *Lasers Surg Med* 43:901–906
26. Pan HC, Yang DY, Chiu YT, Lai SZ, Wang YC, Chang MH, Cheng FC (2006) Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. *J Clin Neurosci* 13:570–575
27. Askari N, Yaghoobi MM, Shamsara M, Esmaeili-Mahani S (2015) Tetracycline-regulated expression of OLIG2 gene in human dental pulp stem cells lead to mouse sciatic nerve regeneration upon transplantation. *Neurosci* 305:197–208
28. Wang CZ, Chen YJ, Wang YH, Yeh ML, Huang MH, Ho ML, Liang JI, Chen CH (2014) Low-level laser irradiation improves functional recovery and

- nerve regeneration in sciatic nerve crush rat injury model. *PLoS One* 9:e103348
29. Masoumipoor M, Jameie SB, Janzadeh A, Nasirinezhad F, Soleimani M, Kerdary M (2014) Effects of 660- and 980-nm low-level laser therapy on neuropathic pain relief following chronic constriction injury in rat sciatic nerve. *Lasers Med Sci* 29:1593–1598
 30. Chen YJ, Wang YH, Wang CZ, Ho ML, Kuo PL, Huang MH, Chen CH (2014) Effect of low level laser therapy on chronic compression of the dorsal root ganglion. *PLoS One* 9:e89894
 31. Tos P, Ronchi G, Papalia I, Sallen V, Legagneus J, Geuna S, Giacobi ni-Robecchi MG (2009) Chapter 4: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part I—experimental models. *Int Rev Neurobiol* 87:47–79
 32. Rochkind S, Geuna S, Shainberg A (2013) Phototherapy and nerve injury: focus on muscle response. *Int Rev Neurobiol* 109:99–109
 33. Belchior ACG, dos Reis FA, Nicolau RA, Silva IS, Pereira DM, de Carvalho PT (2009) Influence of laser (660 nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci* 24:893–899
 34. Takhtfooladi MA, Jahanbakhsh F, Takhtfooladi HA, Yousefi K, Allahverdi A (2015) Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm²) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci* 30:1047–1052
 35. Sousa FF, Andraus RA, Barbieri CH, Mazzer N (2009) Influence of laser radiation in nerve regeneration in different treatments sites. *Acta Ortop Bras* 17:331–335
 36. Medalha CC, Di Gangi GC, Barbosa CB, Fernandes M, Aguiar O, Faloppa F, Leite VM, Rennó AC (2012) Low-level laser therapy improves repair following complete resection of the sciatic nerve in rats. *Lasers Med Sci* 27:629–635
 37. Geuna S, Raimondo S, Ronchi G, Di Scipio F, Tos P, Fornaro M (2009) Chapter 3: Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol* 87:27–46

38. Dias FJ, Issa JP, Iyomassa MM, Coutinho-Netto J, Calzzani RA, Iyomassa DM, Sousa LG, Almeida SR, Cury DP, Watanabe IS (2013) Application of a low-level laser therapy and the purified protein from natural latex (*Hevea brasiliensis*) in the controlled crush injury of the sciatic nerve of rats: a morphological, quantitative, and ultrastructural study. *Biomed Res Int* 2013:597863
39. Dias FJ, Issa JP, Coutinho-Netto J, Fazan VP, Sousa LG, Iyomassa MM, Papa CP, Watanabe IS (2015) Morphometric and high resolution scanning electron microscopy analysis of low-level laser therapy and latex protein (*Hevea brasiliensis*) administration following a crush injury of the sciatic nerve in rats. *J Neurol Sci* 349:129–137
40. dos Reis FA, Belchior AC, de Carvalho PT, da Silva BA, Pereira DM, Silva IS, Nicolau RA (2009) Effect of laser therapy (660 nm) on recovery of the sciatic nerve in rats after injury through neurotmesis followed by epineural anastomosis. *Lasers Med Sci* 24:741–747

4.2 Artigo 2

Efeitos da fotobiomodulação com laser em baixa intensidade vermelho e infravermelho em células de Schwann ST88-14

Andreo L^{1,2}, Mesquita-Ferrari RA^{1,3}, Grenho L², Gomes PS², Bussadori SK^{1,3},
Fernandes KPS¹, Fernandes MHR²

¹ Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil

² Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP), Porto, Portugal

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil

Correspondência:

Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari

mhfernandes58@gmail.com

Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto - FMDUP

www.up.pt

392, R. Dr. Manuel Pereira da Silva, 4200 Porto, Portugal

Tel. +351 22 090 1100

Financiamentos: Este trabalho teve apoio da UNINOVE, da FMDUP e da seguinte agência de financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (www.capes.gov.br; número do processo: 1550120 LA; Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior -88881.135887/2016-01 LA).

RESUMO

Introdução: O tratamento com fototerapia tem demonstrado efeitos positivos nos tratamentos de lesão nervosa periférica, porém há uma necessidade da investigação com objetivo de elucidar os mecanismos de ação envolvidos neste processo de forma a otimizar a terapêutica fotobiomodulatória. **Metodologia:** Células de Schwann da linhagem ST88-14 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10 mM de HEPES, 2 mM de glutamina, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica, mantidas em incubadora de CO₂ a 5%, sempre a 37°C. As células foram irradiadas com laser vermelho e infravermelho (660 e 780 nm, 40 mW) em duas doses de energia diferentes (3.2 e 6.4 J, em 80 e 160 s). Foi realizado o teste para viabilidade celular MTT e resazurina, ensaio de ferida, Citometria de fluxo com Annexina V e PI e qPCR para BDNF, NGF, NT3, GDNF, CCL2 e IL-1 β , imunofluorescência para S-100 e actina. **Resultados:** O LBI promoveu um aumento na atividade mitocondrial avaliada por MTT em 3 e 7 dias. O grupo 780 6.4 J demonstrou um aumento na migração celular em 4, 6, e 8h e no grupo 780 3.2 J em 6h. A expressão gênica de BDNF e NGF aumentou em todos os grupos irradiados. A expressão de GDNF e de IL-1 β não apresentou diferenças. Os genes CCL2 e NT3 não foram expressos. Não houve alteração da morfologia celular e da viabilidade celular avaliado por Citometria de fluxo, porém o LBI aumentou a população das células na fase G2/M em 1 e 3 dias. **Conclusão:** A FBM promoveu um aumento na atividade metabólica e mitose sem alterar a viabilidade celular, apresentando melhores resultados sobre a migração celular quando realizada com laser infravermelho.

Palavras-chave: Regeneração nervosa, terapia a laser em baixa intensidade, nervo, fotobiomodulação

INTRODUÇÃO

As células de Schwann (CS) desempenham um papel importante no sistema nervoso periférico (SNP) e a interação axônio-CS é importante no desenvolvimento normal e funcionamento de uma fibra nervosa [1]. Essa interação interfere no processo de reparo uma vez que as CS apresentam papel essencial na regeneração axonal sendo o retardo nesta interação diretamente relacionado a um reparo nervoso mais lento ou a progressão para lesão nervosa crônica com estabelecimento de diversos tipos de sequelas [2].

Após uma lesão nervosa periférica (LNP) as CS respondem rapidamente à interrupção axonal, promovendo uma mudança no fenótipo, expressando fatores de crescimento como BDNF, GDNF, NT3, NGF que promovem a sobrevivência de neurônios lesionados e o prolongamento axonal no coto proximal. Na região do coto distal, as CS entram no processo de desdiferenciação, havendo uma proliferação celular das CS por entrarem novamente no ciclo celular, expressando citotinas inflamatórias incluindo TNF- α e MCP-1 que promovem o recrutamento de macrófagos. Além disso, as CS iniciam a ruptura da mielina intrínseca, como um processo de autofagia celular [3, 4], pois a mielina tem potencial inibitório sobre o crescimento axonal [3].

A formação de bandas de regeneração se inicia a partir da alteração da morfologia das CS, que assumem uma morfologia bipolarizada formando uma camada colunar abaixo da lâmina basal, formando as bandas de Bungner, promovendo substratos e guiando a disposição para a regeneração axonal [2]. A interação entre o axônio-CS é importante para a regeneração tecidual, levando à rediferenciação das CS sendo que uma falha nessa interação pode desencadear uma doença neuromuscular ou dor neuropática [2].

A fotobiomodulação (FBM) é um recurso para a terapia após uma LNP [5], em específico, o laser em baixa intensidade (LBI) possui efeito fotobiomodulatório, podendo causar uma inibição ou estimulação do metabolismo tecidual. Seu mecanismo de ação consiste na absorção de luz (fótons) pelos fotorreceptores, modulando as reações celulares, alterando a síntese de ATP na mitocôndria, através da aceleração da cadeia transportadora de elétrons [6, 7]. Estudos *in vivo* demonstram efeitos positivos deste recurso modulando diferentes etapas e células participantes incluindo a diminuição de

citocinas pró inflamatórias como TNF- α e IL-1 β [8] e aumento na expressão de fatores de crescimento, como o BDNF e NGF [9].

A produção de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento pelas CS são importantes para o processo de reparo, demonstrando a necessidade de investigação dos efeitos fotobiomodulatórios do LBI nas CS visando a contribuição para o estabelecimento de protocolos eficazes para a recuperação funcional pós LNP e aceleração do processo de reparo no tecido nervoso.

O objetivo do estudo foi avaliar em diferentes comprimentos de onda e energia os efeitos do LBI sobre as CS através da análise da viabilidade, morfologia e expressão gênica de citocinas e fatores de crescimento.

METODOLOGIA

Local

O estudo foi realizado no laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP).

Cultivo celular

A linhagem ST88-14 (RRID:CVCL_8916) é uma célula de Schwann isolada de um paciente com neurofibromatose tipo I (Ryan et al. 1994) pelo Dr. Jonathan A. Fletcher (Dana Faber Cancer Institute, Boston, EUA). As células ST88-14 foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado com 10 mM de HEPES, 2 mM de glutamina, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica, mantidas em incubadora de CO₂ a 5%, sempre a 37°C. O monitoramento celular foi realizado a cada dois dias, utilizando um microscópio invertido de fase sendo mantidas em estado de subconfluência.

Fotobiomodulação (FBM)

As células foram tripsinadas, centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos a 10° C e o botão celular (8 x 10⁴ células/tubo) com o meio de cultura completo foi irradiado na extremidade inferior, sendo utilizado o equipamento *Twin Laser*[®] (*MM Optics*, São Carlos – SP, Brasil). Os parâmetros utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros utilizados para o tratamento com FBM.

Meio ativo	InGaAlP		AsGaAl	
Comprimento de onda	660 nm		780 nm	
Área do feixe	0.04cm ²			
Área irradiada	0,196cm ²			
Potência	40 mW			
Densidade de potência	1W/cm ²			
Densidade de energia	160J/cm ²	320J/cm ²	160J/cm ²	320J/cm ²
Energia total	3.2J	6.4	3.2J	6.4
Tempo	80s	160s	80s	160s

Ensaio da atividade mitocondrial – MTT

As células foram incubadas em placas de cultura de fundo chato de 24 poços (1x10⁴ células/poço) e após 1, 3 e 7 dias de incubação foi adicionado 100 uL de MTT (5 mg/ml) em cada poço. Após 3 horas a 37° C o meio foi removido e 200 ul de DMSO foi adicionado em cada poço para leitura da absorbância no leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek) em 550 de densidade óptica.

Ensaio da atividade mitocondrial – Resazurina

As células foram incubadas em placas de cultura de fundo chato de 24 poços (1x10⁴ células/poço) e após 1, 3 e 7 dias de incubação foi adicionado meio fresco com 10% (v/v) de resazurina em cada poço. Após 3 horas a 37° C 100 ul foi transferido para uma placa de 96 poços e a intensidade da fluorescência foi mensurada no leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek) em excitação no comprimento de onda de 535 nm e emissão em 590 nm.

Ensaio de ferida

As células foram incubadas em placas de cultura de fundo chato de 24 poços (1x10⁴ células/poço) e após 3 dias estavam em confluência adequada

para ser realizado o ensaio. Uma ponteira de 10 μ l foi utilizada para realização da ferida. Os poços foram fotografados no momento da lesão, 2, 4, 6 e 8 h após.

Microscopia confocal

As culturas celulares foram fixadas com 3.7% de paraformaldeído. Após, a lamínula circular foi incubada por 30 min com 0,1% (v/v) de solução de Triton X-100 e por 30 min com solução de albumina bovina sérica 1% (BSA). Após, 100 μ L de anticorpo S-100 (1:50 in BSA 1%) foi adicionado e incubado overnight em câmara úmida a 4^o C e conjugadas com Alexa Fluor 488 (1:500 em BSA 1%) por 1 h. Os filamentos de F-actina foram visualizados por tratamento das células com Alexa Fluor 594-conjugated phalloidin (diluição 1:20; 1 h) e os núcleos com iodeto de propídio (1 μ g/mL; 10 min). As amostras coradas foram montadas em Vectashield® e examinadas por microscopia de fluorescência (Leica SP2 AOBS) e analisadas com o software Leica Application Suite X 3.3.0.16799 (Leica Microsystems CMS GmbH, 2017).

Citometria de fluxo

As amostras foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 5 min a 10^o C, o pellet foi lavado duas vezes com PBS (10% SFB), após ressuspenso em Annexin Binding Buffer, então foi adicionado 10 μ L de iodeto de propídio e 5 μ L de FITC Annexin V em cada amostra. Após 15 minutos 400 μ L de Annexin Binding Buffer foi adicionado e as amostras foram filtradas para análise em citômetro de fluxo BD FACSAria™ II High Speed Cell Sorter, as amostras foram analisadas para o ciclo celular e apoptose através do software FlowJo 10.4.2 (FlowJo, LLC, 2018).

RT-qPCR

O RNA total foi isolado de placas usando TRIzol (Invitrogen, CA, USA), de acordo com instruções do fabricante. A quantidade e integridade do RNA foi mensurada em um leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek). A síntese de cDNA foi realizada com o iScript® Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR e a RT-qPCR foi realizada usando SSoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix e CFX96 Touch Real Time Detection System (BIO-RAD). As condições

de ciclagem térmica foram 96° C por 2 min, seguido de 40 ciclos em 96° C por 5 s e 60° C por 30 s. Foi adquirido placas de 96 poços (BIO-RAD) contendo os primers BDNF, GDNF, IL1B, MCP-1, NGF e NTF3. O gene de referência GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) foi utilizado para normalizar os dados usando a mesma quantidade de cDNA. A quantificação foi realizada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Análise dos resultados

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 erro padrão da média, 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

Efeitos da FBM na atividade metabólica

A FBM promoveu um aumento na atividade mitocondrial aos 3 e 7 dias avaliado pelo ensaio MTT em todos os parâmetros utilizados (figura 1B e 1C). Não foram encontradas diferenças estatísticas no ensaio Resazurina (figura 1D, 1E e 1F).

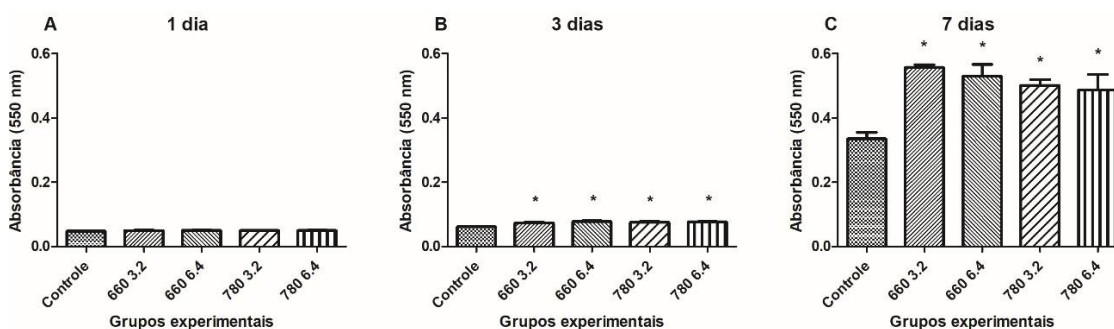


Figura 1: Efeitos do FBM na atividade metabólica mensurada pelo ensaio MTT após 1 (A), 3 (B) e 7 (C) dias (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs grupo controle.

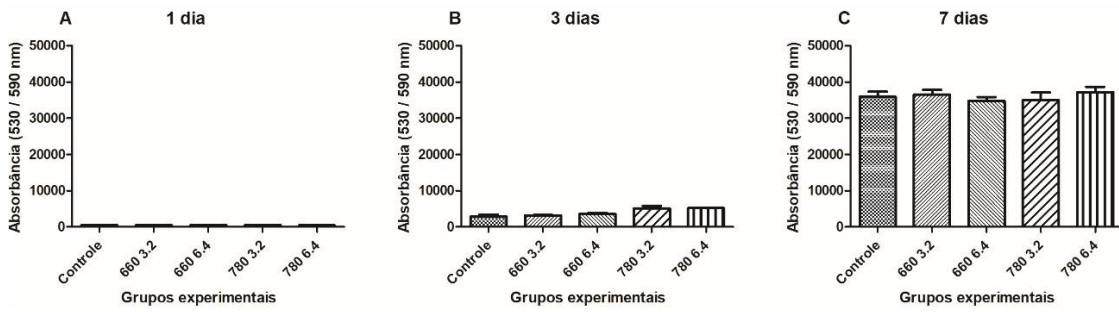


Figura 2: Efeitos do PBM na atividade metabólica mensurada pelo ensaio de resazurina após 1 (A), 3 (B) e 7 (C) dias (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs grupo controle.

Efeitos da FBM na expressão gênica

A expressão gênica dos fatores de crescimento BDNF e NGF aumentou após a irradiação LLLT (figuras 3 e 4). Não foram encontradas diferenças estatísticas na expressão do gene da IL-1B e não foram expressos GDNF, NT3 e MCP-1 em nenhuma das condições experimentais.

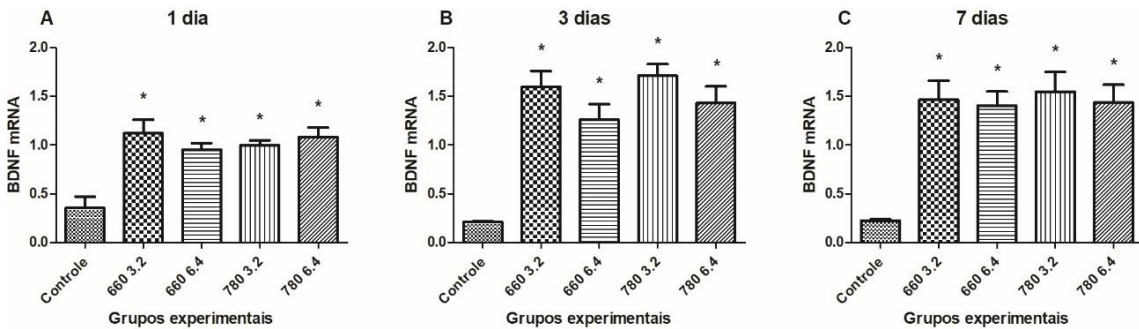


Figura 3: Efeitos de PBM na expressão do gene BDNF após 1 (A), 3 (B) e 7 dias (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs grupo controle.

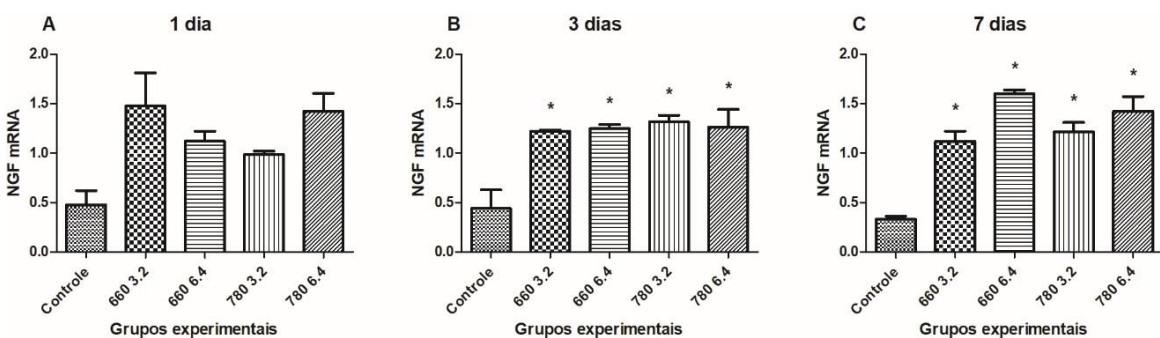


Figura 4: Efeitos de PBM na expressão do gene NGF após 1 (A), 3 (B) e 7 dias (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs grupo controle.

Efeitos da PBM na migração de SC

O PBM aumentou a migração celular para a área correspondente a ferida após 4, 6 e 8 h com o comprimento de onda de 780 nm (2-way ANOVA/Bonferroni) (figuras 5 e 6).

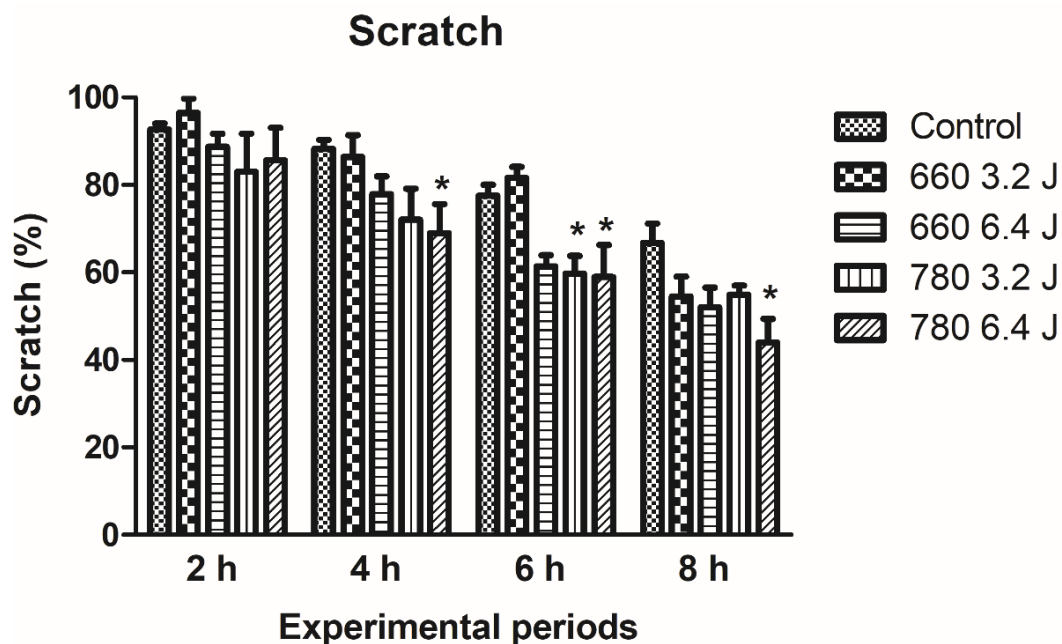


Figura 5: Efeitos do FBM na migração do SC após a lesão. A porcentagem foi calculada como a razão entre a área de lesão no tempo 0h e os períodos remanescentes (2-way ANOVA/Bonferroni). * $p > 0,05$ vs grupo Controle.

Efeitos da FBM na viabilidade celular

Não foram encontradas diferenças nas células viáveis, apoptóticas e necróticas após a irradiação LBI em 1 (figura 7), 3 (figura 8) e 7 (figura 9) dias (ANOVA/Tukey).

Efeitos da FBM no ciclo celular

O LBI induziu um aumento da população das células G2/M em 1 (figura 10) e 3 (figura 11) dias (ANOVA/Tukey). Nenhuma diferença estatística foi encontrada nas células após 7 dias (figura 12).

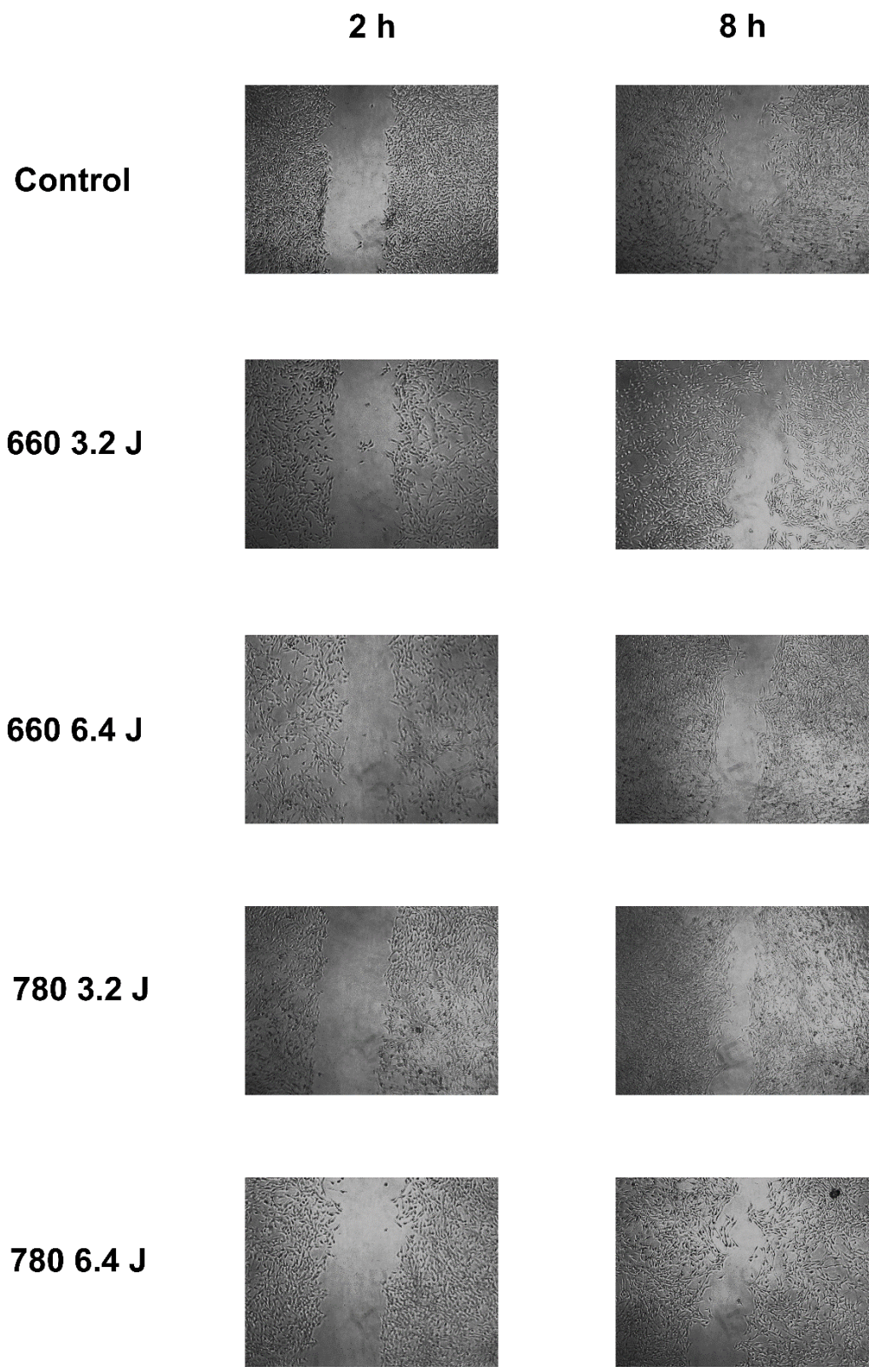
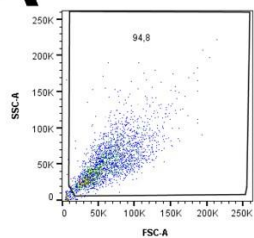
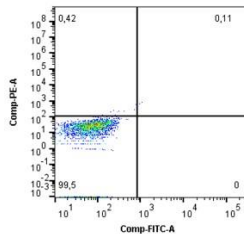


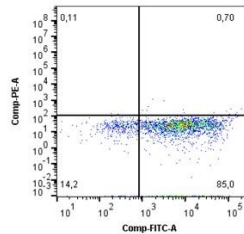
Figura 6: Fotomicrografias da ferida após 2 e 8 h.

A

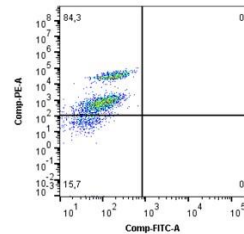
Unstained
Ungated
Histogram of Comp-PE-A()
100



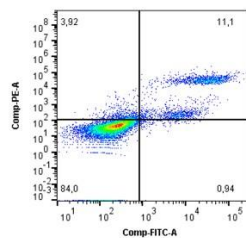
Unstained
viable
Histogram* of Comp-PE-A()
94,8



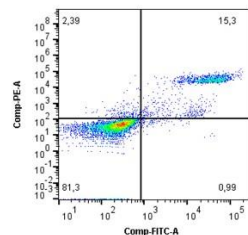
Annexin-V
viable
Contour Plot* of Comp-FITC-A() vs. Comp-PE-A()
95,2



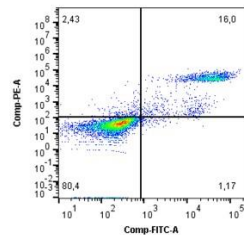
PI
viable
Histogram* of Comp-PE-A()
95,1

B

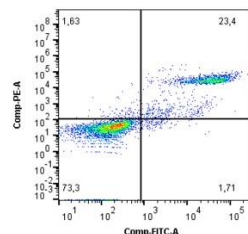
Control
viable
Pseudocolor of SSC-A(null) vs. FSC-A(null)



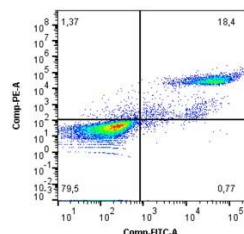
660 3.2 J
viable
Pseudocolor of Comp-FITC-A() vs. Comp-PE-A()



660 6.4 J
viable
Pseudocolor of Comp-FITC-A() vs. Comp-PE-A()



780 3.2 J
viable
Pseudocolor of Comp-FITC-A() vs. Comp-PE-A()



780 6.4 J
viable
Pseudocolor of Comp-FITC-A() vs. Comp-PE-A()

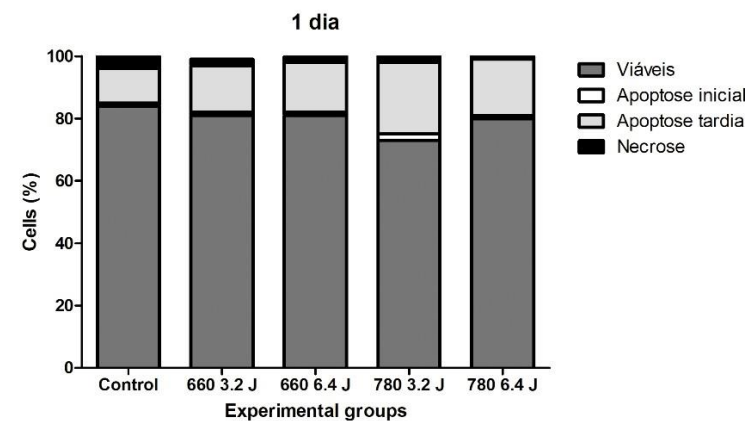
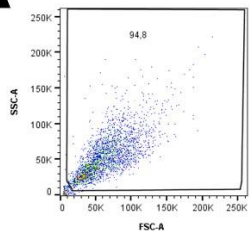
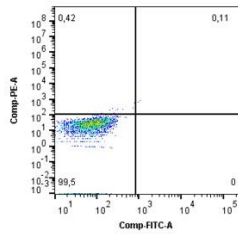


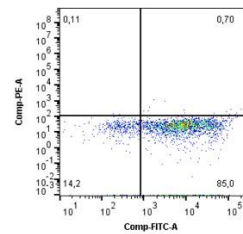
Figura 7: Análise da viabilidade celular por Anexina-V e PI de SC irradiadas com FBM após 1 dia. **(A)** Citometria de fluxo de SC após LLLT. **(B)** Representação gráfica da população celular.

A

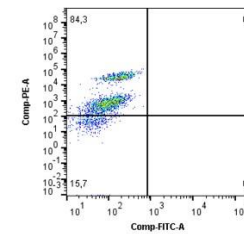
Unstained
Ungated
Histogram of Comp-PE-A)
100



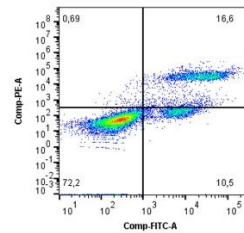
Unstained
viable
Histogram* of Comp-PE-A)
94,8



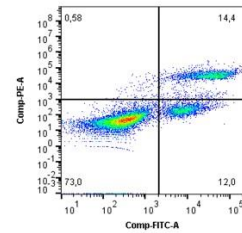
Annexin-V
viable
Contour Plot* of Comp-FITC-A() vs. Comp-PE-A()
95,2



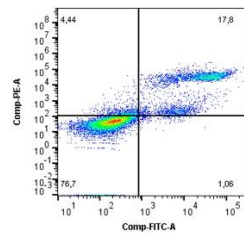
PI
viable
Histogram* of Comp-PE-A)
95,1



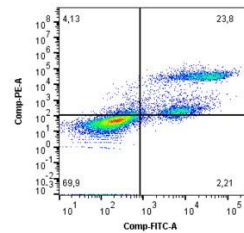
660 3.2 J
viable
Pseudocolor of Comp-FITC-A() vs. Comp-PE-A()
93,1



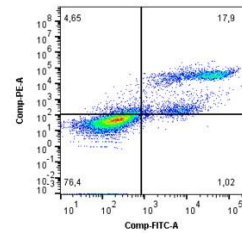
660 6.4 J
viable
Pseudocolor of Comp-FITC-A() vs. Comp-PE-A()
93,9



Control
viable
Pseudocolor of Comp-FITC-A() vs. Comp-PE-A()
96,3



780 3.2 J
viable
Pseudocolor of Comp-FITC-A() vs. Comp-PE-A()
93,2



780 6.4 J
viable
Pseudocolor of Comp-FITC-A() vs. Comp-PE-A()
97,2

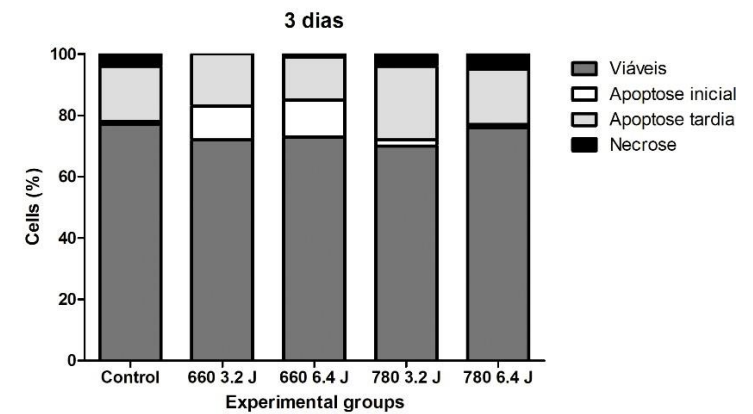
B

Figura 8: Análise da viabilidade celular por Anexina-V e PI de SC irradiadas com FBM após 3 dias. **(A)** Citometria de fluxo de SC após LLLT. **(B)** Representação gráfica da população celular.

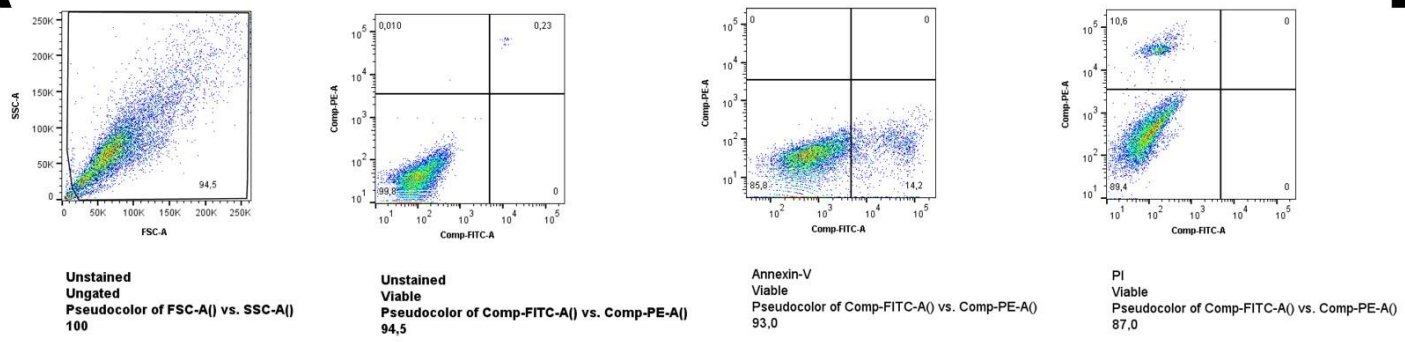
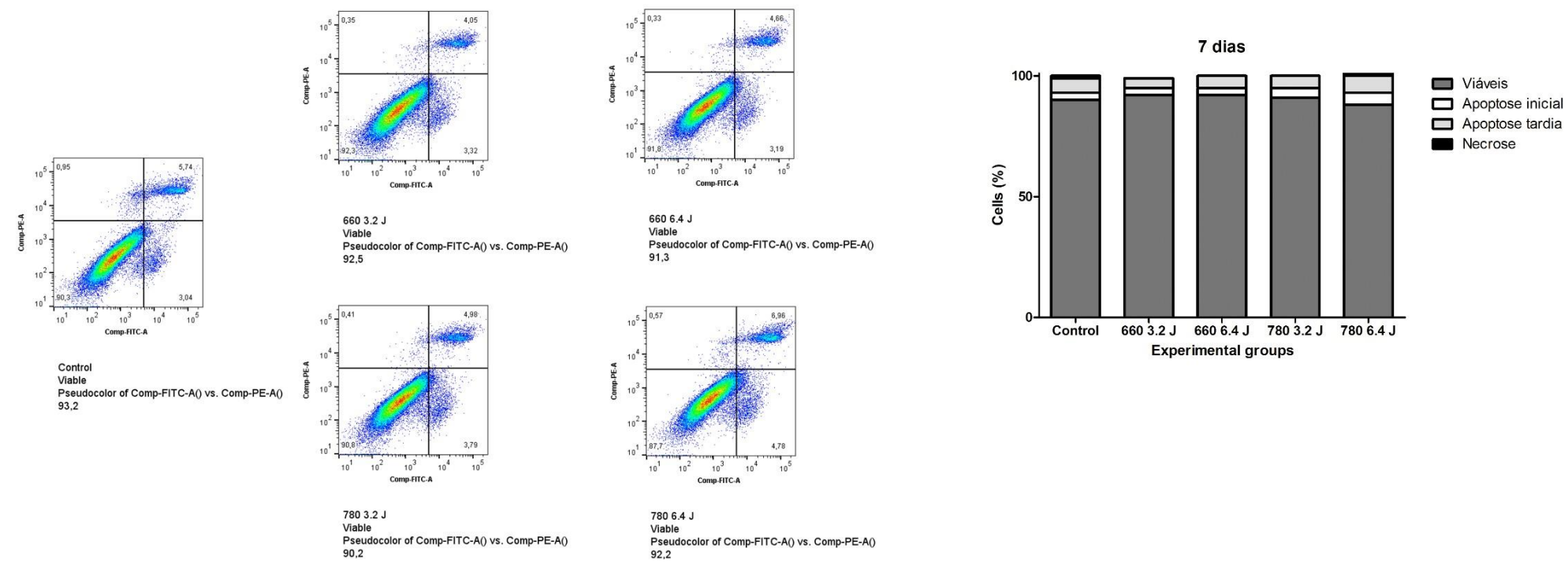
A**B**

Figura 9: Análise da viabilidade celular por Anexina-V e PI de SC irradiadas com FBM após 7 dias. **(A)** Citometria de fluxo de SC após LLLT. **(B)** Representação gráfica da população celular.

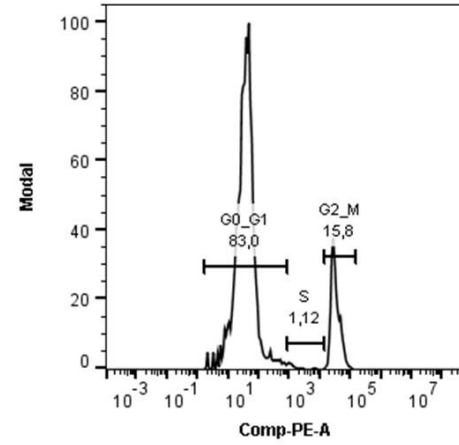
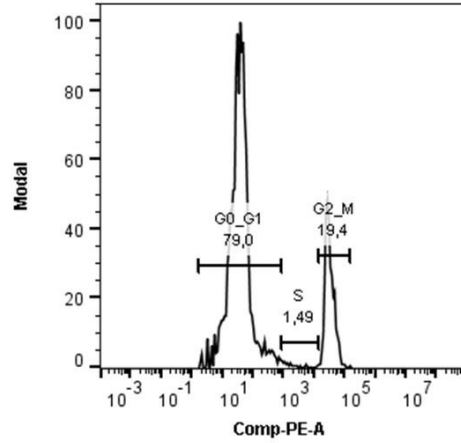
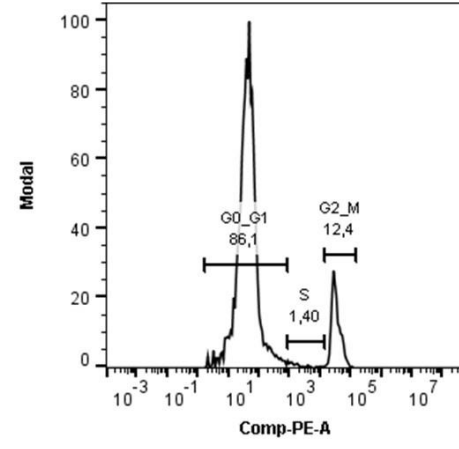
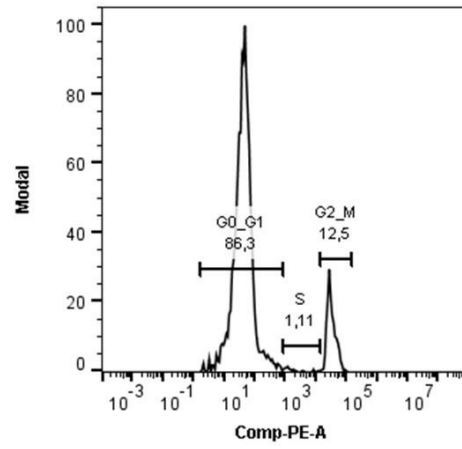
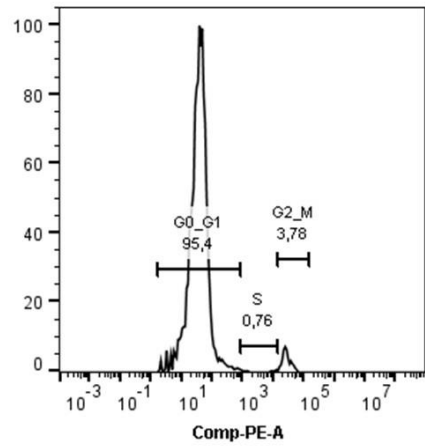
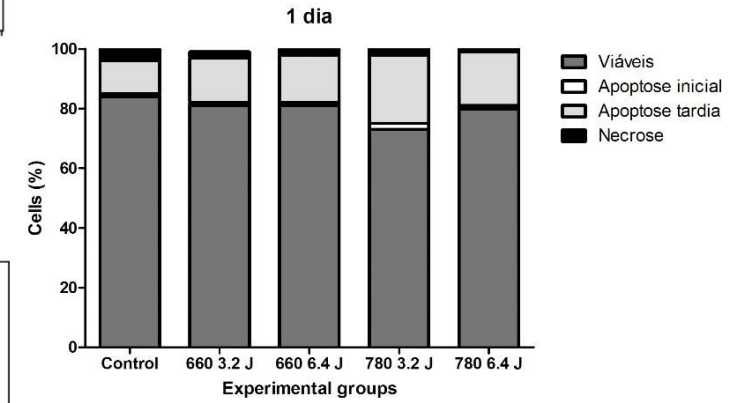
A**B**

Figura 10: Efeitos da FBM no ciclo celular após 1 dia. A população G2/M aumentou em todos os grupos irradiados. **(A)** Citometria de fluxo de SC após LLLT. **(B)** Representação gráfica da população celular.

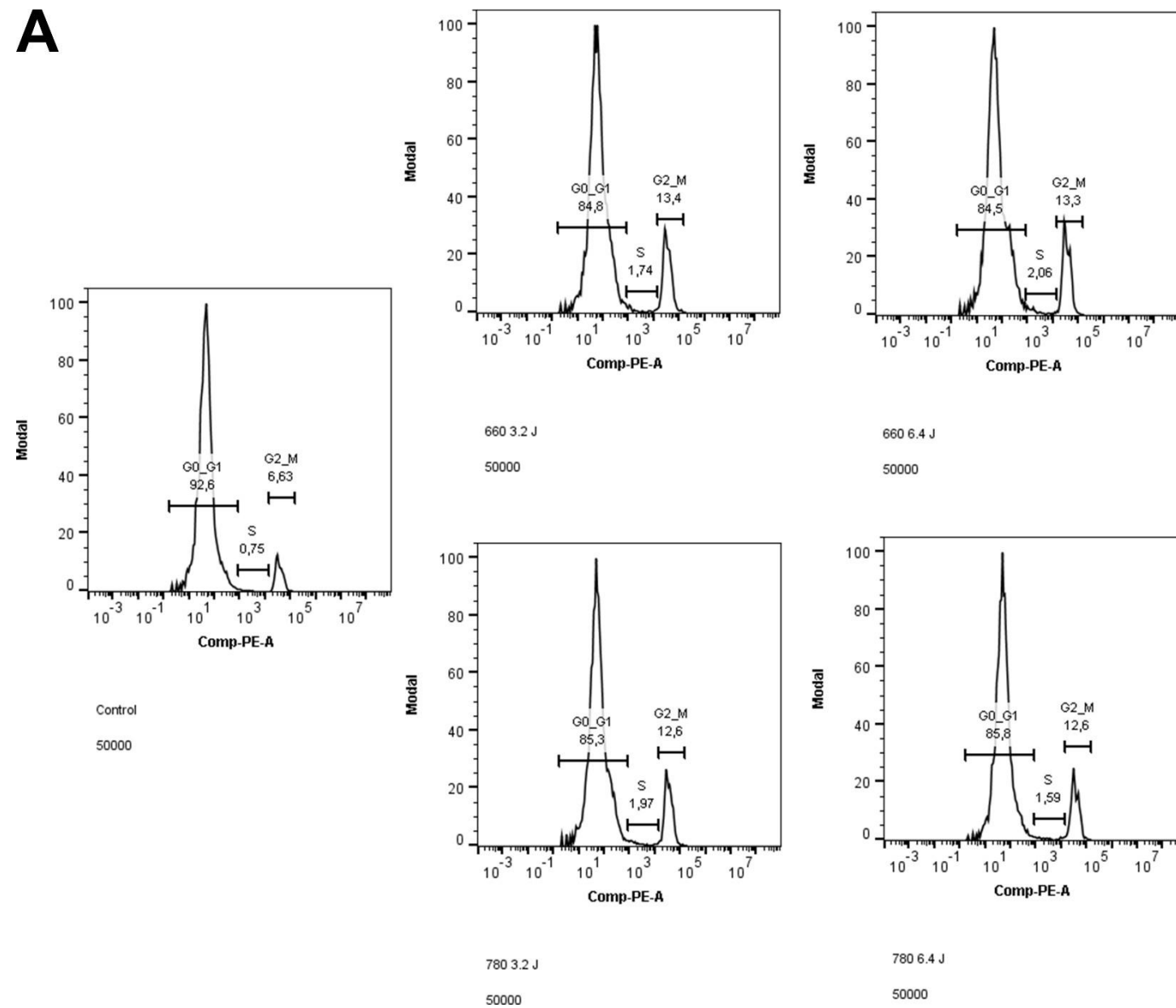
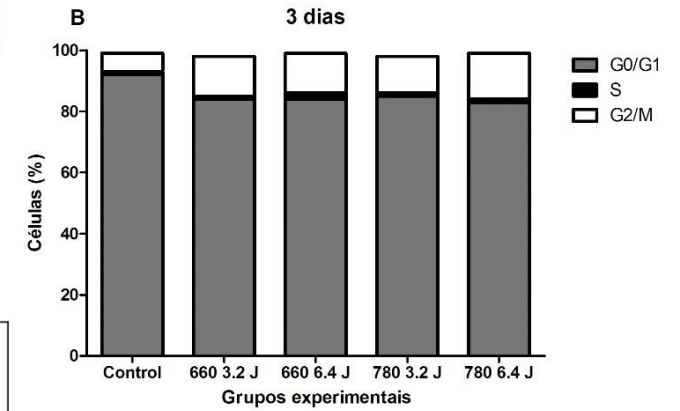
A**B**

Figura 11: Efeitos da FBM no ciclo celular após 3 dias. A população G2/M aumentou em todos os grupos irradiados. **(A)** Citometria de fluxo de SC após LLLT. **(B)** Representação gráfica da população celular.

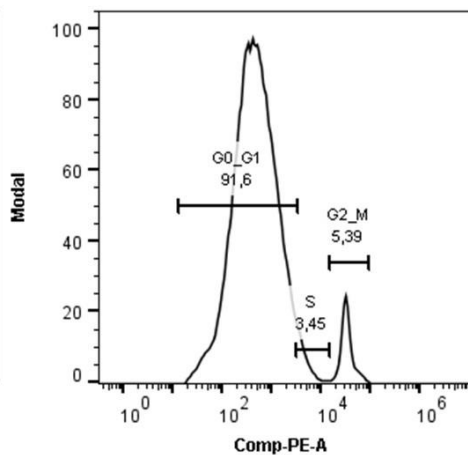
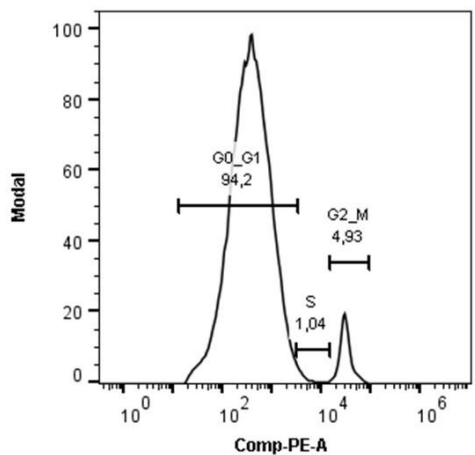
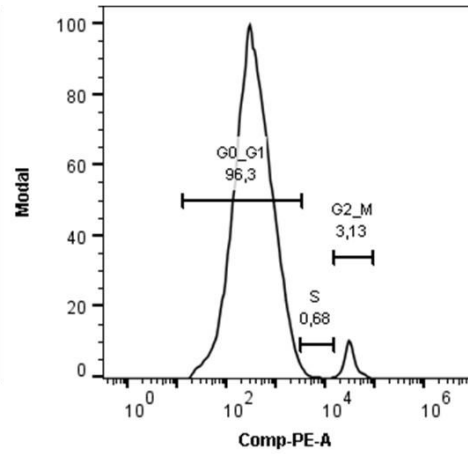
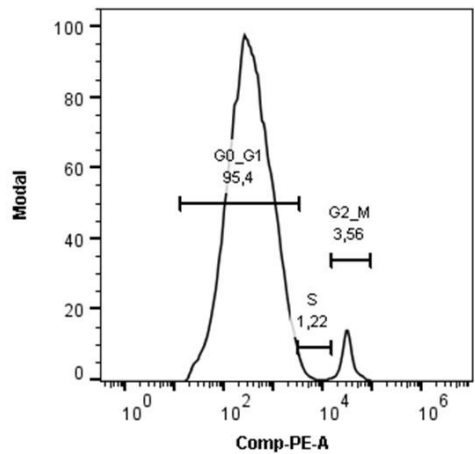
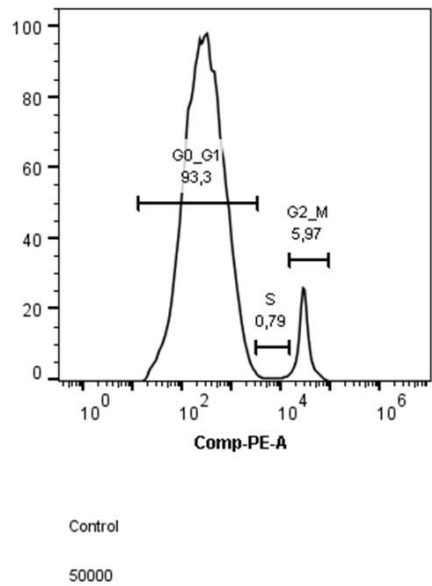
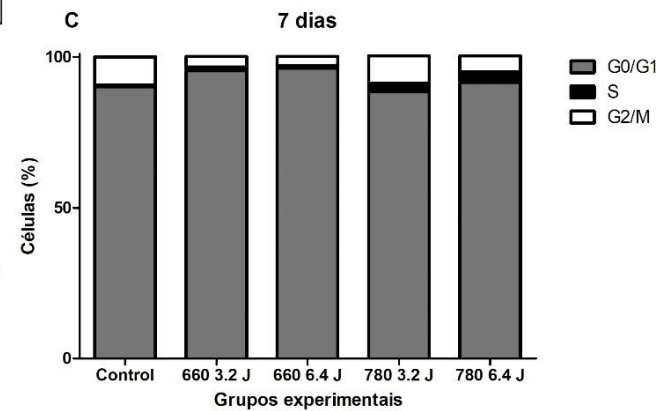
A**B**

Figura 12: Efeitos da FBM no ciclo celular após 7 dias. **(A)** Citometria de fluxo de SC após LLLT. **(B)** Representação gráfica da população celular.

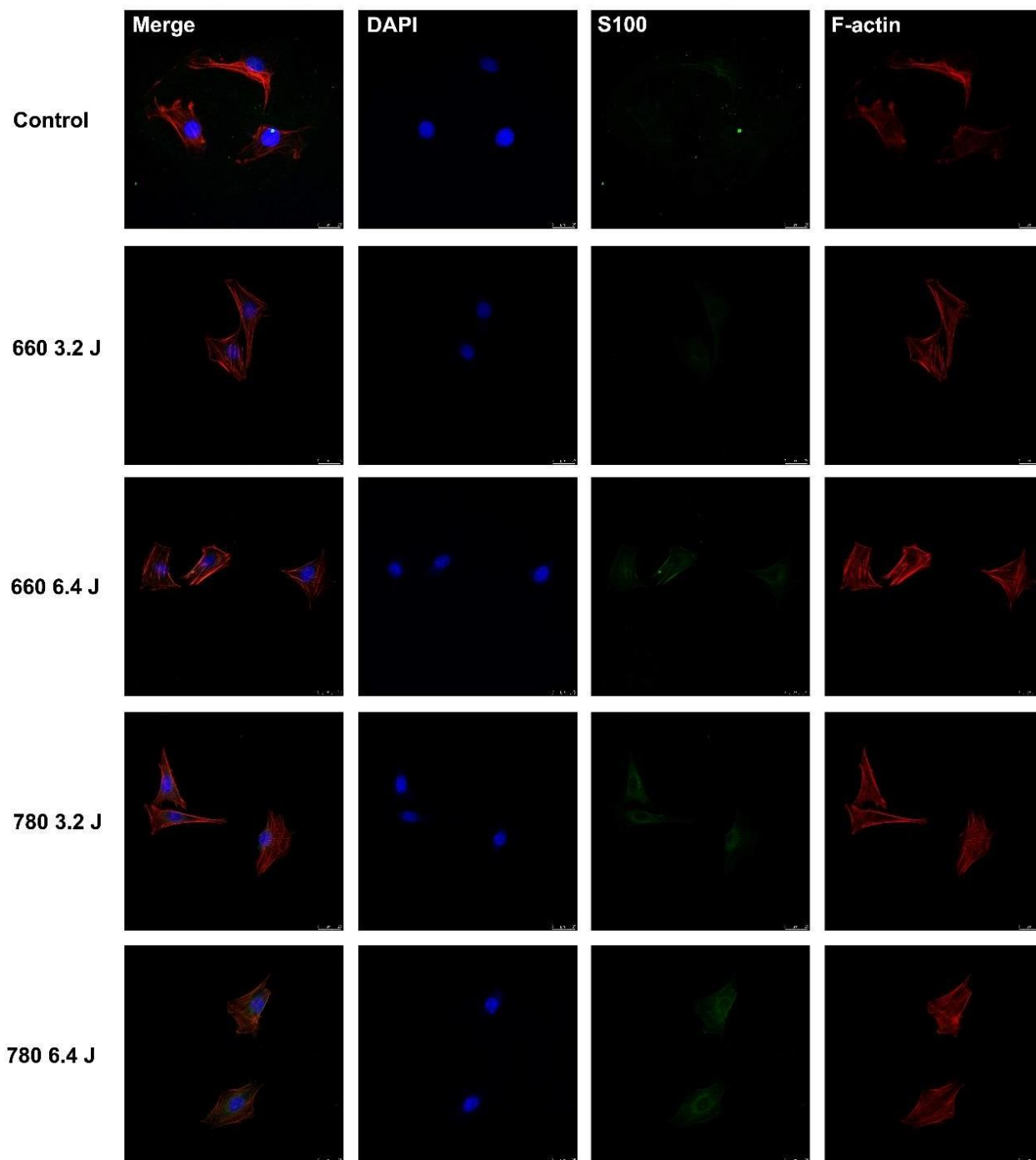


Figura 13: Efeitos da FBM sobre células ST88-14 após 1 dia. Marcação nuclear com DAPI (azul), AlexaFluor 488 para S-100 (verde), Phalloidin para F-actin (vermelho). (barra de escala = 25 μm).

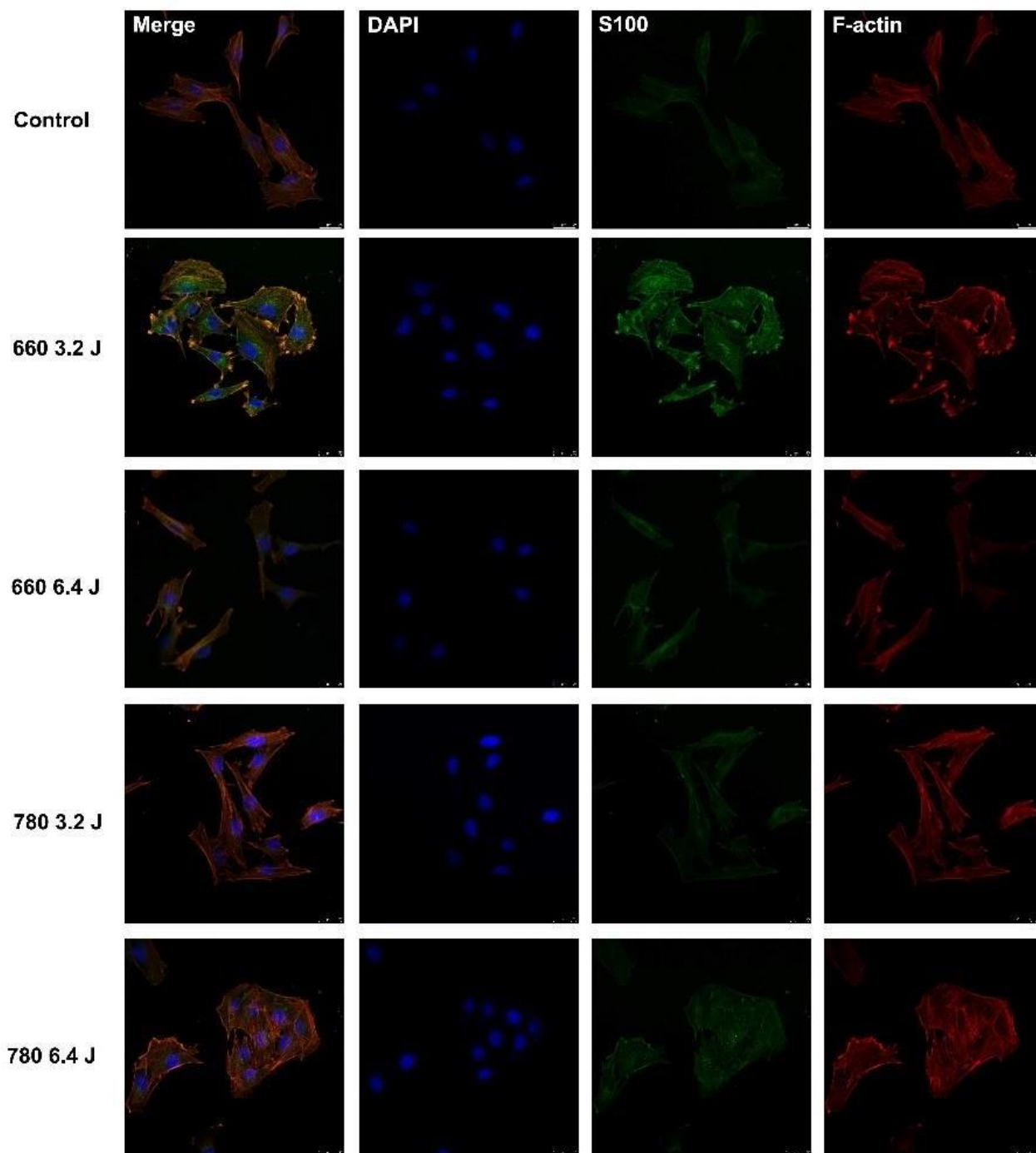


Figura 14: Efeitos da FBM sobre células ST88-14 após 3 dias. Marcação nuclear com DAPI (azul), AlexaFluor 488 para S-100 (verde), Phalloidin para F-actin (vermelho). (barra de escala = 25 μ m).

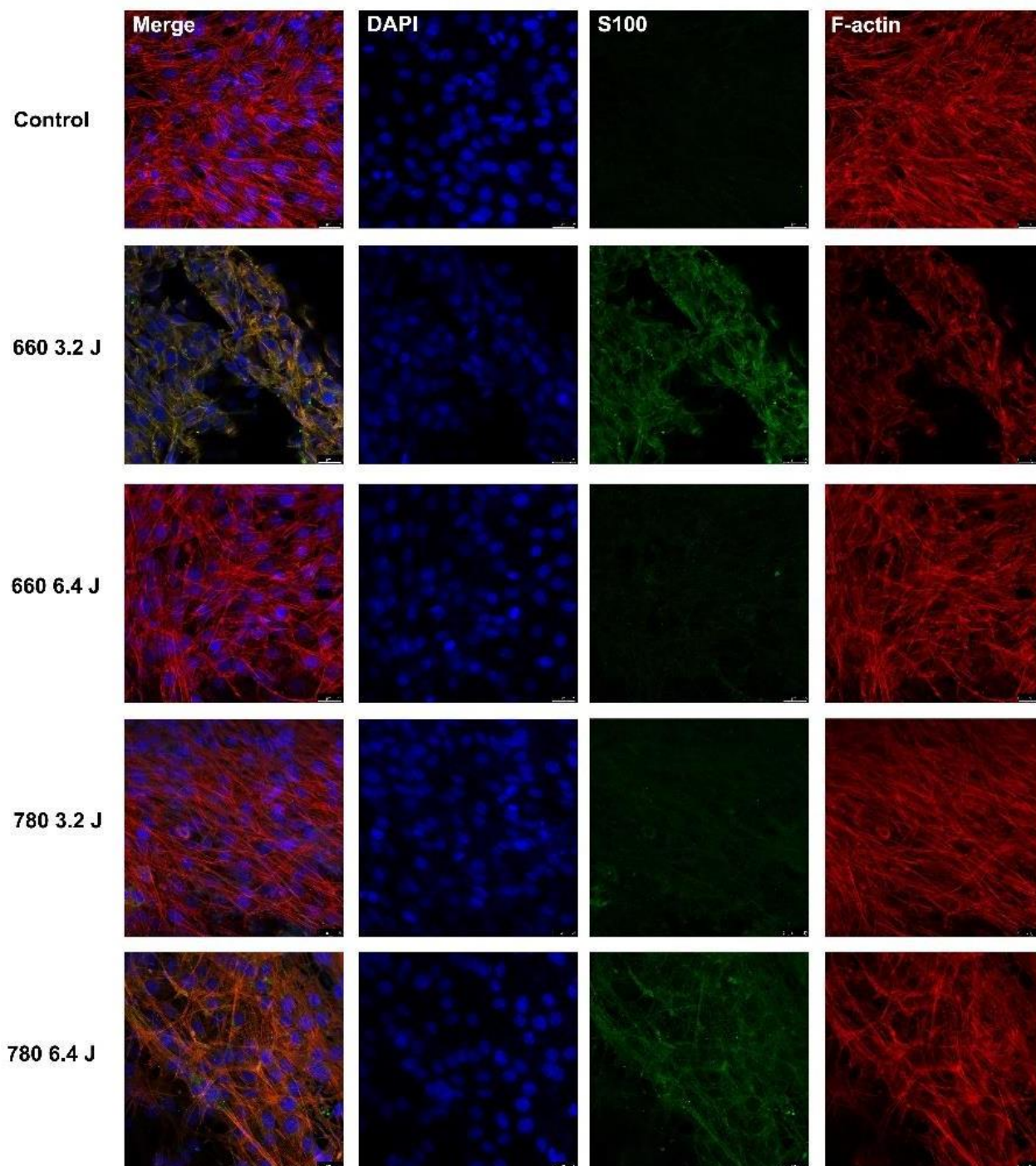


Figura 15: Efeitos da FBM sobre células ST88-14 após 7 dias. Marcação nuclear com DAPI (azul), AlexaFluor 488 para S-100 (verde), Phalloidin para F-actin (vermelho). (barra de escala = 25 μ m).

Efeitos da FBM sobre a morfologia celular

As células apresentaram morfologia do tipo neuronal com marcação positiva para S100, sem alterações nos grupos irradiados após 1 (figura 13), 3 (figura 14) e 7 dias (figura 15).

DISCUSSÃO

A FBM tem demonstrado potencial terapêutico em situações de LNP como o aumento da funcionalidade motora e atividade muscular em pacientes tratados com LBI infravermelho (780 nm, 250 mW) quando comparados ao grupo placebo, demonstrando os efeitos positivos da FBM neste tipo de lesão [10]. Há relatos sobre os efeitos da FBM sobre o tecido muscular durante o processo de reparo após diferentes modelos experimentais de LNP, porém os efeitos variam de acordo com os parâmetros utilizados, sendo necessário a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste processo [5].

Estudos *in vitro* conduzidos utilizando CS da linhagem ST88-14 demonstraram a presença de um receptor de manose demonstrando que esse modelo é viável para a investigação da ação das células da glia no tecido nervoso periférico na defesa do hospedeiro em processos infecciosos, doenças degenerativas e neoplasias [11].

Foram realizados estudos investigando a resposta das CS da linhagem ST88-14 a um processo infeccioso por *Mycobacterium leprae* e forma observados modulação de metalopeptidase [12], em específico da metalopeptidase PHEX, além de ativação do fator transcricional NF- κ B induzido pelo processo infeccioso [13] e aumento na expressão gênica de outras metaloproteinases MMP2, MMP9 e do inibidor TIMP1 [14].

Contudo, estudos com a utilização de LBI neste tipo celular não foram conduzidos até o momento. Assim como células de cultura primária elas expressam S-100, P0 e MBP [15-17], sendo viáveis para investigação dos mecanismos de ação do laser tendo em vista que o isolamento de CS de cultura primária é um processo delicado pelo fato do nervo apresentar outros tipos celulares que suportam o tecido conjuntivo e as células do fascículo nervoso, como fibroblastos ou endotélio vascular.

Em relação a atividade metabólica os resultados demonstraram que o LBI modula a atividade metabólica, havendo um aumento na atividade mitocondrial nos grupos irradiados com LBI vermelho e infravermelho. Diferente do estudo de Yazdani et al. [18], no qual foi demonstrado que o LBI infravermelho (810 nm, contínuo, 50 mW, 0.4 e 1.6 J) modulou a atividade mitocondrial de CS obtidas do nervo sural de humanos, havendo um aumento na atividade mitocondrial nos períodos de 3 dia e 7 dias, além disso, a FBM promoveu um aumento na população de células mitóticas no ciclo celular sem induzir a apoptose ou necrose celular.

Em relação aos fatores de crescimento, o LBI demonstrou um aumento na expressão gênica de BDNF e NGF, no estudo realizado por Yazdani et al. (810 nm, 50 mW, 0.4 e 1.6 J) houve um aumento na expressão de NGF em 20 dias, porém sem alterações na expressão de BDNF e GDNF por CS obtidas do nervo sural de humanos, evidenciando que diferentes parâmetros de irradiação podem alterar os efeitos fotobiomodulatórios do LBI, além disso, Meng et al. [19] demonstraram um aumento da expressão de BDNF em neurônios obtidos do hipocampo de camundongos irradiados com LBI (632.8 nm, 10 mW, 1.5 J) revelando que diferentes populações celulares respondem de maneira diferente à FBM.

Van Breugel & Bär [20] demonstraram um aumento no número de CS obtidas a partir do nervo isquiático de ratos Wistar irradiadas com LBI vermelho (632 nm, 5.98 mW) quando comparado ao grupo não irradiado. Sendo analisado através da contagem de células ressuspensas em tampão PBS suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), no presente estudo o LBI vermelho e infravermelho aumentou a porcentagem de células na fase G2 e mitótica sem alterar a porcentagem de células viáveis, além de um aumento na migração celular evidenciado somente no grupo irradiado com LBI infravermelho.

Segundo o estudo realizado por Wang et al. [21] para que a regeneração pós LNP ocorra, é necessário a polimerização dos filamentos de actina das CS, sendo um dos elementos chave para o adequado processo de regeneração axonal e migração das CS. No presente estudo as células apresentaram morfologia preservada e marcação positiva para S100, proteína presente nas CS que inibe a apoptose, estimula a proliferação celular e migração dos macrófagos

e CS, além da liberação de citocinas e fatores de crescimento que estimulam a regeneração axonal [22].

A fotobiomodulação (FBM) é um recurso terapêutico utilizado para estimular o reparo tecidual, analgesia e reduzir o processo inflamatório. A FBM estimula cromóforos como citocromo C oxidase e os canais de cálcio celulares, [23]. A FBM ativa metabolismo mitocondrial podendo levar a resultados falso positivos, porém neste estudo foi analisado a apoptose, ciclo celular, fatores de crescimento e migração celular.

Os resultados do presente estudo demonstram os efeitos fotobiomodulatórios do LBI vermelho e infravermelho nas CS. Os estudos sobre a FBM das CS ainda são escassos na literatura sendo necessários maiores investigações sobre os efeitos da FBM sobre este tipo celular isolado e sobre um processo de lesão induzida, além de maiores variações dos parâmetros de irradiação como energia e potência diferentes.

CONCLUSÃO

A FBM promoveu um aumento na atividade metabólica e mitose sem alterar a viabilidade celular, apresentando melhores resultados sobre a migração celular quando realizada com laser infravermelho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armati PJ, Mathey EK. An update on Schwann cell biology — Immunomodulation, neural regulation and other surprises. *J Neurol Sci*, 2013; 333(1-2):68-72.
2. Namgung U. The Role of Schwann Cell-Axon Interaction in Peripheral Nerve Regeneration. *Cells Tissue Organs*, 2014; 200 (1):6-12.
3. Jessen KR, Mirsky R, Lloyd AC. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015;7(7):a020487.
4. Chen P, Piao X, Bonaldo P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol*, 2015; 130(5):605-18.
5. Andreo L, Soldera CB, Ribeiro BG, de Matos PRV, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA. Effects of photobiomodulation on

- experimental models of peripheral nerve injury. *Lasers in Med Sci*, 2017; 32:2155-65.
6. Passarella S, Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2014; 140:344-58.
 7. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys*. 2017;4(3):337-361.
 8. Chen YJ, Wang YH, Wang CZ, Ho ML, Kuo PL, Huang MH, Chen CH (2014) Effect of low level laser therapy on chronic compression of the dorsal root ganglion. *PLoS One* 9:e89894
 9. Gomes LEA, Dalmarco EM, André ES. The Brain-Derived Neurotrophic Factor, Nerve Growth Factor, Neurotrophin-3, and Induced Nitric Oxide Synthase Expression After Low-Level Laser Therapy in an Axonotmesis Experimental Model. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2012; 11(30): 642-7.
 10. Rochkind S, Drory V, Alon M, Nissan M, Ouaknine GE. Laser phototherapy (780 nm), a new modality in treatment of long-term incomplete peripheral nerve injury: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(5):436-42.
 11. Baetas-da-Cruz W, Alves L, Guimarães EV, Santos-Silva A, Pessolani MC, Barbosa HS, Corte-Real S, Cavalcante LA. Efficient uptake of mannosylated proteins by a human Schwann cell line. *Histol Histopathol*, 2009; 24(8):1029-34.
 12. Silva SR, Tempone AJ, Silva TP, Costa MR, Pereira GM, Lara FA, Pessolani MC, Esquenazi D. Mycobacterium leprae downregulates the expression of PHEX in Schwann cells and osteoblasts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2010; 105(5):627-32.
 13. Pereira RM, Calegari-Silva TC, Hernandez MO, Saliba AM, Redner P, Pessolani MC, Sarno EN, Sampaio EP, Lopes UG. Mycobacterium leprae induces NF-kappaB-dependent transcription repression in human Schwann cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 335(1):20-6.

14. Oliveira AL, Antunes SL, Teles RM, Costa da Silva AC, Silva TP, Brandão Teles R, Ferreira Medeiros M, Britto C, Jardim MR, Pereira Sampaio E, Nunes Sarno E. Schwann cells producing matrix metalloproteinases under *Mycobacterium leprae* stimulation may play a role in the outcome of leprous neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010; 69(1):27-39.
15. Morrissey KT, Kleitman N, Bunge RP. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J Neurosci*, 1991;11:2433:42.
16. Rutkowski JL, Tennekoon GI, McGillicuddy JE. Selective culture of mitotically active human Schwann cells from adult adults sural nerves. *Ann Neurol*, 1992; 31:580-6.
17. Ryan JJ, Klein KA, Neuberger TJ, Leftwich JA, Westin EH, Kauma S, Fletcher JA, DeVries GH, Huff TF. Role for the stem cell factor/KIT complex in Schwann cell neoplasia and mast cell proliferation associated with neurofibromatosis. *J Neurosci*, 1994; 37:415-32.
18. Yazdani SO, Golestaneh AF, Shafiee A, Hafizi M, Omrani HAG, Soleimani M. Effects of low level laser therapy on proliferation and neurotrophic factor gene expression of human Schwann cells *in vitro*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2012; 107:8-13.
19. Meng C, He Z, Xing D. Low-Level Laser Therapy Rescues Dendrite Atrophy via Upregulating BDNF Expression: Implications for Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 2013;33(33):13505-17.
20. Van Breugel HHF, Bär PR. He-Ne irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose-dependent manor. *Journal of Neurocytology*, 1993; 22:185-90.
21. Wang Y, Shan Q, Pan J, Yi S. Actin Cytoskeleton Affects Schwann Cell Migration and Peripheral Nerve Regeneration. *Front Physiol*. 2018 Jan 25;9:23.
22. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med*. 2013 Jan;13(1):24-57.

4.3 Artigo 3

Efeitos da fotobiomodulação na funcionalidade de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático (artigo aceito para publicação na revista Photochemistry and Photobiology)

Andreo L¹, Soldera CA², Ribeiro BG², de Matos PR³ Sousa PB³, Amorim WWA³, Horliana ACRT¹, Bussadori, SK^{1,2}, Fernandes KPS¹, Mesquita-Ferrari RA^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil

³ Programa de Graduação, UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil

Correspondência:

Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari

raquel.mesquita@gmail.com

Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde;
Universidade Nove de Julho – UNINOVE

www.uninove.br

Rua Vergueiro, 349, CEP 01504001, São Paulo – SP, Brasil

Tel. +55 11 3385-9222

Financiamentos: Este trabalho teve apoio da UNINOVE e das seguintes agências de financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (www.cnpq.br; número do processo: 305739/2014 RAMF); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (www.capes.gov.br; número do processo: 1550120 LA; 1510536 BGR); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (www.fapesp.br; número do processo: 2014/12381-1 RAMF,417 2013/07502-1 KPSF).

RESUMO

Introdução: A lesão nervosa periférica (LNP) pode resultar em distúrbios motores ou sensoriais. A terapia a laser de baixa intensidade (TLBI) têm demonstrado resultados positivos como uma opção de tratamento para PNI.

Metodologia: Ratos Wistar foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: Controle, Lesão, Lesão+LBIn (nervo), Lesão+LBImm (músculo) e Lesão+LBIn+LBImm (irradiação no nervo e músculo). Os grupos foram analisados após 1, 2, 3 e 4 semanas. LNP foi obtida por esmagamento do nervo isquiático esquerdo. O tratamento com laser (780nm, 3.2J) foi realizado na área de lesão nervosa e/ou no músculo tibial. **Resultados:** Na análise de marcha os grupos irradiados na área de lesão nervosa apresentaram uma melhora em relação ao grupo Lesão em 2 semanas. Na análise da sensibilidade mecânica o grupo Lesão+LBIn apresentou uma diminuição em 1 semana em comparação com o grupo Lesão, em 2 semanas os grupos Lesão+LBIn+m e Lesão+LBIm apresentaram um aumento quando comparados ao grupo Lesão, os irradiados apresentaram uma redução da nocicepção em 4 semanas quando comparados ao grupo Lesão. Na análise da atrofia muscular, o grupo Lesão+LBIn apresentou um aumento de massa muscular em 2 semanas. **Conclusão:** A TLBI promoveu uma melhora dos aspectos funcionais no que se refere a análise de marcha, sensibilidade mecânica e massa muscular, sendo mais evidentes resultados positivos quando feita a aplicação na área de lesão nervosa no aspecto motor e na massa muscular; e no aspecto sensitivo na área muscular.

Palavras-chave: Regeneração nervosa, terapia a laser em baixa intensidade, nervo isquiático.

INTRODUÇÃO

Clinicamente, uma lesão nervosa periférica (LNP) não apresenta risco de vida ao indivíduo, porém pode gerar um impacto negativo na qualidade de vida pois há possibilidade de não ocorrer uma completa regeneração, resultando em distúrbios motores ou sensoriais, aproximadamente 1 a 2% da população atendida no pronto socorro apresenta esse tipo de lesão [1, 2].

Após uma LNP, se inicia um processo de reparo, englobando o crescimento neuronal, reinervação e recuperação funcional [3]. Em uma lesão acompanhada de degeneração *Walleriana*, como as lesões por esmagamento por exemplo, os músculos que seriam inervados por aquela fibra sofrem deterioração progressiva [4], ocorrendo uma insuficiência na reposição da perda degenerativa tecidual [5], as principais alterações decorrentes desta lesão incluem atrofia muscular, diminuição da área de secção transversa [6] e diminuição dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) da placa motora [4, 7] resultantes do comprometimento de fibras motoras, podendo levar à um distúrbio funcional [7].

Como opção de tratamento não invasivo para uma LNP, o LBI demonstrou efeitos positivos, através do efeito fotobiomodulatório, que pode causar uma inibição ou estimulação do metabolismo tecidual. Seu mecanismo de ação consiste na absorção de luz (fótons) pelos fotorreceptores, modulando as reações celulares, alterando a síntese de ATP na mitocôndria, através da aceleração da cadeia transportadora de elétrons [8, 9]. Em modelos experimentais de axonotmese por esmagamento, o LBI demonstrou melhora na funcionalidade através dos estudos de Belchior et al. [10], Takhfooladi et al. [11], Barbosa et al. [12], Sousa et al. [13] e Wang et al. [14] porém todos os estudos avaliaram os efeitos do tratamento com LBI somente na área de lesão nervosa ou o efeito da irradiação LBI no músculo desnervado, não há estudos com associação dos locais de irradiação.

Portanto, este projeto busca preencher a lacuna referente aos efeitos combinados do LBI quando aplicado tanto nos tecidos muscular quanto nervoso, uma vez que já foi demonstrado na literatura os efeitos positivos deste recurso em cada tecido separadamente.

METODOLOGIA

Local

O estudo foi realizado no laboratório de pesquisa do curso de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação e em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde, localizado na Unidade Vergueiro, 3º subsolo, da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), e já foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da UNINOVE (CEUA 2/2016).

Animais

Foram utilizados 85 ratos da linhagem Wistar, pesando entre 200-250g mantidos no biotério da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) aprovado pelo CEUA (2/2016). 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*.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais:

- **Grupo Controle:** os animais não foram submetidos a nenhum procedimento (n=5);
- **Grupo Lesão:** foi realizado o esmagamento do nervo isquiático esquerdo (NIE) dos animais (n=20);
- **Grupo Lesão+LBI_n:** foi realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberão tratamento com irradiação LBI na área correspondente à lesão nervosa (n=20);
- **Grupo Lesão+LBI_{mm}:** foi realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberão tratamento com irradiação LBI no músculo tibial anterior esquerdo (TAE) (n=20);
- **Grupo Lesão+LBI_n+LBI_{mm}:** foi realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberão tratamento com irradiação LBI na área correspondente à lesão nervosa e no músculo TAE (n=20).

Procedimento cirúrgico

O procedimento de esmagamento do nervo isquiático foi realizado conforme descrito por Salgado et al. [15] e Belchior et al. [10]. 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 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.

Os animais foram tricotomizados, posicionados em decúbito ventral 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 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 [10, 15]. 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 observação (figura 1). 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 [6].

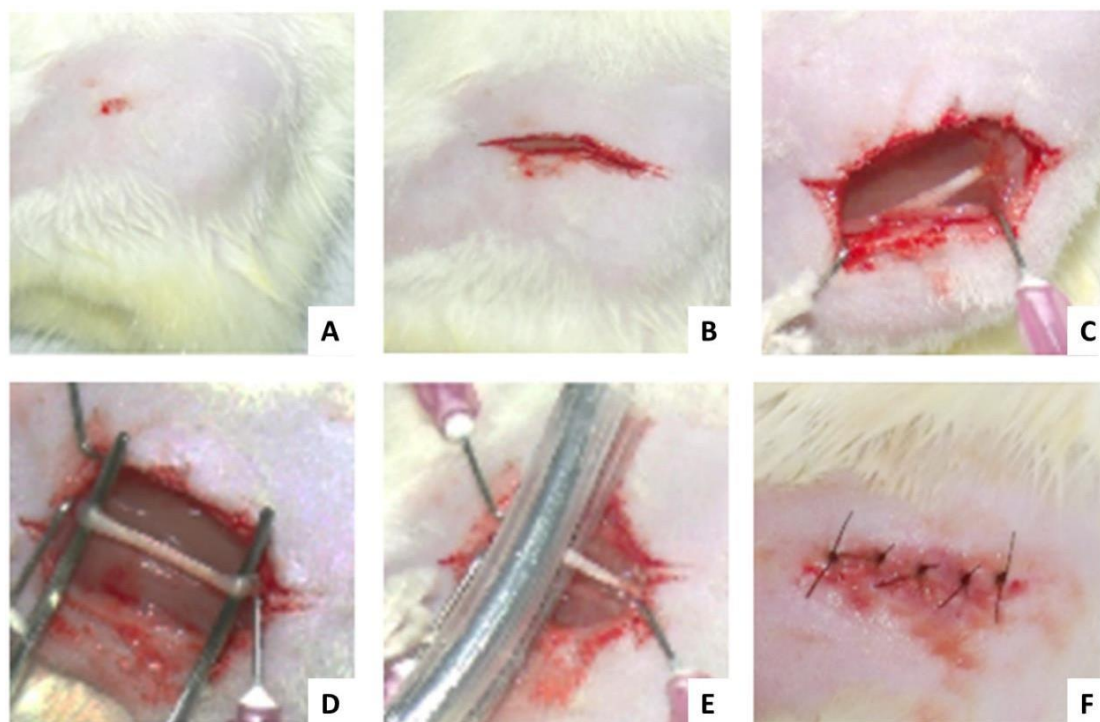


Figura 1. Demonstração de esmagamento do nervo isquiático. (A) Tricotomia da pata traseira esquerda. (B) Incisão. (C) Exposição do nervo isquiático esquerdo. (D) Isolamento do nervo isquiático esquerdo. (E) Esmagamento do nervo isquiático esquerdo. (F) área suturada.

Tratamento com laser em baixa intensidade (TLBI)

O TLBI foi realizado com base nos parâmetros descritos anteriormente por Alves et al. [16] para a irradiação muscular e adaptado de Sousa et al. [13] para a irradiação área de LNP, sendo utilizado o equipamento Twin Laser® (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil). Os parâmetros a serem utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros utilizados para o tratamento com LBI.

Meio ativo	Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)	
Local de irradiação	Muscular	Nervoso
Comprimento de onda	780 nm	780 nm
Área do feixe	0.04cm ²	0.04cm ²
Potência média	40 mW	40 mW
Densidade de potência	1W/cm ²	1W/cm ²
Densidade de energia	10J/cm ²	20J/cm ²
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

Para evitar refração do feixe do laser foi utilizado para aplicação o ângulo de 90 graus entre o emissor e a pele do animal ou entre o emissor e o microtubo. No início e final do procedimento experimental, a potência de emissão de luz do laser foi aferida utilizando o “LaserCheck power meter” (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil).

Nos grupos com irradiação LBI pós LNP o tratamento foi iniciado 2h após a realização da indução da lesão, sendo realizada uma única aplicação diária por 5 dias consecutivos semanalmente em cada grupo experimental até a finalização dos diferentes períodos de análise [6, 16]. Foi utilizada a técnica pontual diretamente sobre a região da incisão, ao redor da área da lesão em quatro pontos, dois acima e dois abaixo da incisão com 1 cm de distância (nos grupos com irradiação na área correspondente à lesão nervosa). Os grupos que receberão a irradiação no músculo tibial anterior, terão a aplicação realizada em 8 pontos, conforme descrito por Alves et al. [16].

Análise funcional da marcha

A análise funcional de marcha foi realizada utilizando o Índice Funcional Ciático (IFC) [17], descrito anteriormente por Bain et al. [18]. Para obtenção das pegadas, as patas foram em tinta, deixando a cor 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. [17] fechada nas laterais, contendo uma casinhola no final. As impressões das patas foram digitalizadas e foram analisados os parâmetros sugeridos por Bain et al. [18]: comprimento da pegada (PL, ou *print legth*), 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*)).

O IFC foi calculado a partir da fórmula:

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

$$IFT = -37,2 \times \left(\frac{EPL - NPL}{L} \right) + 104,4 \times \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13,3 \times \left(\frac{EIT - NIT}{EIT - NIT} \right) - 8,8$$

$$IFP = -174,9 \times \left(\frac{NPL}{L} \right) + 80,3 \times \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 45,6 \times \left(\frac{NIT}{EIT - NIT} \right) - 13,4$$

Sendo:

E: experimental

N: normal

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

IFT: Índice Funcional do Tibial

IFP: Índice Funcional do Peroneio (fibular)

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 [18].

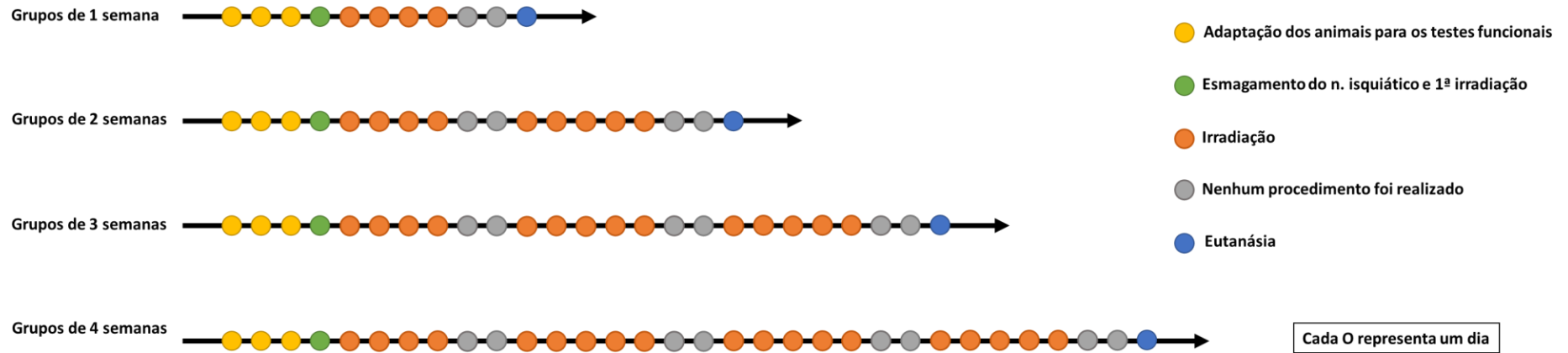


Figura 2. Linha do tempo dos procedimentos experimentais.

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. [19]. Os animais foram acondicionados em uma caixa transparente sobre uma tela de arame para acesso à superfície plantar da pata dos mesmos e foram habituados por 20min, antes da execução de cada teste e nos três dias que antecedem a primeira coleta foram 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 expressará 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.

Eutanásia

Todos os animais foram eutanasiados com superdose de anestésico 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 análise histológico e os músculos TA foram removidos e pesados para análise da massa muscular.

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 [5]. 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. [5].

Análise dos resultados

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 erro padrão da média, 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

Análise funcional da marcha

O grupo controle apresentou um índice dentro do padrão de normalidade com resultados mais próximos de zero, enquanto todos os grupos lesionados (Lesão, Lesão+LBIn, Lesão+LBIn+m e Lesão+LBIm) apresentaram uma piora nos índices funcionais avaliados (IFC, IFT e IFP) após 1 semana de lesão (figuras 3A, 4A e 5A). Com relação ao IFC foi observado em 2 semanas os grupos irradiados (Lesão+LBIn, Lesão+LBIn+m e Lesão+LBIm) apresentaram uma melhora no IFC em relação ao grupo Lesão não tratado que demonstrou ainda uma piora em relação ao grupo Controle (figura 3B). A avaliação do IFP e IFT apresentaram resultados similares, com uma melhora da funcionalidade nos grupos irradiados (Lesão+LBIn, Lesão+LBIn+m e Lesão+LBIm), havendo um maior aumento na funcionalidade no grupo Lesão+LBIn (figuras 4B e 5B). Após três e quatro semanas os grupos experimentais não demonstraram diferença

estatisticamente significativa entre si e em comparação ao grupo controle sem lesão ($p > 0,05$; figuras 3C, 3D, 4C, 4D, 5C e 5D).

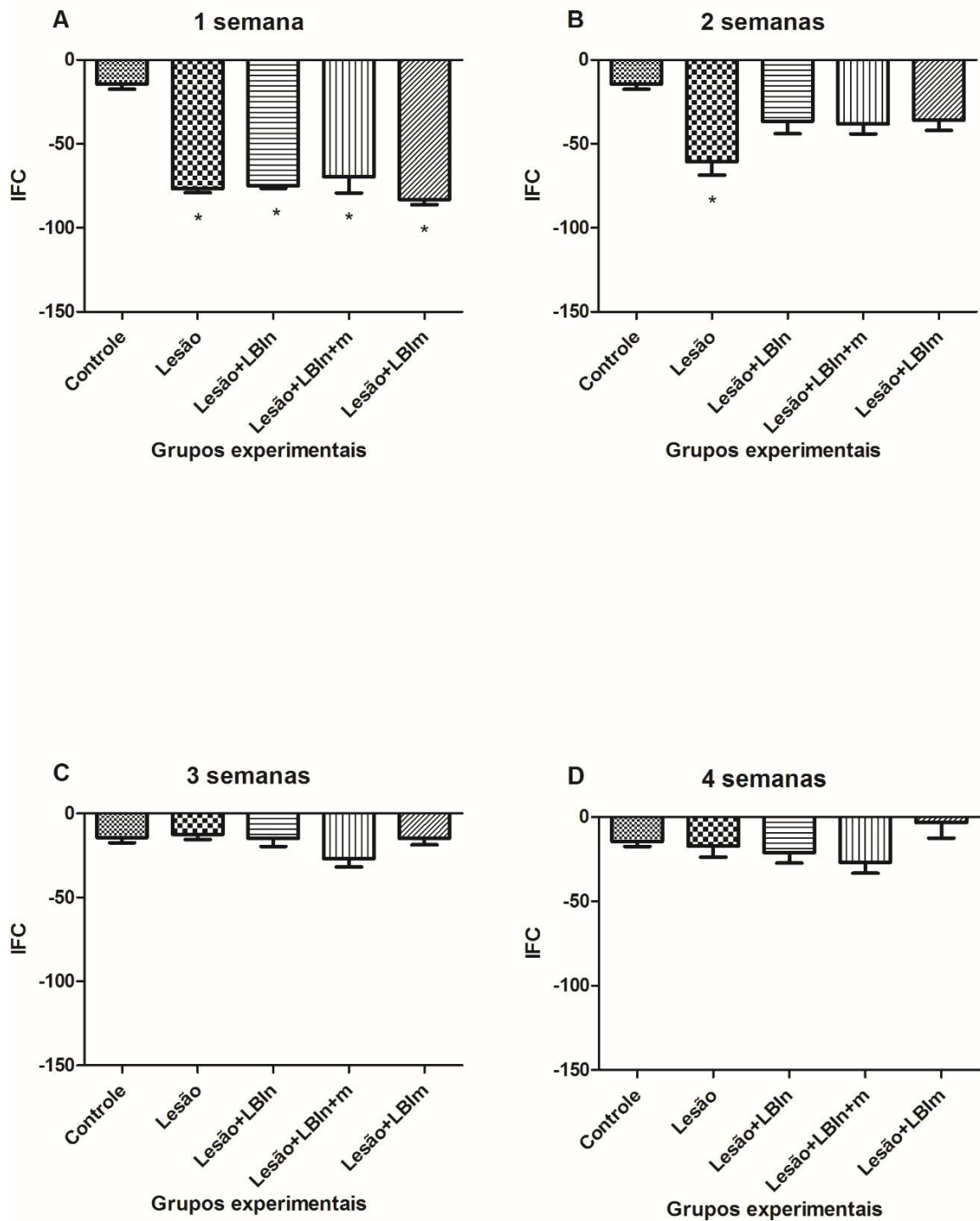


Figura 3: Efeitos da fotobiomodulação sobre o IFC de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D).

* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle.

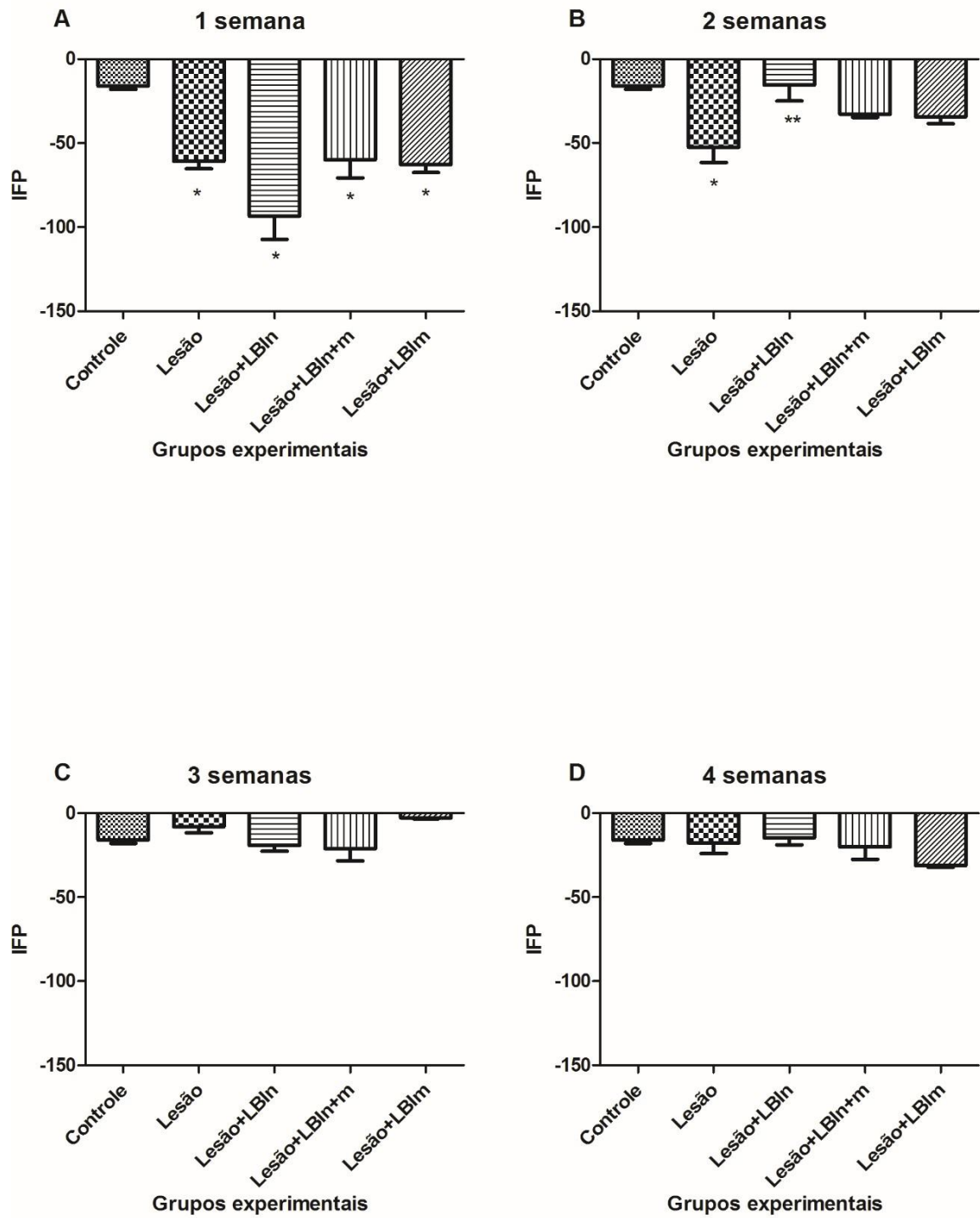


Figura 4: Efeitos da fotobiomodulação sobre o IFP de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle, ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Lesão.

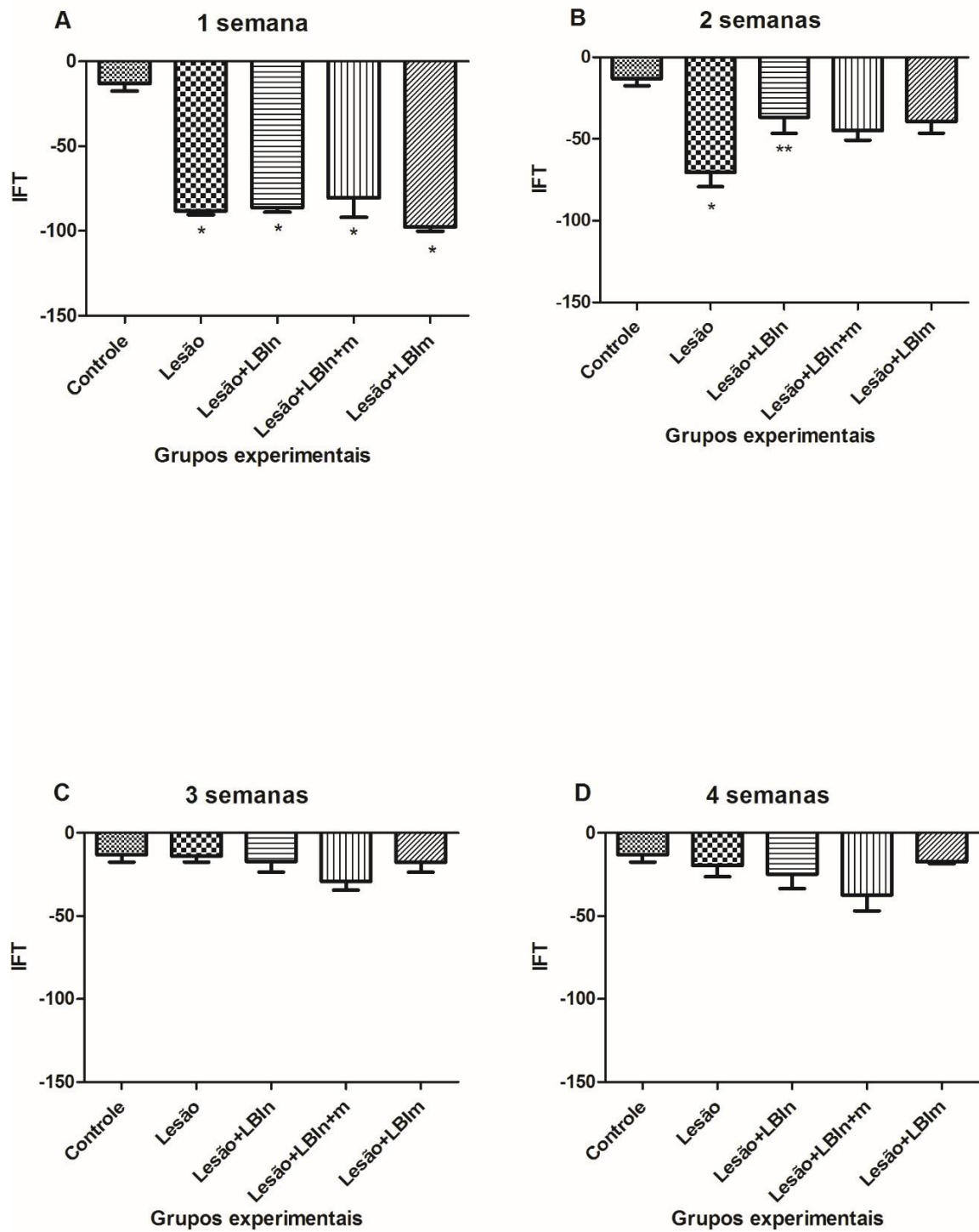


Figura 5: Efeitos da fotobiomodulação sobre o IFT de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle, ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Lesão.

Análise von Frey

Em 1 semana o grupo Lesão+LBIn demonstrou uma diminuição na nocicepção em relação ao grupo Controle (figura 6A), não havendo diferença entre os demais grupos experimentais ($p < 0,05$). Em duas semanas (figura 6B) os grupos que receberam irradiação no músculo (Lesão+LBIn+m e Lesão+LBIm) apresentaram um aumento na pressão média máxima em relação ao grupo Lesão ($p < 0,05$), havendo um aumento na pressão média máxima no grupo Lesão+LBIn+m quando comparado ao grupo Lesão+LBIn. Após três semanas (figura 6C) não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). Em 4 semanas (figura 6D) os grupos que receberam irradiação no músculo (Lesão+LBIn+m e Lesão+LBIm) demonstraram uma melhora em relação ao grupo Lesão.

Análise da massa muscular

Os animais do grupo Controle apresentaram valores próximos de 1, como esperado, demonstrando uma similaridade entre as massas musculares dos músculos tibial anterior esquerdo e direito. Após uma semana, o grupo Lesão+LBIm demonstrou uma diminuição da relação de massa muscular indicando aumento de atrofia quando comparado ao grupo Controle (figura 7A). Em duas semanas, os grupos Lesão, Lesão+LBIn+m e LBIm demonstraram uma diminuição da massa muscular quando comparado ao grupo Controle e o grupo Lesão+LBIn demonstrou uma melhora quando comparado ao grupo Lesão (figura 7B). Em três e quatro semanas os grupos lesionados (Lesão, Lesão+LBIn, Lesão+LBIn+m e Lesão+LBIm) demonstraram uma diminuição em relação ao grupo Controle, sem diferenças intergrupos (figuras 7C e 7D).

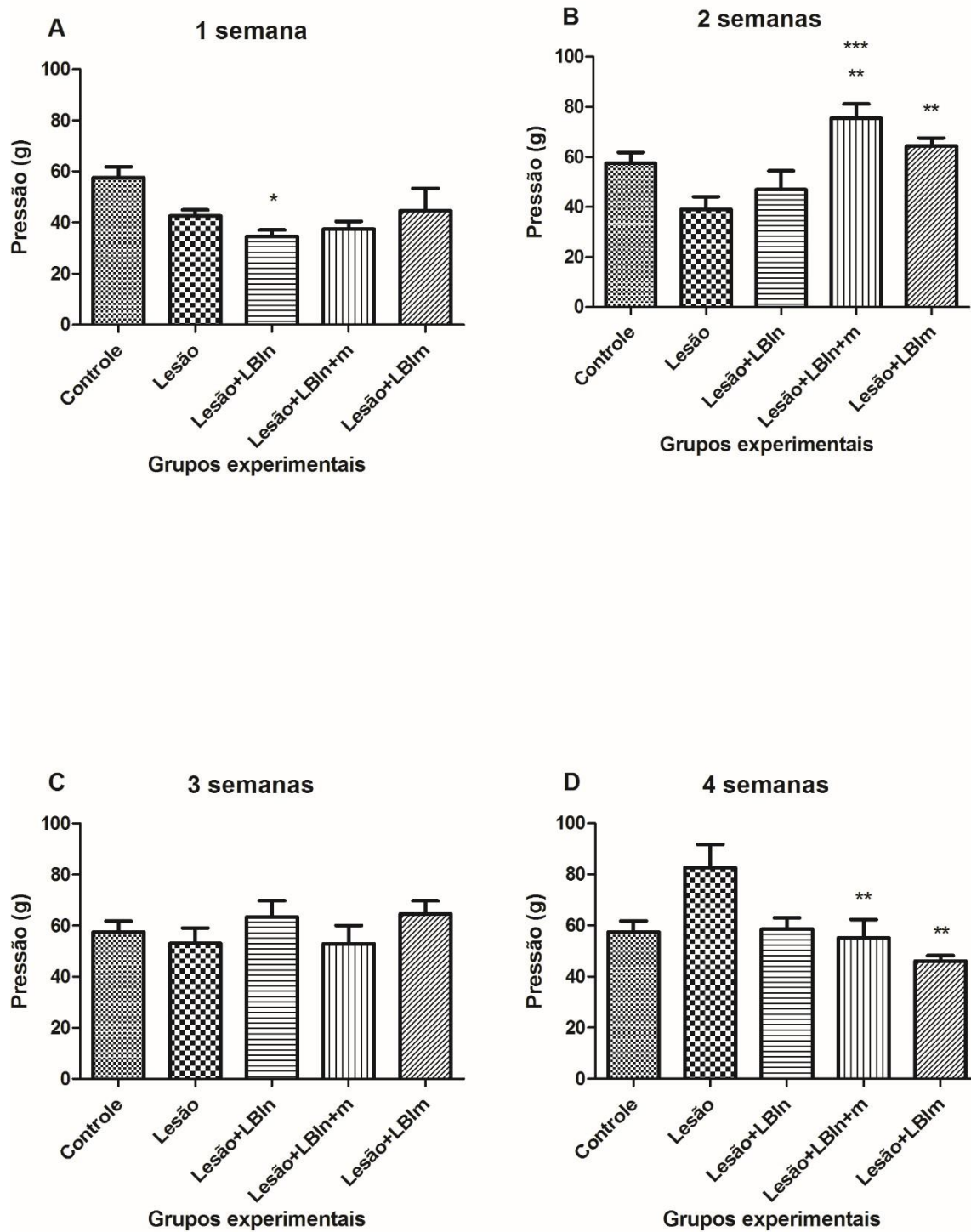


Figura 6: Efeitos da fotobiomodulação sobre a nocicepção de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D).

* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle, ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Lesão, *** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Lesão+LBlm.

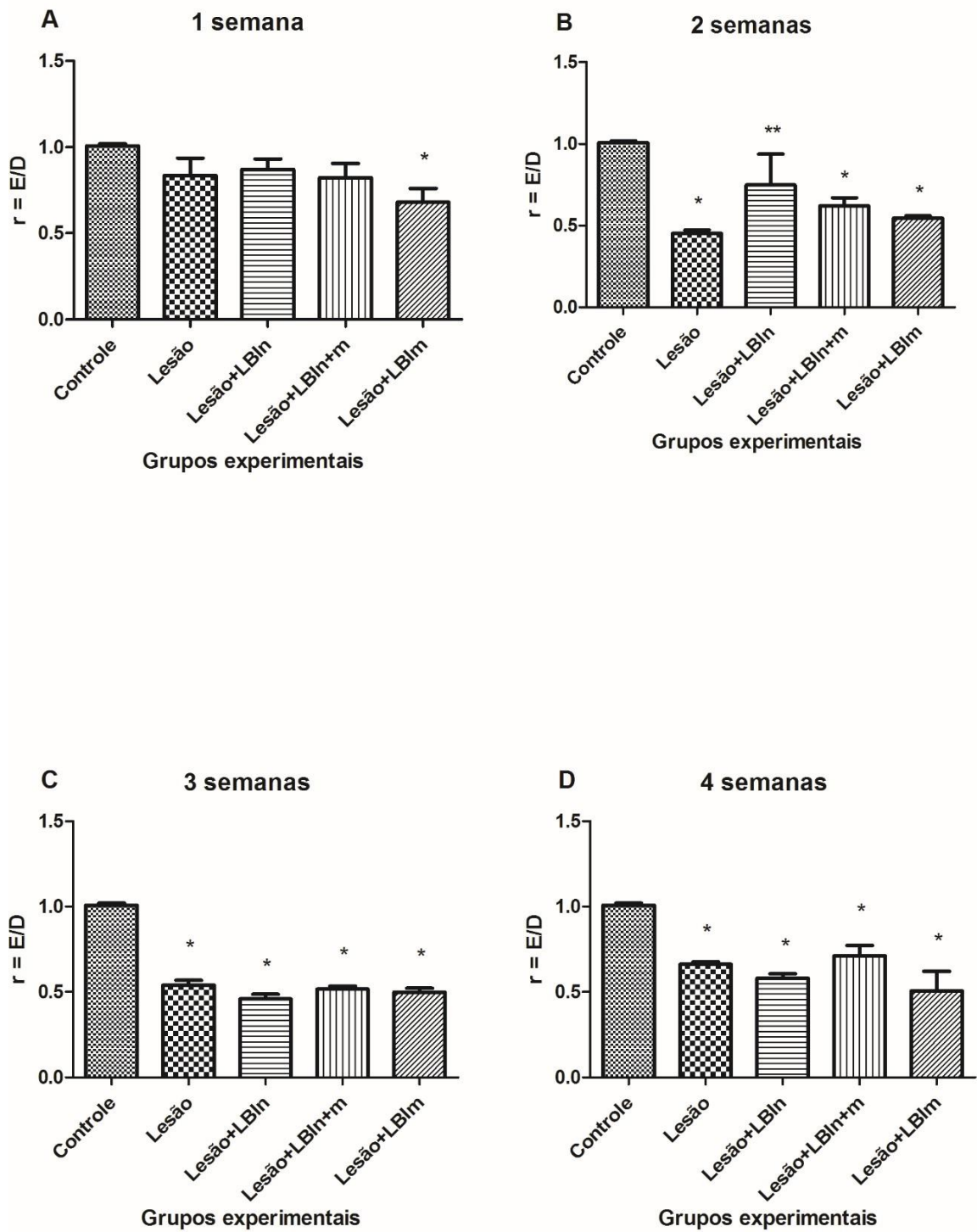


Figura 7: Efeitos da fotobiomodulação sobre a atrofia muscular ($r=E/D$) de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D). * $p<0,05$ quando comparado ao grupo Controle, ** $p<0,05$ quando comparado ao grupo Lesão.

DISCUSSÃO

As lesões nervosas periféricas são mais frequentes que as lesões medulares, podendo ser uma lesão incapacitante de acordo com o tipo de lesão e grau de acometimento. O LBI tem demonstrado potencial terapêutico em diversas situações. Especificamente na LNP, o LBI demonstrou um aumento da funcionalidade motora e na atividade muscular voluntária no estudo de Rochkind et al. [20] em pacientes com LNP, sendo observado uma melhora nos grupos tratados (780 nm, 250 mW, irradiados na área de lesão nervosa e no segmento correspondente da medula espinal) quando comparado ao grupo placebo, exibindo a viabilidade deste recurso na recuperação funcional pós LNP. No presente estudo, a TLBI foi realizada em animais com lesão controlada no nervo isquiático para garantir a padronização da lesão e do acometimento, exibindo resultados promissores visando o estabelecimento de um protocolo de irradiação.

Vale ressaltar que os efeitos positivos do LBI no tecido muscular durante o processo de reparo após diversos tipos de lesão estão bem descritos na literatura e estes incluem melhor remodelamento de colágeno, modulação da expressão gênica de fatores regulatórios miogênicos, aumento no número de fibras jovens e angiogênese [16, 21] e diminuição da concentração tecidual de citocinas pró-inflamatórias [22]. No entanto, há efeitos variados de acordo com os diferentes parâmetros de aplicação, como por exemplo, aumento de funcionalidade [23], amplitude de movimento [14], atenuação da disestesia [24] e modulação da concentração de citocinas inflamatórias [25]. Assim, a necessidade da compreensão dos mecanismos de ação envolvidos na modulação do processo inflamatório se torna evidente, a fim de atingir os efeitos desejados.

Em relação a análise funcional da marcha, os resultados permitiram concluir que os grupos irradiados na área de lesão nervosa apresentaram uma melhora em 2 semanas quando comparado ao grupo Lesão, corroborando com os estudos descritos na literatura sobre o uso de LBI nas lesões por esmagamento do nervo isquiático como o de Belchior et al. [10], no qual o grupo irradiado após a indução da lesão durante 20 dias consecutivos (660 nm, 26.3 mW, 7.6 J) demonstrou um aumento do índice funcional do ciático (IFC) pós 21

dias de lesão, Takhfooladi et al. [11] que demonstraram esse aumento no grupo irradiado após a operação por 21 dias consecutivos (660 nm, 15 mW, 0.15 J) em 14 e 21 dias pós lesão no IFC, entretanto, Barbosa et al. [12] observaram esse aumento no índice somente em 14 dias pós lesão no grupo irradiado imediatamente após a cirurgia por 20 dias consecutivos (660 nm, 30 mW, 0.6 J). Nos estudos de Sousa et al. [13] foi demonstrado um aumento no índice funcional do fibular (IFF) nos estudos de com irradiação diária por 28 dias (830 nm, 40 mW, 2.77 J) em 14 dias e no IFC no estudo de Wang et al. [14] (808 nm, 170 mW) nos grupos irradiados diariamente por 20 dias consecutivos com 3 e 8 J, além de um aumento na amplitude de movimento no grupo 8J. Nestes estudos a irradiação foi no local da lesão nervosa, a região muscular não recebeu tratamento.

No presente estudo não foi observado diferença nos índices de marcha nos períodos de três a quatro semanas, isso pode ser decorrente do tempo de recuperação funcional, sendo iniciado nas lesões por esmagamento após 12 dias atingindo um platô em 28 dias [26], último período de avaliação dos animais. Com relação a sensibilidade, o grupo Lesão+LBI_n apresentou o menor resultado em 1 semana e os grupos irradiados na área muscular (Lesão+LBI_n+m e Lesão+LBI_m) demonstraram aumento nos resultados em relação aos demais grupos experimentais em 2 semanas, esse achado demonstra o efeito atenuante da fotobiomodulação sobre a dor, como demonstrado no estudo de Hsieh et al. [23]. A hiperalgesia, hipoalgesia ou alodinia são distúrbios sensitivos e nenhum deles são esperados em condições normais, mas no reestabelecimento sensorial, valores próximos ao grupo controle são esperados conforme o processo de reparo, como nos grupos irradiados (Lesão+LBI_n, Lesão+LBI_n+m e Lesão+LBI_m) no nosso estudo. Não há na literatura outros estudos com irradiação na área do músculo correspondente e avaliação da sensibilidade, no entanto há estudos com irradiação na área de lesão nervosa. Hsieh et al. [23] demonstraram um aumento no reflexo de retirada da pata após 14 dias pós lesão. Chen et al. [25] demonstraram uma diminuição da hiperalgesia mecânica e térmica em 4 e 8 dias nos grupos irradiados 24h pós lesão diariamente por 8 dias com LBI infravermelho (808 nm, 190 mW, 36 J), esses estudos corroboram com Masoumpoor et al. [24] que demonstraram um aumento no limiar térmico e

mecânico de retirada da pata dos animais nos grupos irradiados pós cirúrgico e diariamente por 2 semanas com LBI vermelho (660 nm, 100 mW, 3.4 J) e infravermelho (980 nm, 70 mW, 3.4 J). Esses resultados apresentaram uma melhora, porém foram realizadas irradiações na área correspondente a lesão nervosa e em todos esses estudos o modelo de lesão foi o de constrição crônica, demonstrando que o LBI possui efeito de diminuição da estimulação dos receptores nociceptivos. No estudo *in vitro*, Yachnev et al. [27], demonstraram a diminuição da ativação dos canais de sódio dependente em neurônios do gânglio dorsal de ratos Wistar irradiados com laser infravermelho (fluência: 10^{-11} J/cm²) diminuindo o potencial de ação de neurônios sensitivos.

Com relação à massa muscular, o grupo com irradiação na área de lesão nervosa apresentou uma atenuação da atrofia muscular no período de duas semanas, porém a desnervação levou a uma atrofia nos períodos subsequentes, no estudo de Shen et al [5], os animais do grupo que receberam TLBI (660 nm, 50 mW, 2 min, próximo à área de lesão nervosa) demonstraram um aumento do índice quando comparado aos animais que não foram irradiados após 12 semanas da neurotmesa (a diferença no tempo de avaliação foi decorrente do tipo de lesão nervosa – neurotmesa acompanhada de uma intervenção cirúrgica de tubulização).

Como citado anteriormente, a recuperação funcional atinge um platô em 28 dias aproximadamente, porém para determinação do reestabelecimento da massa muscular o tempo de investigação seria maior, em decorrência da regeneração axonal progressiva com reestruturação da junção neuromuscular (JNM) e normalização dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR). No estudo de Pissulin et al [28] o LBI (904 nm, 50 mW, 4.8 J) foi capaz de aumentar a área da JNM e da expressão proteica do nAChR (subunidade ϵ) em ratos Wistar pós anestesia local com bupivacaína, um anestésico que possui propriedades pró-inflamatórias e tóxicas. Estudos futuros usando os mesmos parâmetros e modelo experimental do presente estudo devem ser conduzidos para elucidar uma possível fotobiomodulação desses aspectos quando irradiados na área de lesão muscular e nervosa.

Os resultados do presente estudo demonstram os efeitos positivos do LBI na recuperação pós LNP corroborando com os dados descritos na literatura.

Na revisão de Andreo et al. [29] estudos usando parâmetros aproximados ao do presente estudo demonstraram efeitos positivos da fotobiomodulação quando aplicados somente na área de lesão demonstram melhores resultados relacionados à funcionalidade, aumento no diâmetro das fibras nervosas (Dias et al., 780 nm, 30 mW, 1.8 J em 3 pontos) [30], melhor recuperação da sensibilidade mecânica e térmica (Chen et al. 2014, 808 nm, 190 mW, 36 J, 1 ponto) [25] e modulação de fatores neurotróficos como um aumento na expressão gênica de GAP43 (Chen et al. 2014, 808 nm, 190 mW, 36 J, 1 ponto) [25]. Diferentes resultados foram obtidos em parâmetros de irradiação que se assemelham, porém em locais de irradiação diferentes. Estudos futuros envolvendo análises da histologia muscular e nervosa, além da expressão gênica de algumas proteínas seriam de grande valor para a compreensão dos mecanismos de ação do LBI nestes parâmetros e das diferenças nos parâmetros, como o local de irradiação.

CONCLUSÃO

A TLBI promoveu uma melhora dos aspectos funcionais avaliados no presente estudo no que se refere a análise de marcha, sensibilidade mecânica e massa muscular, com melhores resultados nos aspectos motores e de massa muscular quando administrada na área de lesão nervosa em 1 e 2 semanas e melhores resultados no aspecto sensitivo quando administrado na área de lesão muscular em 2 semanas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil.* 2008; 87(5):381-5.
2. Eser F, Aktekin LA, Bodur H, Atan Ç. Etiological factors of traumatic peripheral nerves injuries. *Neurol India.* 2009; 57(4):434-7.
3. Seddon, HJ. *Surgical disorders of the peripheral nerves*, 1975. Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh 2ªed.

4. Rochkind S, Geuna S, Shainberg A. Phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration. *International Review of Neurobiology*, 2009; 87:445-64.
5. 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.
6. 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.
7. Dubový P, Brázda V, Klusáková I, Hradilová-Svíženská I. Bilateral evaluation of interleukin-6 protein and mRNA in both lumbar and cervical dorsal root ganglia following unilateral chronic compression injury of the sciatic nerve. *J Neuroinflammation*, 2013; 10:55.
8. Passarella S, Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2014; 140:344-58.
9. Karu T. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 2008; 84:1091-9.
10. 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.
11. Takhtfooladi MA, Jahanbakhsh F, Takhtfooladi HA, Yousefi K, Allahverdi A. Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm²) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci*, 2015; 30:1047-52.
12. Barbosa RI, Marcolino AM, Guirro RRJ, Mazzer N, Barbieri CH, Fonseca MCR. Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci*, 2010; 25: 423-430.

13. Sousa FFA, Andraus RAC, Barbieri CH, Mazzer N. Influence of laser radiation in nerve regeneration in different treatments sites. *Acta Ortop Bras*, 2009; 17(6): 331-5.
14. Wang C-Z, Chen Y-J, Wang Y-H, Yeh M-L, Huang M-H, Ho M-L, Liang J-I, Chen C-H. Low-Level Laser Irradiation Improves Functional Recovery and Nerve Regeneration in Sciatic Nerve Crush Rat Injury Model. *PLoS ONE*, 2014; 9(8):e103348.
15. Salgado ASI, Alves ACA, Kerppers I, Gomes MHT, Barreto AB, Martins FL, Júnior NSF, Oliveira CS, Oliveira LVF, Zângaro RA, Carvalho PTC. Comparative analysis of stulated sciatic nerve regeneration by ultrasound and therapeutic low-level laser therapy. *Clin Exp Med Lett*, 2011; 52(3-4):103-7.
16. Alves AN, Fernandes KPS, Melo CA, Yamaguchi RY, França CM, Teixeira DF, Bussadori SK, Nunes FD, Mesquit-Ferrari RA. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci* 2014; 29(2):813-21.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Rochkind S, Drody V, Alon M, Nissa M, Ouaknine GE. Laser Phototherapy (780 nm), a New Modality in Treatment of Long-Term Incomplete Peripheral Nerve Injury: A Randomized Double-Blinded Placebo Controlled Study. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2007; 25(5):436-42.
21. Ribeiro BG, Alves AN, Santos LA, Fernandes KP, Cantero TM, Gomes MT, França CM, Silva DF, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. *Lasers Surg Med*, 2015 Jul 6.

22. Almeida P, Tomazini SS, Frigo L, Carvalho PTC, Vanin AA, Santos LA, Albuquerque-Pontes GM, Marchi TD, Tairova O, Marcos RL, Lopes-Martins RAB, Leal-Junior ECP. What is the best treatment to decrease pro-inflammatory cytokine release in acute skeletal muscle injury induced by trauma in rats: low-level laser therapy, diclofenac or cryotherapy? *Lasers Med Sci*, 2013; 29:653-8,
23. Hsieh YL, Chou LW, Chang PL, Yang CC, Kao MJ, Hong CZ. Low-Level Laser Therapy Alleviates Neuropathic Pain and Promotes Function Recovery in Rats With Chronic Constriction Injury: Possible Involvements in Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α). *Research in Systems Neuroscience*, 2012;520:2903-16.
24. Masoumipoor M, Jameie SB, Janzadeh A, Nasirinezhad F, Soleimani M, Kerdary M. Effects of 660- and 980-nm low-level laser therapy on neuropathic pain relief following chronic constriction injury in rat sciatic nerve. *Lasers Med Sci*, 2014; 29: 1593-8.
25. Chen Y-J, Wang Y-H, Wang C-Z, Ho M-L, Kuo P-L, Huang M-H, Chen C-H. Effect of Low Level Laser Therapy on Chronic Compression of the Dorsal Root Ganglion. *PLoS ONE*, 2014; 9(3):e89894.
26. Tos P, Ronchi G, Papalia I, Sallen V, Legagneus J, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part I – experimental models. *International Review of Neurobiology*, 2009;87:47-79.
27. Yachnev IL, Plakhova VB, Podzorova SA, Shelykh TN, Rogachevsky IV, Krylov BV. Mechanism of Pain Relief by Low-Power Infrared Irradiation: ATP is an IR-Target Molecule in Nociceptive Neurons. *Med Chem*, 2012; 8(1):14-21.
28. Pissulin CNA, Castro PATS, Codina F, Pinto CG, Vechetti-Junior IJ, Matheus SMM. GaAs laser therapy reestablishes the morphology of the NMJ and nAChRs after injury due to bupivacaine. *J Photochem Photobiol B*, 2017; 167:256-63.
29. Andreo L, Soldera CB, Ribeiro BG, de Matos PRV, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA. Effects of photobiomodulation on

experimental models of peripheral nerve injury. *Lasers in Med Sci*, 2017; 32:2155-65.

30. Dias FJ, Issa JP, Coutinho-Netto J, Fazan VP, Sousa LG, Iyomassa MM, Papa CP, Watanabe IS (2015) Morphometric and high resolution scanning electron microscopy analysis of low-level laser therapy and latex protein (*Hevea brasiliensis*) administration following a crush injury of the sciatic nerve in rats. *J Neurol Sci* 349:129–137

4.4 Artigo 4

Efeitos da fotobiomodulação no reparo neuromuscular de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático

Andreo L¹, Ribeiro BG², Soldera CA², Raoul P³ Sousa PB³, Barbosa DSS³,
Horliana ACRT¹, Bussadori, SK^{1,2}, Fernandes KPS¹, Mesquita-Ferrari RA^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde,
Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, UNINOVE, São
Paulo, SP, Brasil

³ Programa de Graduação em Fisioterapia, UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil

Correspondência:

Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari

raquel.mesquita@gmail.com

Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde;
Universidade Nove de Julho – UNINOVE

www.uninove.br

Rua Vergueiro, 349, CEP 01504001, São Paulo – SP, Brasil

Tel. +55 11 3385-9222

Financiamentos: Este trabalho teve apoio da UNINOVE e das seguintes agências de financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (www.cnpq.br; número do processo: 305739/2014 RAMF); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (www.capes.gov.br; número do processo: 1550120 LA; 1510536 BGR); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (www.fapesp.br; número do processo: 2014/12381-1 RAMF,417 2013/07502-1 KPSF).

RESUMO

Introdução: A lesão nervosa periférica (LNP) tem a capacidade de gerar um impacto negativo na qualidade de vida pela possibilidade de deixar sequelas, como distúrbios sensoriais ou motores. Como opção de tratamento para uma LNP, a fotobiomodulação demonstrou efeitos positivos. **Metodologia:** Foram utilizados 85 ratos Wistar, divididos em 5 grupos: Controle, Lesão, Lesão+LBI_n, Lesão+LBI_{nm} e Lesão+LBI_n+LBI_m (n=20/ grupo) sendo os grupos lesão analisados após 1, 2, 3 e 4 semanas. A lesão do nervo isquiático esquerdo foi realizada pela técnica de esmagamento. O tratamento com laser foi administrado com LBI (780 nm, 0.04 cm², 1 W/cm², 3.2 J) na área de lesão nervosa (20J/cm², 0.8J por ponto em 4 pontos), e/ou no músculo tibial anterior (10J/cm², 0.4J por ponto em 8 pontos). Foi realizada a análise da morfologia muscular e expressão gênica. **Resultados:** Na análise histológica os grupos irradiados apresentaram um aumento no diâmetro das fibras e na área de secção transversa em 3 e 4 semanas. A expressão de calcineurina diminuiu em todos os grupos que receberam irradiação em relação ao grupo Lesão. A expressão de miostatina aumentou em 3 semanas no grupo Lesão e nos grupos Lesão+LBI_n e Lesão+LBI_{nm} diminuiu quando comparados ao grupo Lesão. A expressão de miogenina diminuiu nos grupos Lesão e Lesão+LBI_m em 1 semana, em 2 semanas diminuiu no grupo Lesão e aumentou nos grupos irradiados. A expressão de β -nAChR diminuiu nos grupos Lesão, Lesão+LBI_{nm} e Lesão+LBI_m em 1 semana e em 2 semanas aumentou no grupo Lesão+LBI_n e Lesão+LBI_{nm}. A expressão de δ -nAChR em 1 semana foi diminuída no grupo Lesão e Lesão+LBI_m, em 2 e 3 semanas somente o grupo Lesão apresentou uma diminuição. Nos grupos lesionados a expressão de γ -nAChR foi diminuída nos períodos avaliados. E o ϵ -nAChR diminuiu em todos os grupos lesionados em 1 semana, em 2, 3 e 4 semanas diminuiu nos grupos Lesão e Lesão+LBI_m. **Conclusão:** O LBI foi capaz de promover um aumento no diâmetro e AST, além de modulação gênica nos músculos pós LNP, sendo mais indicado a administração tanto na área de lesão nervosa, quanto no músculo afetado.

Palavras-chave: Regeneração nervosa, terapia a laser em baixa intensidade, nervo isquiático, calcineurina, miostatina, MyoD, miogenina, nAChR.

INTRODUÇÃO

A lesão nervosa periférica (LNP) tem a capacidade de gerar um impacto negativo na qualidade de vida pela possibilidade de deixar sequelas, como distúrbios sensoriais ou motores. Cerca de 1 a 2% de pacientes atendidos no pronto-socorro apresentam esta lesão [1, 2].

Após uma LNP, se inicia um processo de reparo, englobando o crescimento neuronal, reinervação e recuperação funcional [3]. Em uma lesão acompanhada de degeneração *Walleriana*, como as lesões por esmagamento por exemplo, os músculos que seriam inervados por aquela fibra sofrem deterioração progressiva [4], ocorrendo uma insuficiência na reposição da perda degenerativa tecidual [5].

As principais alterações decorrentes desta lesão incluem atrofia muscular, havendo um aumento na 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 [6]. Além disso, há uma alteração na concentração de miostatina, que é um fator regulador negativo do crescimento muscular. Após a desnervação completa há um aumento inicial da expressão gênica e proteica muscular de ratos e após 2 semanas essa concentração diminui ficando em uma concentração menor que a normal [7]. 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 (FRMs), como MyoD e miogenina [8].

Há alterações nas expressões gênicas de FRMs no tecido muscular pós desnervação, aumentando num período mais agudo e diminuindo progressivamente. Especificamente, no tecido muscular músculo TA por transecção do nervo isquiático de ratos Wistar, o pico de aumento da expressão gênica de MyoD e Myf5 ocorre 1 mês e o retorno à normalidade em 7 meses pós desnervação completa. Contudo, o pico da expressão gênica de MRF4 e miogenina pós 9 dias e o retorno à concentração normal em 2 meses [9,10].

Os FRMs regulam a expressão diferencial dos genes das subunidades de nAChR [11]. Os nAChR estão presentes no ápice da dobra juncional da junção neuromuscular (JNM) [12] e possuem duas formas de apresentação: a

forma extrajuncional imatura, encontrado nas fibras desnervadas ou em fibras embrionárias, e a forma juncional madura. As subunidades presentes na forma imatura são $\alpha 1$ (2), $\beta 1$, δ e γ e na forma madura $\alpha 1(2)$, $\beta 1$, δ e ϵ .

Após uma desnervação, há um aumento da forma imatura inicialmente e um retorno ao nível normal no processo de reparo, havendo uma reposição da subunidade ϵ -nAChR pelas subunidades γ -nAChR. Especificamente, no músculo TA desnervado por transecção do nervo isquiático de ratos Wistar há um aumento na expressão gênica das subunidades γ e ϵ , com um pico em 9 dias, havendo uma diminuição progressiva da expressão gênica de γ -nAChR e um aumento progressivo na expressão gênica de ϵ -nAChR [9,10].

Essas alterações do nAChR afetam a estabilidade da JNM e regeneração pós desnervação [10]. Há uma alteração no número e densidade de axônios regenerativos na JNM, havendo uma degeneração progressiva da bainha axonal do nervo intramuscular, dificultando o infiltrado axonal nas fibras musculares levando à uma diminuição no número de unidades motoras com consequente diminuição dos receptores da JNM [10].

O LBI demonstrou ser uma opção viável de tratamento não invasivo para LNP, seu efeito fotobiomodulatório tem a capacidade de modular o metabolismo celular através da absorção de fótons pelos fotorreceptores que acelera a cadeia transportadora de elétrons e por consequência altera a síntese de ATP [13,14]. Em estudos com modelos *in vivo* com indução da LNP por esmagamento do nervo, o LBI demonstrou melhora na funcionalidade através dos estudos de Belchior et al. [15], Takhfooladi et al. [16], Barbosa et al. [17], Sousa et al. [18] e Wang et al. [19] porém todos os estudos avaliaram os efeitos do tratamento com LBI somente na área de lesão nervosa ou o efeito da irradiação LBI no músculo desnervado, não há estudos publicados previamente sobre a associação dos locais de irradiação.

Portanto, este estudo busca preencher a lacuna referente aos efeitos combinados do LBI quando aplicado tanto nos tecidos muscular quanto nervoso, uma vez que já foi demonstrado na literatura os efeitos positivos deste recurso em cada tecido separadamente.

METODOLOGIA

Local

O estudo foi realizado no laboratório de pesquisa do curso de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação e em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde, localizado na Unidade Vergueiro, 3º subsolo, da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), e já foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da UNINOVE (CEUA 2/2016).

Animais

Foram utilizados 85 ratos da linhagem Wistar, pesando entre 200-250g mantidos no biotério da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) aprovado pelo CEUA (2/2016). 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*.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais:

- **Grupo Controle:** os animais não foram submetidos a nenhum procedimento (n=5);
- **Grupo Lesão:** foi realizado o esmagamento do nervo isquiático esquerdo (NIE) dos animais (n=20);
- **Grupo Lesão+LBI_n:** foi realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberão tratamento com irradiação LBI na área correspondente à lesão nervosa (n=20);
- **Grupo Lesão+LBI_{mm}:** foi realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberão tratamento com irradiação LBI no músculo tibial anterior esquerdo (TAE) (n=20);
- **Grupo Lesão+LBI_n+LBI_{mm}:** foi realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberão tratamento com irradiação LBI na área correspondente à lesão nervosa e também no músculo TAE (n=20).

Procedimento cirúrgico

O procedimento de esmagamento do nervo isquiático foi realizado conforme descrito por Salgado et al. [20] e Belchior et al. [15]. 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 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.

Os animais foram tricotomizados, posicionados em decúbito ventral 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 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 [10, 15]. 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 observação. 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 [6].

Tratamento com laser em baixa intensidade (TLBI)

O TLBI foi realizado com base nos parâmetros descritos anteriormente por Alves et al. [21] para a irradiação muscular e adaptado de Sousa et al. [18] para a irradiação área de LNP, sendo utilizado o equipamento Twin Laser® (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil). Os parâmetros a serem utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros utilizados para o tratamento com FBM.

Meio ativo	Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)	
Local de irradiação	Muscular	Nervoso
Comprimento de onda	780 nm	780 nm
Área do feixe	0.04cm ²	0.04cm ²
Potência média	40 mW	40 mW
Densidade de potência	1W/cm ²	1W/cm ²
Densidade de energia	10J/cm ²	20J/cm ²
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

Para evitar refração do feixe do laser foi utilizado para aplicação o ângulo de 90 graus entre o emissor e a pele do animal ou entre o emissor e o microtubo. No início e final do procedimento experimental, a potência de emissão de luz do laser foi aferida utilizando o “LaserCheck power meter” (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil).

Nos grupos com irradiação LBI pós LNP o tratamento foi iniciado 2h após a realização da indução da lesão, sendo realizada uma única aplicação diária por 5 dias consecutivos semanalmente em cada grupo experimental até a finalização dos diferentes períodos de análise [22, 21]. Foi utilizada a técnica pontual diretamente sobre a região da incisão, ao redor da área da lesão em quatro pontos, dois acima e dois abaixo da incisão com 1 cm de distância (nos grupos com irradiação na área correspondente à lesão nervosa). Os grupos que receberão a irradiação no músculo tibial anterior, terão a aplicação realizada em 8 pontos, conforme descrito por Alves et al. [21].

Eutanásia

Todos os animais foram eutanasiados com superdose de anestésico 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 análise histológico e os músculos TA foram removidos e pesados para análise da massa muscular.

Avaliação qualitativa e quantitativa dos aspectos morfológicos musculares

As amostras musculares foram também utilizadas para análise morfológica e para este procedimento foram 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 serem avaliados os seguintes aspectos morfológicos: diâmetro das fibras musculares, área de secção transversa (AST), localização do núcleo e número total de vasos.

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) e os dados foram submetidos à análise estatística.

Extração de RNA total

Para este procedimento foram utilizados 80-100mg do músculo gastrocnêmio removido após eutanásia, utilizando para tal procedimento 5 amostras musculares correspondentes a 5 animais de cada grupo. O tecido foi homogeneizado em 1ml do reagente TRIzol (Life Technologies, São Paulo, Brasil), para iniciar o isolamento do RNA total, seguindo as orientações do fabricante. Na sequência, foi realizada a centrifugação das amostras e feita a transferência do sobrenadante para um novo microtubo. Foram adicionados 200µl de clorofórmio para separação das diferentes frações (DNA, RNA e proteína) e transferência da fase aquosa superior contendo o RNA total para um novo microtubo.

Por fim, foram adicionados 500µl de isopropanol para precipitação do RNA total. A ressuspensão do RNA total precipitado foi feita utilizando água livre de RNase e as amostras foram armazenadas a -80° C.

Para verificação do sucesso do procedimento de extração, as amostras de RNA total foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1%. O RNA total foi quantificado por espectrometria em 260nm no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) e todas as amostras foram tratadas com DNase (Life Technologies) para evitar contaminação com DNA genômico. Todas as soluções utilizadas para os procedimentos descritos foram preparadas com água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC (Dietil pirocarbonato) e, além disso, os materiais plásticos e vidraria também receberam tratamento contra RNase.

Síntese de cDNA e PCR quantitativo

O RNA total foi submetido à reação com a enzima transcriptase reversa utilizando o Kit High Capacity (Life Technologies) para a obtenção do cDNA e este foi utilizado para a reação de PCR em tempo real utilizando o “SYBR Green Kit” (Applied Biosystems, EUA). Para este procedimento as amostras foram analisadas em duplicata. O software usado foi o “7500 Fast Real-Time PCR System” (Applied Biosystem, EUA).

Os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) foram usados para a realização deste procedimento, os mesmos estão descritos na tabela 2. Para

normalização dos dados foram utilizados primers para GAPDH e para a comparação entre os dados entre os grupos (controle e tratado), unidades arbitrárias foram calculadas da seguinte forma:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{amostra} - \Delta CT_{controle}$$

$$Unidade\ arbitrária = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Sendo:

CT: *threshold cycle*.

Tabela 2: Lista dos primers utilizados na técnica qPCR.

Gene	Sequência	Nº amplicon	Nº acesso
MyoD	F: 5'-GGAGACATCCTCAAGCGATGC-3'	105	NM_176079.1
	R: 5'-AGCACCTGGTAAATCGGATTG-3'		
Miogenina	F: 5'-ACTACCCACCGTCCATTCAC-3'	233	NM_017115.2
	R: 5'-TCGGGGCACTCACTGTCTCT-3'		
Miostatina	F: 5'-CTACCACGGAAACAATCATT-3'	78	NM_019151.1
	R: 5'-AGCAACATTTGGGCTTTCCAT-3'		
Calcineurina	F: 5'-AGGCGATTGATCCCAAGTTG-3'	58	NM_017041.1
	R: 5'-GGAAATGGAACGGCTTTCAC-3'		
AchR Gama	F: 5'-CCACCAGAAGGTGGTGTCT-3'	91	NM_019145.1
	R: 5'-TGAGGAGATGAGCACACAGG-3'		
AchR Alfa 1	F: 5'-TCCCTTCGATGAGCAGAACT-3'	56	NM_024485.1
	R: 5'-AGCCGTCATAGGTCCAAGTG-3'		
AchR Épsilon	F: 5'-GGCTCAACTTCAGCAAGGAC-3'	70	NM_017194.1
	R: 5'-AGCCATACATGTTTCGGAAGG-3'		
AchR Beta 1	F: 5'-CATCGAGTCTCTCCGTGTCA-3'	88	NM_012528.
	R: 5'-GGCAACGTCAAAGTTTCCAT-3'		
AchR Delta	F: 5'-ACCACCAAGACGTCACCTTC-3'	144	NM_019298.1
	R: 5'-CCGAGGTCTTCTCTCCACAG-3'		
GAPDH	F: 5'-GCATCCTGGGCTACACTGA-3'	162	NM_017008.4
	R: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTA-3'		

Análise dos resultados

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 erro padrão da média se paramétricos, 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

Efeitos da FBM sobre a morfologia muscular

O grupo Controle apresentou núcleos periféricos com as fibras musculares poligonais organizadas por endomísio e perimísio como esperado (figura 1A).

No período após uma semana os grupos lesionados apresentaram diminuição no diâmetro e área de secção transversa, além do aumento no espaço intersticial (figura 1 e tabela 3). O grupo Lesão apresentou uma atrofia progressiva (nos períodos de 1, 2 e 3 semanas) seguido de um aumento no diâmetro das fibras musculares em 4 semanas. Todos os grupos irradiados apresentaram um aumento no diâmetro e na AST em 3 e 4 semanas, além disso, os grupos irradiados no músculo (Lesão+LBlm e Lesão+LBlm) apresentaram um aumento mais antecipado (a partir de 2 semanas) na AST (tabela 2, figuras 2B, 2C, 2D, 3B, 3C e 3D).

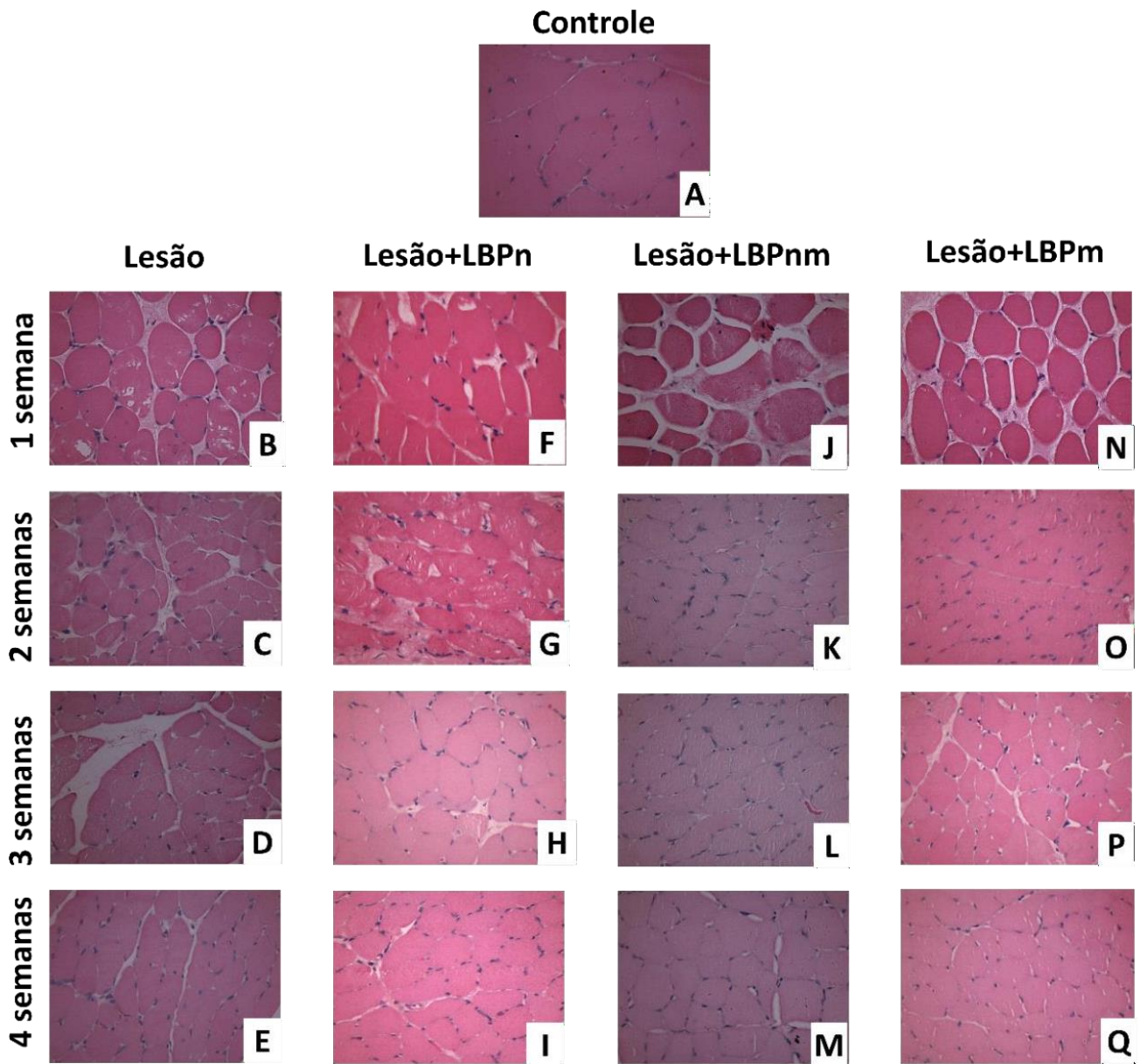


Figura 1: Fotomicrografias dos músculos em cortes transversais corados com hematoxilina e eosina (400X); **(A)** Controle; **(B)** Lesão após 1, **(C)** 2, **(D)** 3 e **(E)** 4 semanas; **(F)** Lesão+LBPn após 1, **(G)** 2, **(H)** 3 e **(I)** 4semanas; **(J)** Lesão+LBPn após 1, **(K)** 2, **(L)** 3 e **(M)** 4 semanas; **(N)** Lesão+LBPn após 1, **(O)** 2, **(P)** 3 e **(Q)** 4 semanas.

Tabela 3: Média e erro padrão da média do diâmetro e área de secção transversa (AST) dos músculos tibial anterior dos ratos Wistar pós lesão nervosa periférica irradiados ou não com LBI na área de lesão nervosa e na área de lesão muscular.

		Diâmetro (μm)	AST (μm^2)
	Grupo Controle	54.93 \pm 1.56	2385.86 \pm 134.90
1 semana	Grupo Lesão	41.54 \pm 2.19	1386.15 \pm 148.63
	Grupo Lesão+LBI	47.48 \pm 1.41	1783.02 \pm 104.24
	Grupo Lesão+LBInm	43.69 \pm 1.74	1518.21 \pm 124.06
	Grupo Lesão+LBIm	46.07 \pm 1.43	1679.52 \pm 104.20
2 semanas	Grupo Lesão	29.58 \pm 1.19	696.28 \pm 52.49
	Grupo Lesão+LBI	34.18 \pm 1.56	932.76 \pm 87.08
	Grupo Lesão+LBInm	35.43 \pm 0.64	988.41 \pm 35.99
	Grupo Lesão+LBIm	37.78 \pm 1.25	1131.03 \pm 76.68
3 semanas	Grupo Lesão	24.15 \pm 1.04	413.04 \pm 63.19
	Grupo Lesão+LBI	35.87 \pm 0.53	1012.45 \pm 29.65
	Grupo Lesão+LBInm	39.84 \pm 0.80	1250.57 \pm 50.02
	Grupo Lesão+LBIm	37.67 \pm 0.63	1117.24 \pm 37.34
4 semanas	Grupo Lesão	34.89 \pm 0.68	958.79 \pm 38.53
	Grupo Lesão+LBI	45.32 \pm 0.88	1618.12 \pm 62.68
	Grupo Lesão+LBInm	43.71 \pm 1.01	1506.79 \pm 68.63
	Grupo Lesão+LBIm	41.76 \pm 1.39	1382.14 \pm 88.97

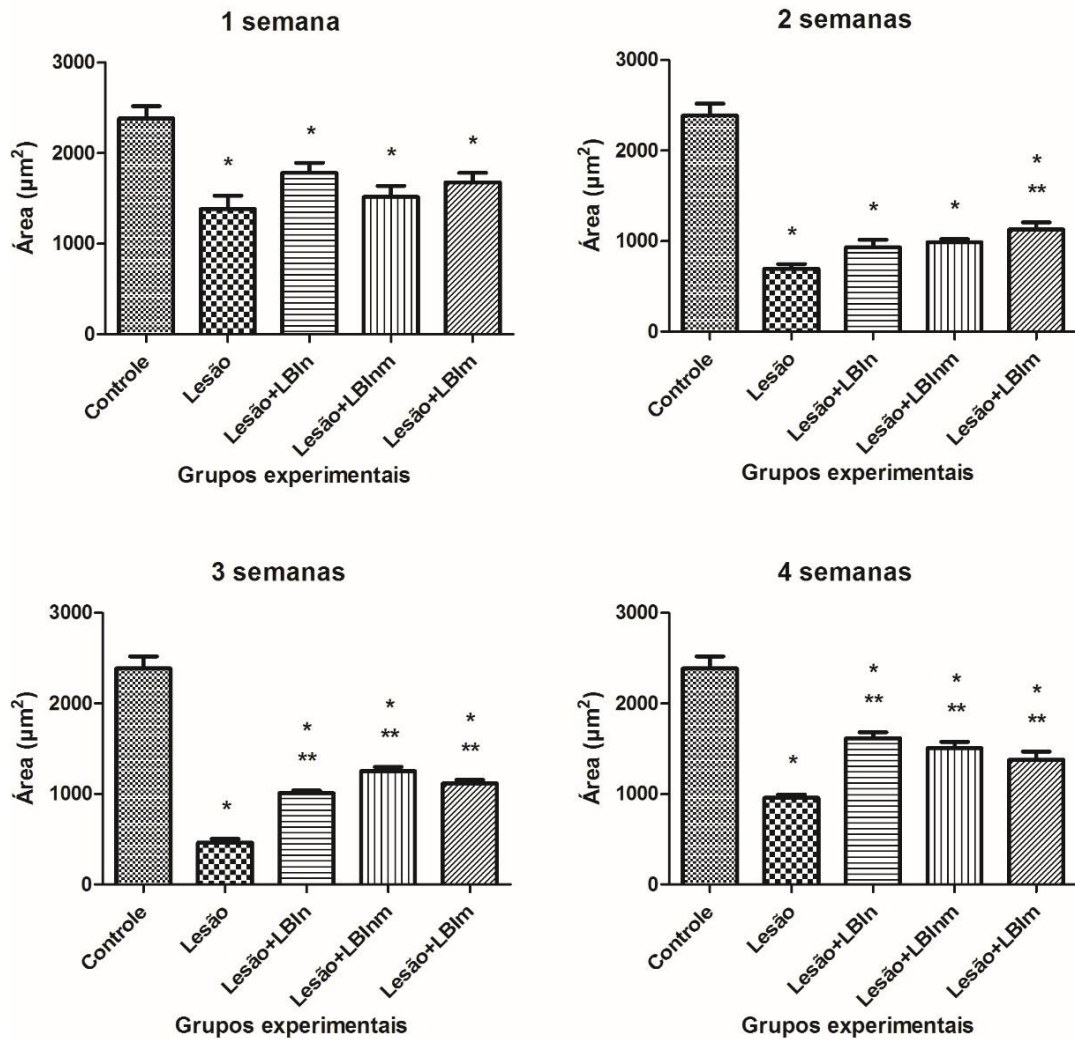


Figura 2: Efeitos da FBM sobre área de secção transversa das fibras musculares de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle, ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Lesão.

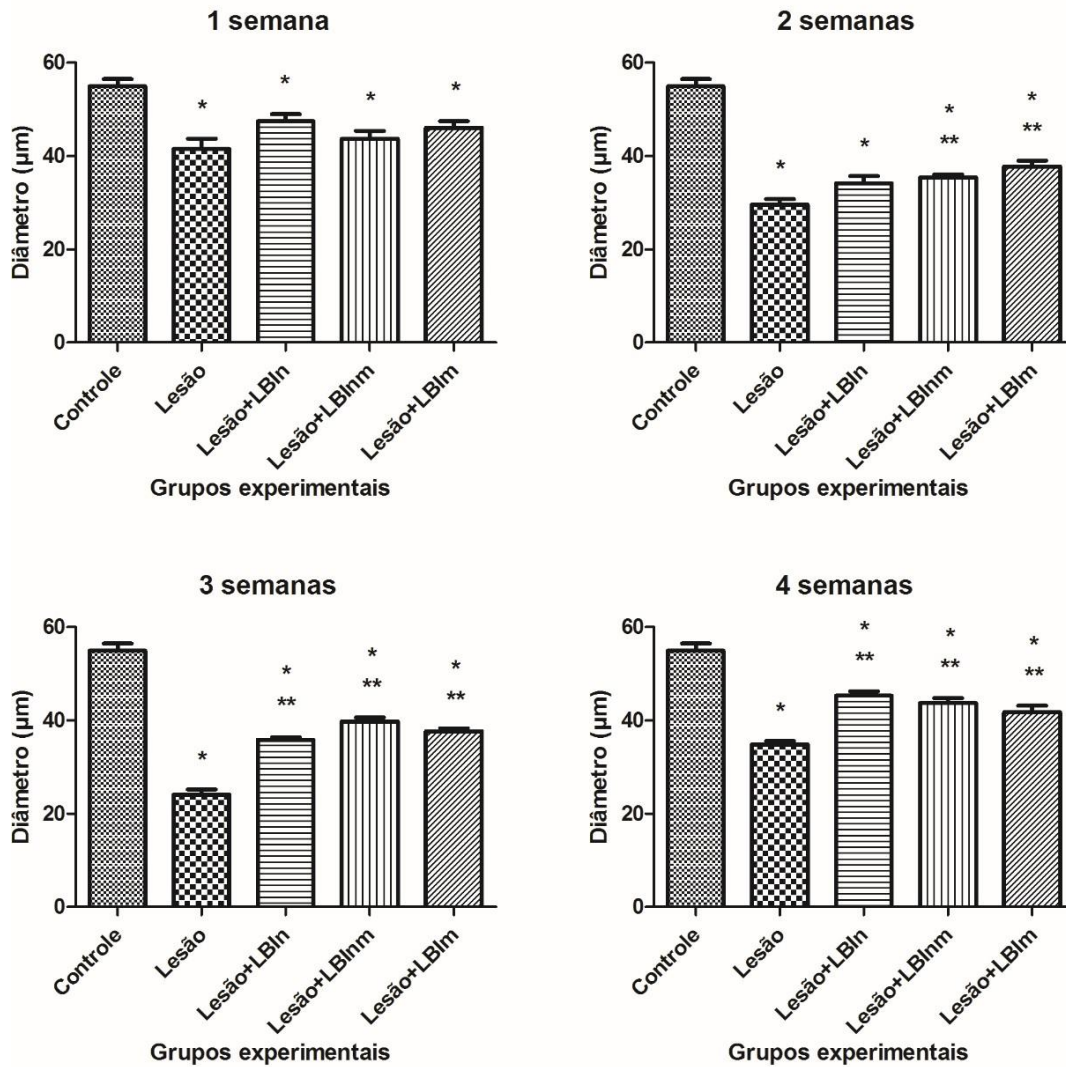


Figura 3: Efeitos da FBM sobre o diâmetro das fibras musculares de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle, ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Lesão.

Efeitos da FBM sobre a expressão gênica

A expressão gênica de calcineurina diminuiu no período experimental de 1 semana (figura 4A) no grupo Lesão+LBlm e Lesão+LBlnm em relação ao grupo Lesão, em 2 semanas não houve diferença entre os grupos experimentais (figura 4B). Entretanto no período de 3 semanas a expressão gênica dos grupos irradiados (Lesão+LBlm, Lesão+LBlnm e Lesão+LBlm) diminuíram em relação ao grupo Lesão que apresentou um aumento na expressão de calcineurina

quando comparado ao grupo Controle (figura 4C). Em 4 semanas a expressão gênica dos grupos experimentais foram semelhantes ao grupo controle, não havendo diferenças estatisticamente significantes (figura 4D).

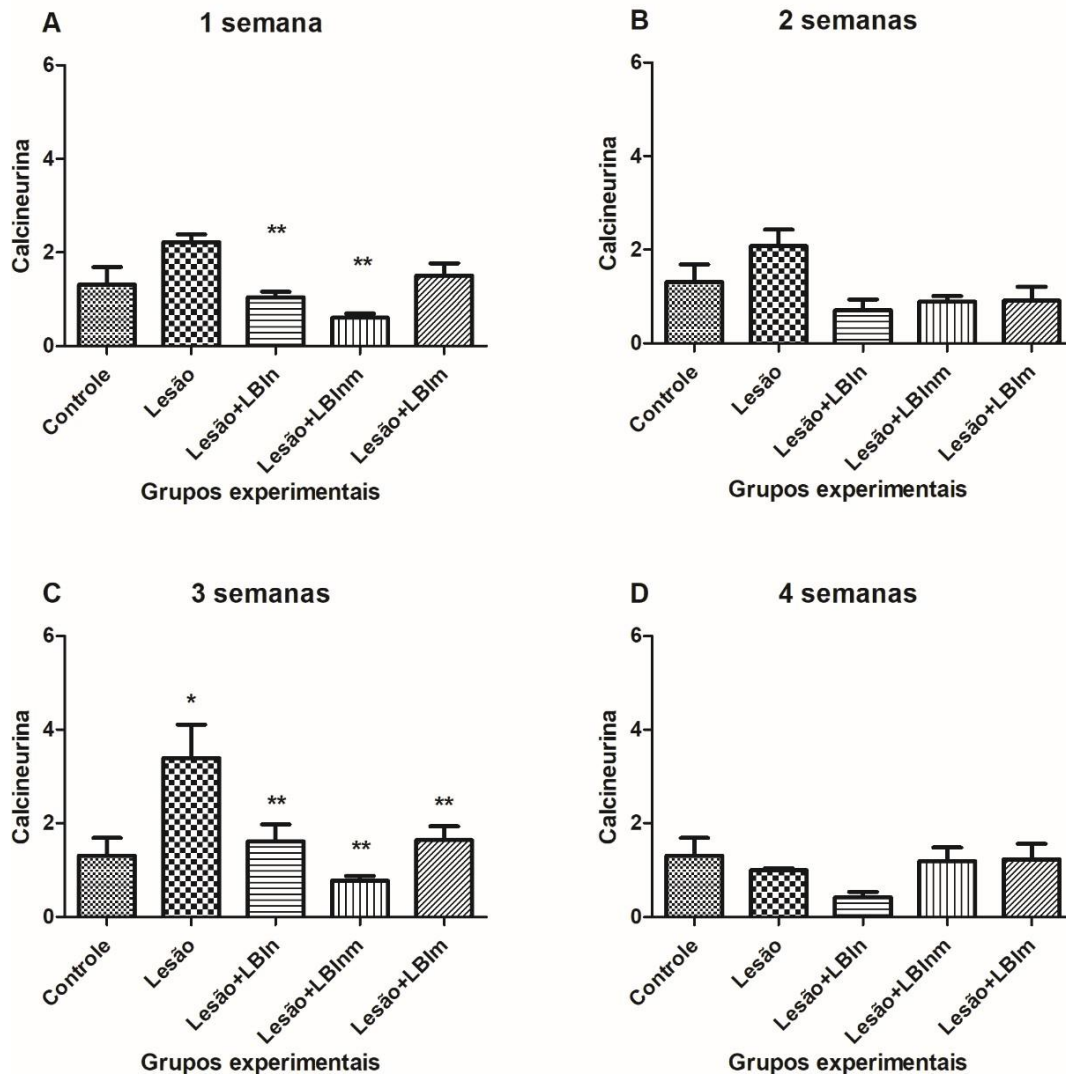


Figura 4: Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de calcineurina no músculo tibial anterior de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle, ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Lesão.

Com relação à expressão gênica de miostatina nos períodos de 1, 2 e 4 semanas (figuras 5A, 5B e 5D respectivamente) não houve diferença estatisticamente significantes intergrupos, porém em 3 semanas o grupo Lesão apresentou um aumento em sua expressão quando comparado ao grupo

Controle e os grupos irradiados na área de lesão nervosa (Lesão+LBI_n e Lesão+LBI_m) apresentaram uma diminuição quando comparados ao grupo Lesão (figura 5C).

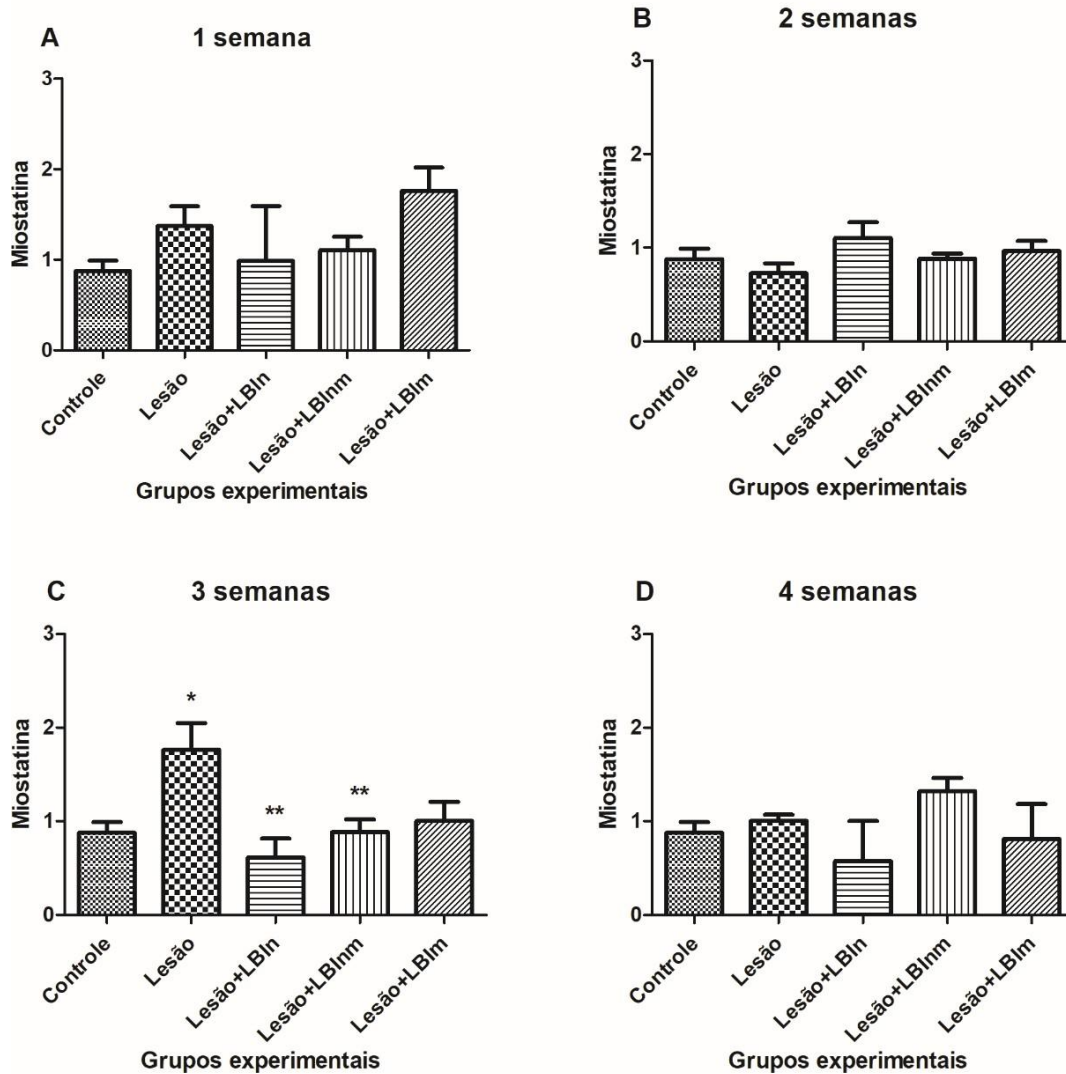


Figura 5: Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de miostatina no músculo tibial anterior de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle, ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Lesão.

No que se refere aos fatores regulatórios miogênicos, a expressão gênica de MyoD não apresentou diferença nos períodos avaliados (figuras 6A, 6B, 6C e 6D). No entanto, a expressão gênica de miogenina diminuiu no grupo

Lesão e Lesão+LBI_m quando comparado ao grupo Controle em 1 semana (figura 7A) e em 2 semanas o grupo Lesão manteve a diminuição em relação ao grupo Controle e os grupos irradiados (Lesão+LBI_n, Lesão+LBI_{nm} e Lesão+LBI_m) apresentaram um aumento em sua expressão gênica quando comparados ao grupo Lesão (figura 7B). Nos períodos de 3 e 4 semanas não houve diferença entre os grupos experimentais (figuras 7C e 7D).

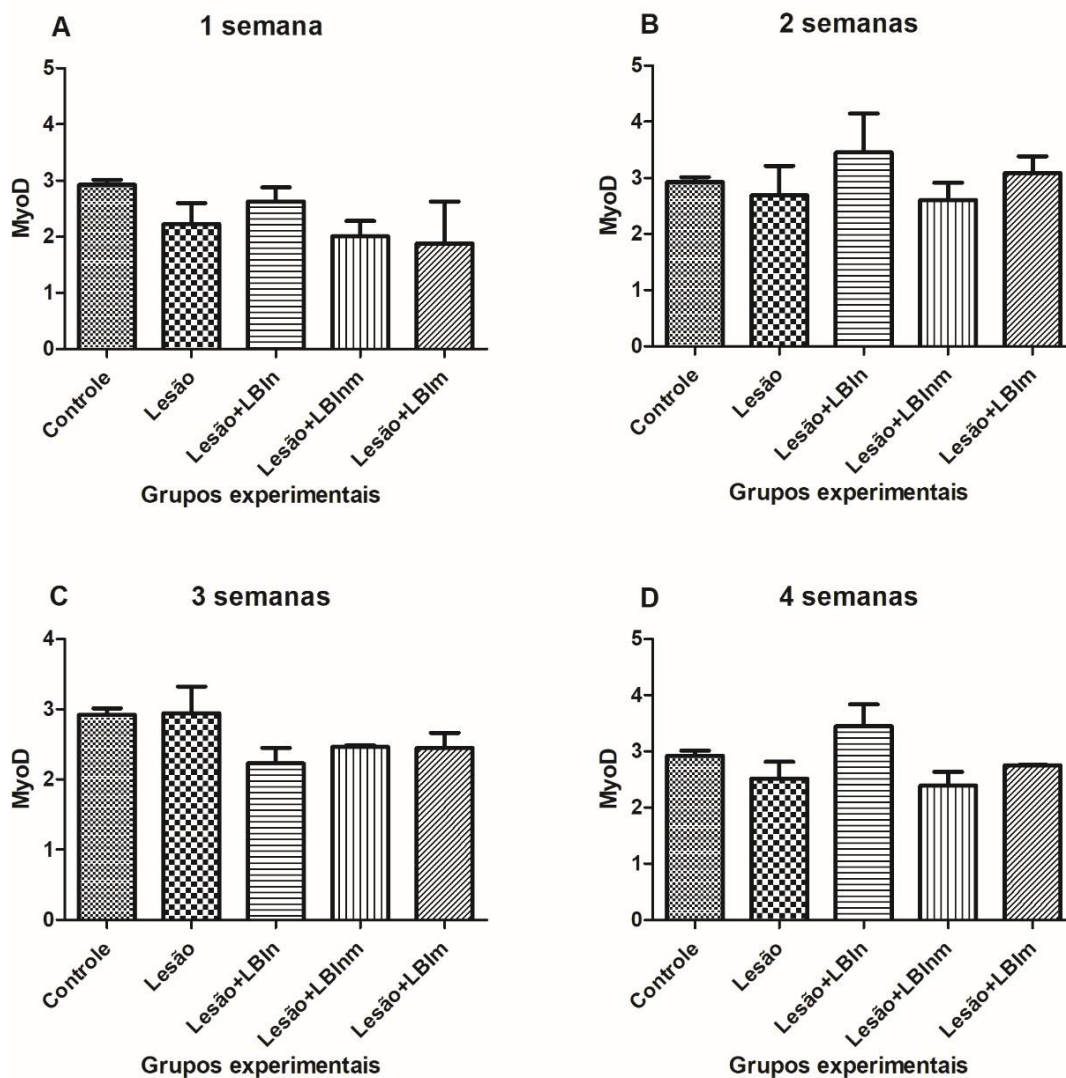


Figura 6: Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de MyoD no músculo tibial anterior de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D).

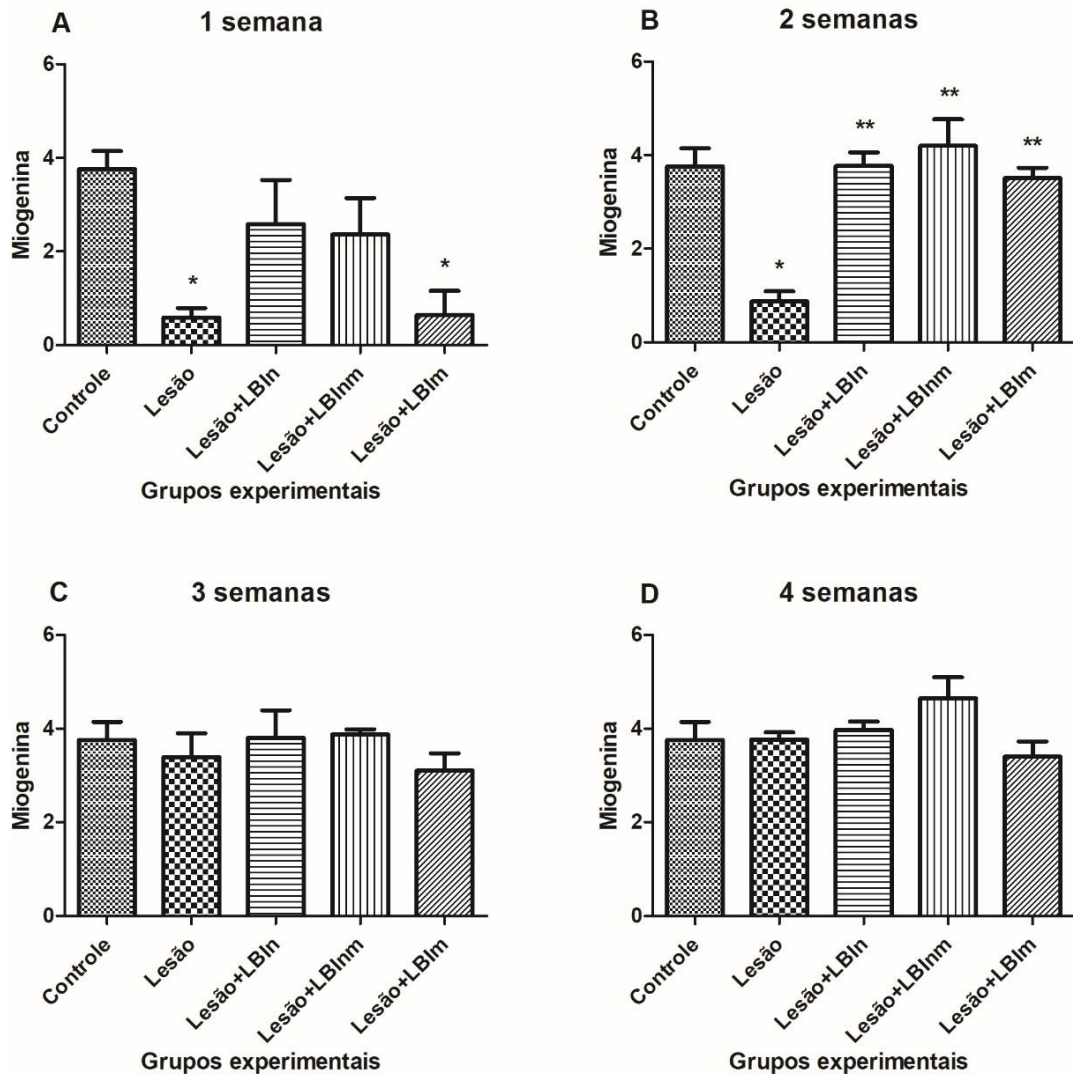


Figura 7: Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de miogenina no músculo tibial anterior de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle, ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Lesão.

No que concerne aos receptores nicotínicos de acetilcolina a subunidade α -nAChR não apresentou modulações em sua expressão gênica (figura 8A, 8B, 8C e 8D). Entretanto, as outras subunidades apresentaram alteração. O β -nAChR apresentou uma diminuição no grupo Lesão, Lesão+LBInm e Lesão+LBIm em 1 semana quando comparado ao grupo Controle (figura 9A). Em 2 semanas os grupos Lesão e Lesão+LBIm apresentaram uma diminuição na expressão gênica quando comparado ao grupo Controle e os grupos

irradiados na área de lesão nervosa (Lesão+LBlm e Lesão+LBlm) apresentaram um aumento em relação ao grupo Lesão (figura 9B). Em 3 e 4 semanas não houve diferença entre os grupos experimentais (figuras 9C e 9D). Com relação à δ -nAChR no período de 1 semana os grupos Lesão e Lesão+LBlm apresentaram uma diminuição quando comparados ao grupo Controle (figura 10A) e no período de 2 e 3 semanas o grupo Lesão apresentou uma diminuição quando comparado ao grupo Controle (figuras 10B e 10C). Não houve diferença entre os grupos no período de 4 semanas (figura 10D).

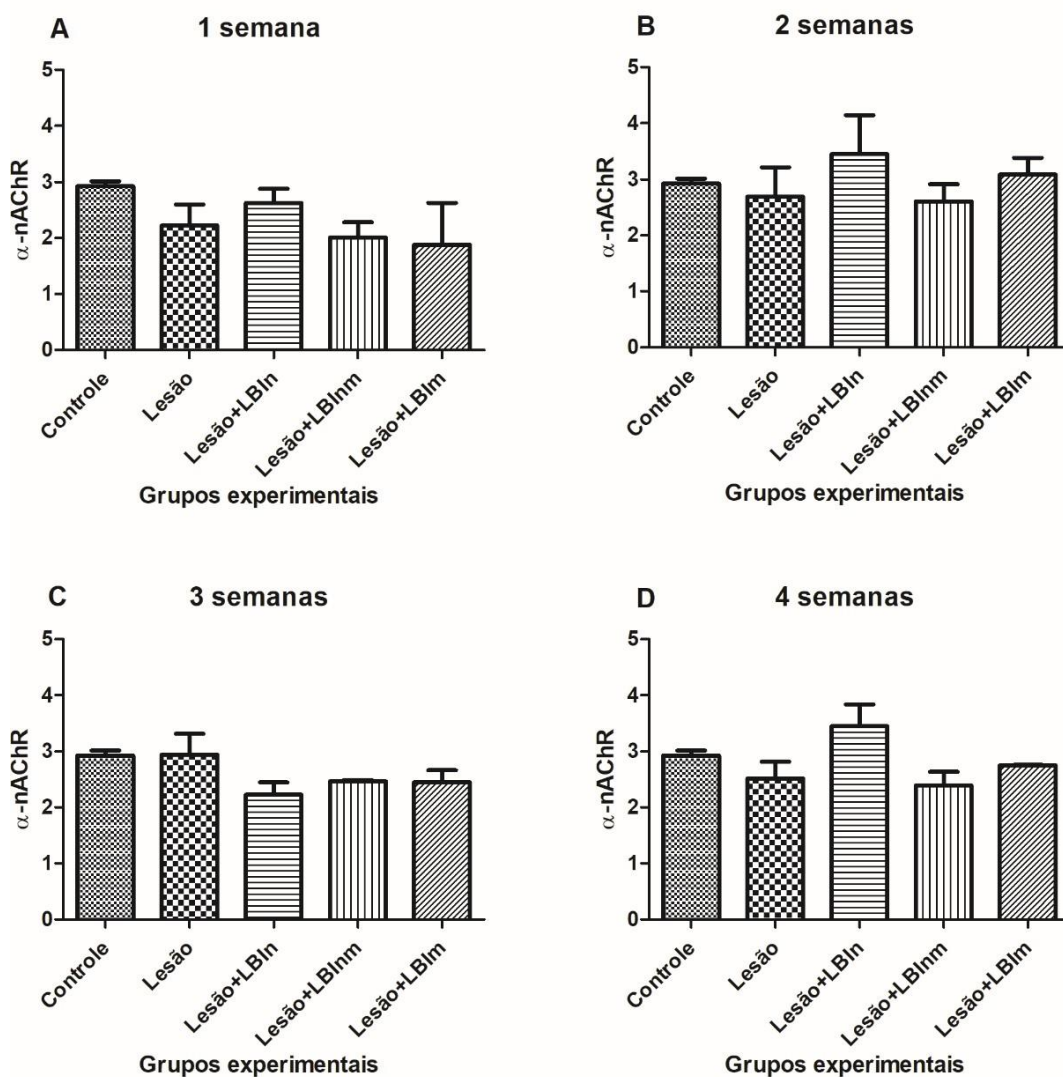


Figura 8: Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de α -nAChR no músculo tibial anterior de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D).

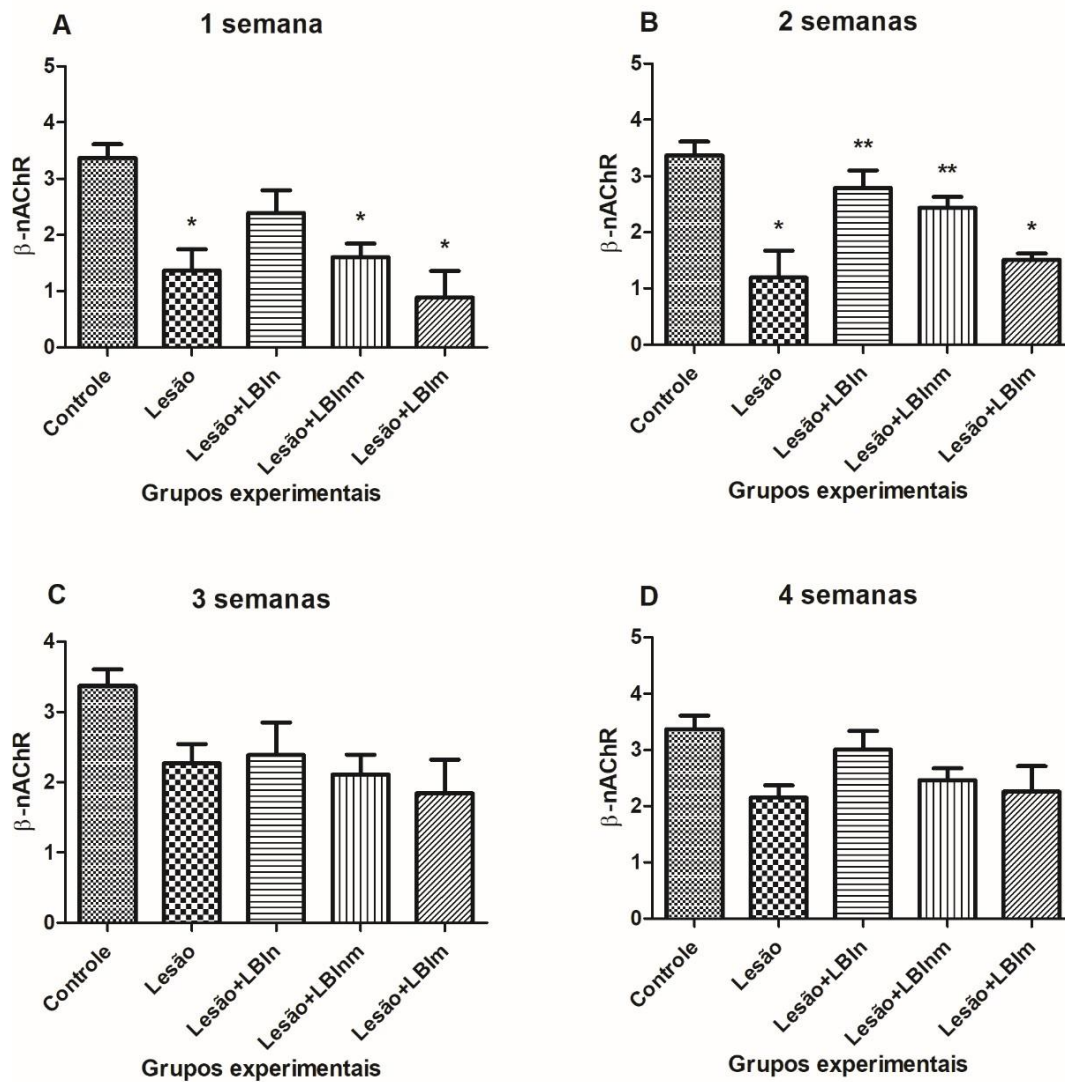


Figura 9: Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de β -nAChR no músculo tibial anterior de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle, ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Lesão.

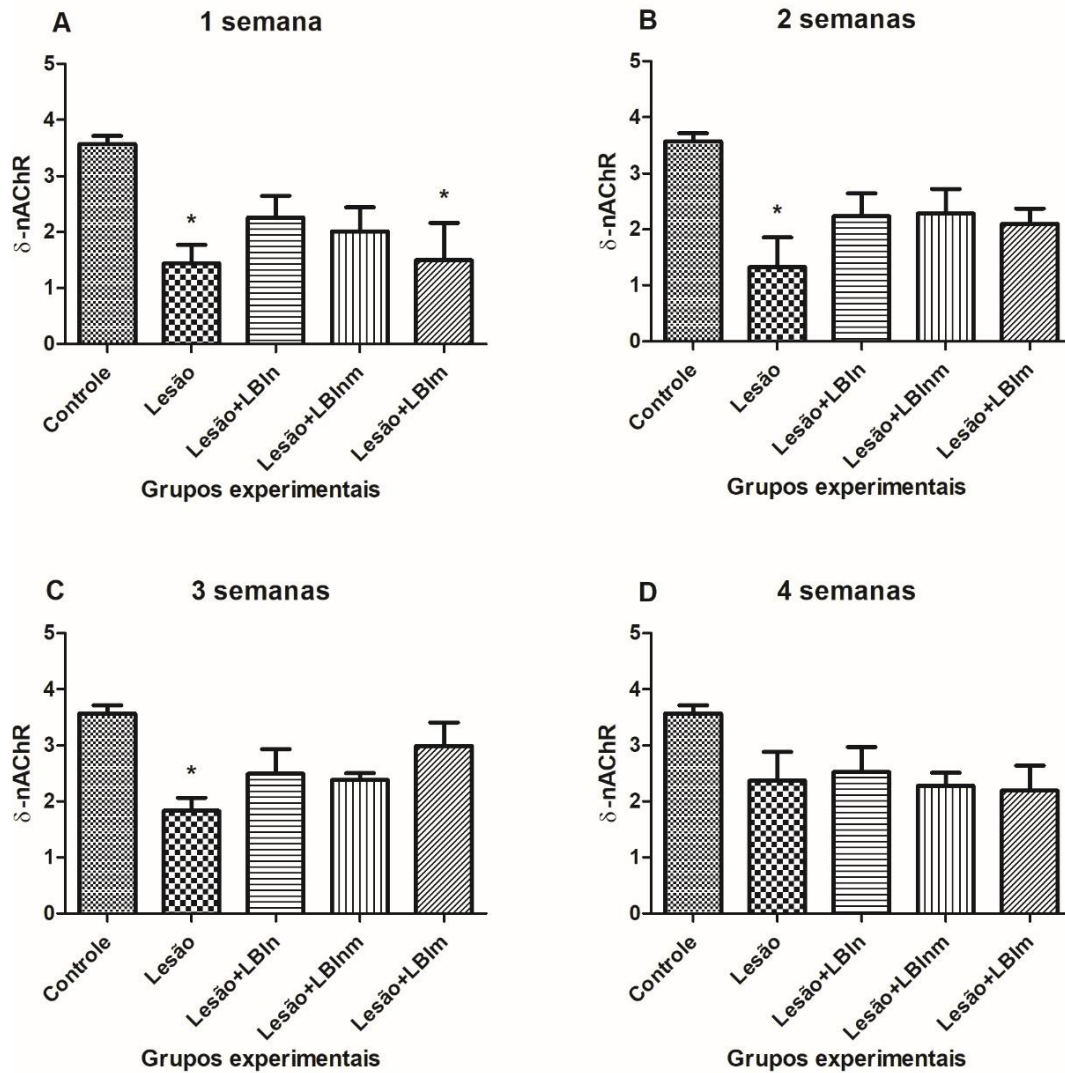


Figura 10: Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de δ -nAChR no músculo tibial anterior de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle.

As subunidades γ -nAChR apresentaram uma diminuição na expressão gênica em todos os grupos lesionados (Lesão, Lesão+LBIn, Lesão+LBInm e Lesão+LBIm) quando comparados ao grupo Controle em todos os períodos experimentais (figuras 11A, 11B, 11C e 11D). A expressão gênica de ϵ -nAChR diminuiu em 1 semana nos grupos lesionados (Lesão, Lesão+LBIn, Lesão+LBInm e Lesão+LBIm) em relação ao grupo Controle (figura 12A), diferente dos períodos de 2, 3 e 4 semanas, no qual os grupos Lesão e Lesão+LBIm

mantiveram a diminuição quando comparados ao grupo Controle (figuras 12B, 12C e 12D).

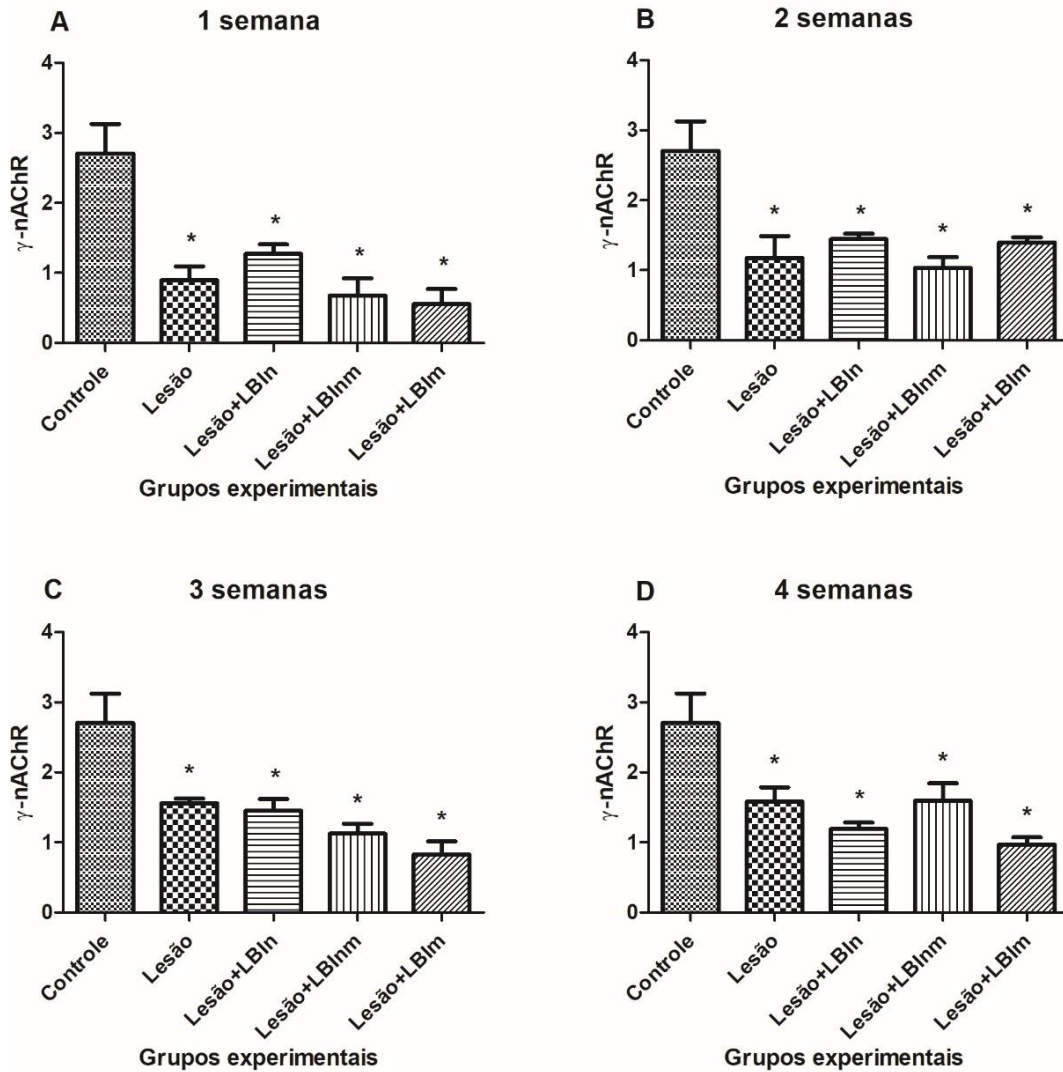


Figura 11: Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de γ -nAChR no músculo tibial anterior de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle.

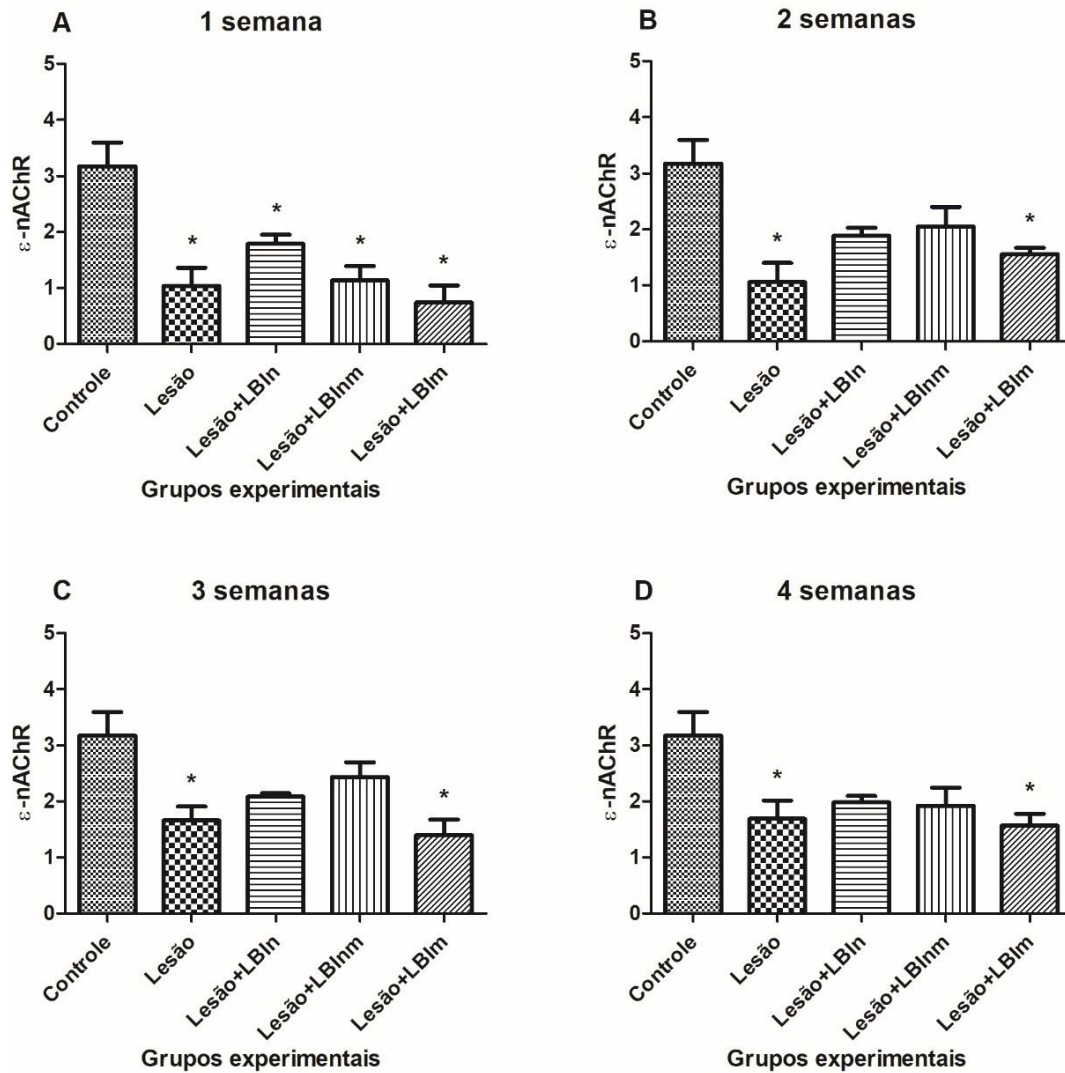


Figura 12: Efeitos da FBM sobre a expressão gênica de ϵ -nAChR no músculo tibial anterior de ratos Wistar pós esmagamento do nervo isquiático após 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 semanas (D). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle.

DISCUSSÃO

Cerca de 100.000 pacientes são submetidos a operações decorrentes de LNP devido aos avanços em microcirurgia, porém há necessidade de maiores investigações acerca das terapêuticas com finalidade de otimizar o processo de reparo deste tecido [23,24];

No presente estudo os músculos lesionados apresentaram uma diminuição na área de secção transversa e no diâmetro das fibras musculares acompanhado de um aumento no espaço intersticial e fibras anguladas,

caracterizando alterações morfológicas pós lesão nervosa periférica. Foi possível que através da TLBI houve uma aceleração da recuperação funcional, uma vez que o processo de recuperação acontece de maneira mais lenta e que pode gerar sequelas, sendo o tempo de recuperação funcional iniciando após 12 dias em uma axonotmese e em uma neurotmese em 30 dias [25].

No estudo realizado por Mandelbaum-Livnat et al. [26] foi administrado laser (780 nm, 250 mW, 11 cm acima da pele) em três locais de irradiação, sendo esta na área de lesão nervosa, no segmento correspondente da medula espinal e no músculo desnervado (gastrocnêmio) pós axonotmese por esmagamento do nervo isquiático em ratos Wistar. O estudo realizou uma comparação de duas doses de energia total, sendo estas 45 J e 105 J, administradas em 3 e 7 minutos respectivamente, tendo o grupo com a irradiação mais longa apresentado uma aceleração no tempo de recuperação, aumento do diâmetro axonal e diminuição da atrofia muscular [26], corroborando com os resultados obtidos no presente estudo acerca dos aspectos morfológicos musculares.

Wu et al. [27] demonstraram que há uma correlação entre a concentração de folistatina e a massa do músculo gastrocnêmio de ratos Sprague-Dawley pós LNP por esmagamento do nervo isquiático. A folistatina antagoniza a função de vários membros de proteínas da família TGF- β , sendo a miostatina uma dessas proteínas. Em condições fisiológicas, a miostatina controla o crescimento muscular através da regulação de FRMs [27]. Em um processo agudo de LNP há um aumento no nível de miostatina muscular [7], porém, nos grupos experimentais irradiados a expressão gênica de miostatina apresentou um aumento em 3 semanas somente no grupo Lesão, havendo uma diminuição nos grupos irradiados na área correspondente à lesão nervosa (Lesão+LBI_n e Lesão+LBI_{nm}), sendo este um efeito positivo fotobiomodulatório da regulação negativa de miostatina.

Com relação aos FRMs, a expressão gênica de miogenina diminuiu em 1 semana nos grupos Lesão e Lesão+LBI_{nm} quando comparados ao grupo Controle, demonstrando que a irradiação na área de lesão nervosa (Lesão+LBI_n e Lesão+LBI_{nm}) houve uma modulação positiva nesta expressão, sendo mais acentuada no período seguinte (2 semanas). No estudo publicado por Nishimoto et al. [28] foi demonstrado que há outras maneiras de influenciar na expressão

gênica de FRM no músculo esquelético pós LNP, sendo realizado a aplicação de CO₂ transcutânea pós lesão por esmagamento do nervo isquiático em ratos Sprague-Dawley, no qual houve um aumento da expressão gênica de mRNA de MyoD e miogenina em 2 semanas pós lesão quando comparado ao grupo Controle. Assim como demonstrado por Xing et al. [29] em que a estimulação elétrica no músculo gastrocnêmios de ratos Sprague-Dawley pós LNP por esmagamento do nervo isquiático aumentou o número de células com núcleo positivo para marcação de MyoD por imunofluorescência e também a um aumento na diferenciação de células satélites correlacionado com a preservação da função muscular em resposta a estimulação elétrica pós LNP.

Relativo aos nAChR Rochkind e Shainberg [30] demonstraram um aumento na sua concentração proteica por 30-60 dias em ratos Wistar irradiados com LBI (632.8 nm, 35 mW, 30 min, 14 dias consecutivos) pós desnervação completa por remoção de 10 mm do nervo isquiático demonstrando que o efeito do LBI gera uma preservação dos receptores por um longo prazo. No presente estudo não houve alteração na expressão gênica de α -nAChR, porém as subunidades β -nAChR e δ -nAChR demonstraram que a eficácia da preservação da expressão gênica em níveis semelhantes ao grupo Controle deveria ser realizada na área de lesão nervosa, sugerido pelos resultados de 2 e 3 semanas. A expressão gênica da subunidade γ -nAChR diminuiu em todos os grupos lesionados (Lesão, Lesão+LBI_n, Lesão+LBI_{nm} e Lesão+LBI_m), enquanto a subunidade ϵ -nAChR apresentou uma diminuição nos mesmos grupos no período de 1 semana e nos demais períodos uma diminuição somente nos grupos não irradiados na área do nervo isquiático (Lesão e Lesão+LBI_m) sugerindo que a irradiação na área de lesão nervosa tende a apresentar uma maior preservação desta subunidade. Kang et al. [30] demonstraram que as células de Schwann (CS) presentes na JNM influenciam no padrão de ramificação do axônio terminal e na redistribuição dos axônios regenerativos que são redirecionados aos nAChR nas junções neuromusculares já existentes, demonstrando a necessidade de maiores investigações com objetivo de verificar a influência da fotobiomodulação sobre as alterações morfológicas na placa motora e sobre o fenótipo das CS presentes nesta estrutura e ao longo do trajeto axonal.

Ensaio in vitro sobre os efeitos da FBM são escassos, há necessidade da avaliação dos mecanismos de ação dos efeitos da FBM, uma vez que há diversos estudos evidenciando os efeitos sobre modelos experimentais [32]. A compreensão destes mecanismos permitiria a criação de protocolos que otimizariam o processo de reparo.

CONCLUSÃO

A FBM demonstrou uma melhora na morfologia muscular principalmente nas 3 e 4 semanas quando administrada tanto na área muscular quanto nervosa, além de modular a expressão gênica desde um período mais agudo até o mais tardio avaliado, sendo para este parâmetro a irradiação mais indicada se realizada na área nervosa por apresentarem resultados mais positivos, como a diminuição da expressão gênica de calcineurina e miostatina no período de 3 semanas e o aumento na expressão gênica de miogenina, β -nAChR, δ -nAChR e ϵ -nAChR em relação a irradiação administrada isoladamente no músculo afetado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil.* 2008; 87(5):381-5.
2. Eser F, Aktekin LA, Bodur H, Atan Ç. Etiological factors of traumatic peripheral nerves injuries. *Neurol India.* 2009; 57(4):434-7.
3. Seddon, HJ. *Surgical disorders of the peripheral nerves*, 1975. Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh 2ªed.
4. Rochkind S, Geuna S, Shainberg A. Phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration. *International Review of Neurobiology*, 2009; 87:445-64.
5. 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.
6. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Medical Hypotheses*, 2007; 69:310-21.

7. 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.
8. McCroskery R, Thomas M, Maxwell L, Sharma L, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol*, 2003; 162(6):1135-47.
9. Adams L, Carlson BM, Henderson L, Goldman D. Adaptation of nicotinic acetylcholine receptor, myogenin and MRF4 gene expression to long-term muscle denervation. *J Cell Biol*, 1995; 131:1341-9.
10. Wu P, Chawla A, Spinner RJ, Yu C, Yaszemski MJ, Windebank AJ, Wang H. Key changes in denervated muscles and their impact on regeneration and reinnervation. *Neural Regeneration Research*, 2014; 9(20):1796-1809.
11. Wang Z-Z, Washabaugh CH, Yao Y, Wang J-M, Zhang L, Ontell MP, Watkins SC, Rudnicki MA, Ontell M. Aberrant Development of Motor Axons and Neuromuscular Synapses in MyoD-Null Mice. *The Journal of Neuroscience*, 2003;23(12):5161-9.
12. Ruff RL. Neurophysiology of the neuromuscular junction: Overview. *Ann N Y Acad Sci*, 2003;998:1-10.
13. Passarella S, Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2014; 140:344-58.
14. Karu T. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 2008; 84:1091-9.
15. 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.
16. Takhtfooladi MA, Jahanbakhsh F, Takhtfooladi HA, Yousefi K, Allahverdi A. Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm²) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci*, 2015; 30:1047-52.
17. Barbosa RI, Marcolino AM, Guirro RRJ, Mazzer N, Barbieri CH, Fonseca MCR. Comparative effects of wavelengths of low-power laser in

- regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci*, 2010; 25: 423-430.
18. Sousa FFA, Andraus RAC, Barbieri CH, Mazzer N. Influence of laser radiation in nerve regeneration in different treatments sites. *Acta Ortop Bras*, 2009; 17(6): 331-5.
 19. Wang C-Z, Chen Y-J, Wang Y-H, Yeh M-L, Huang M-H, Ho M-L, Liang J-I, Chen C-H. Low-Level Laser Irradiation Improves Functional Recovery and Nerve Regeneration in Sciatic Nerve Crush Rat Injury Model. *PLoS ONE*, 2014; 9(8):e103348.
 20. Salgado ASI, Alves ACA, Kerppers I, Gomes MHT, Barreto AB, Martins FL, Júnior NSF, Oliveira CS, Oliveira LVF, Zângaro RA, Carvalho PTC. Comparative analysis of stulated sciatic nerve regeneration by ultrasound and therapeutic low-level laser therapy. *Clin Exp Med Lett*, 2011; 52(3-4):103-7.
 21. Alves AN, Fernandes KPS, Melo CA, Yamaguchi RY, França CM, Teixeira DF, Bussadori SK, Nunes FD, Mesquit-Ferrari RA. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci* 2014; 29(2):813-21.
 22. 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.
 23. Albornoz PM, Delgado PJ, Forriol F, Maffulli N. Non-surgical therapies for peripheral nerve injury. *Br Med Bull*, 2011; 100:73-100.
 24. Andreo L, Soldera CB, Ribeiro BG, de Matos PRV, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA. Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury. *Lasers in Med Sci*, 2017; 32:2155-65.
 25. Tos P, Ronchi G, Papalia I, Sallen V, Legagneus J, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Chapter 4: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part I—experimental models. *Int Rev Neurobiol*, 2009; 87:47–79

26. Mandelbaum-Livnat MM, Almog M, Nissan M, Loeb E, Shapira Y, Rochkind S. Photobiomodulation Triple Treatment in Peripheral Nerve Injury: Nerve and Muscle Response. *Photomed Laser Surg*, 2016; 34(12):638-45
27. Wu RH, Wang P, Yang L, Li Y, Liu M. A potential indicator of denervated muscle atrophy: the ratio of myostatin to follistatin in peripheral blood. *Genet Mol Res*, 2011; 10 (4): 3914-23.
28. Nishimoto H, Inui A, Ueha T, Inoue M, Akahane S, Harada R, Mifune Y, Kobuku T, Nishida K, Kuroda R, Sakai Y. Transcutaneous carbon dioxide application with hydrogel prevents muscle atrophy in a rat sciatic nerve crush model. *J Orthop Res*, 2018; 36(6):1653-58.
29. Xing H, Zhou M, Assinck P, Liu N. Electrical stimulation influences satellite cell differentiation after sciatic nerve crush injury in rats. *Muscle & Nerve*; 2015; 51(3):400-11.
30. Rochkind S, Shainberg A. Protective Effect of Laser Phototherapy on Acetylcholine Receptors and Creatine Kinase Activity in Denervated Muscle. *Photomed Laser Surg*, 2016; 31(10):499-504.
31. Kang H, Tian L, Mikeshi M, Lichtmann JW, Thompson WJ. Terminal Schwann Cells Participate in Neuromuscular Synapse Remodeling during Reinnervation following Nerve Injury. *The J Neurosci*, 2014; 34(18):6323–33.
32. Andreo L, Soldera CB, Ribeiro BG, de Matos PRV, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA. Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury. *Lasers in Med Sci*, 2017; 32:2155-65.

5. DISCUSSÃO

As LNP são mais frequentes que as lesões medulares, podendo ser uma lesão incapacitante de acordo com o tipo de lesão e grau de acometimento. Anualmente nos Estados Unidos da América e na Europa, aproximadamente 100.000 pessoas são submetidas a operações com objetivo de recuperação nervosa periférica, havendo um avanço tecnológico na área de microcirurgia. Porém, sem uma recuperação funcional satisfatória, demonstrando a necessidade de maior investigação do processo de reparo neste tecido (Albornoz et al. 2011).

Atualmente, há diversos tratamentos cirúrgicos, como a neurorrafia (Anders et al. 2014), enxertia (Moges et al. 2011) e a tubulização (Shen et al. 2013). Além da cirurgia, há outros tipos de terapia, como o LBI (Anders et al. 2014), eletroterapia e ultrassom terapêutico, que são estímulos físicos com objetivo de modular a reinervação (Kim et al. 2013), além das terapias biológicas, como inoculação celular e de fatores de crescimento na região lesionada (Pan et al. 2006; Askari et al. 2015).

A FBM tem demonstrado potencial terapêutico em situações de LNP como o aumento da funcionalidade motora e atividade muscular (Rochkind et al. 2012) em pacientes tratados com LBI infravermelho (780 nm, 250 mW) quando comparados ao grupo placebo, demonstrando os efeitos positivos da FBM neste tipo de lesão. Há relatos sobre os efeitos da FBM sobre o tecido muscular durante o processo de reparo após diferentes modelos experimentais de LNP, porém os efeitos variam de acordo com os parâmetros utilizados, sendo necessário a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste processo.

Foi realizado uma pesquisa bibliográfica com a finalidade de investigar os efeitos do LBI para que pudéssemos padronizar um protocolo de irradiação de maneira a investigar de maneira comparativa os efeitos da irradiação isolada ou combinada na área de lesão nervosa e/ou muscular. Nesta revisão foi possível verificar a viabilidade do LBI sobre o processo de reparo pós LNP, tanto do laser vermelho quanto infravermelho, tendo a maioria dos estudos utilizado uma potência de até 50 mW e energia total de até 15 J aplicado em múltiplos

pontos, sendo isto importante para a padronização de um protocolo de irradiação.

Os estudos *in vitro* foram conduzidos para comparação de doses de energia diferentes e de comprimentos de onda diferentes, sendo estes conduzidos utilizando CS da linhagem ST88-14 por serem células essenciais ao processo de reparo nervoso. Especificamente, este tipo celular é viável para a investigação da ação das células da glia no tecido nervoso periférico na defesa do hospedeiro em processos infecciosos, doenças degenerativas e neoplasias (Baetas-da-Cruz et al. 2009) e demonstrou ser viável para a investigação da modulação do LBI nas CS. Demonstrando uma resposta ao estímulo, através do aumento na atividade metabólica analisado pelo método de MTT, além de um aumento de células mitóticas na análise do ciclo celular, sem induzir a necrose ou apoptose de CS e aumentando a expressão gênica dos fatores neurotróficos BDNF e NGF.

Os efeitos do LBI no tecido muscular durante o processo de reparo após diversos tipos de lesão estão bem descritos na literatura e estes incluem melhor remodelamento de colágeno, modulação da expressão gênica de fatores regulatórios miogênicos, aumento no número de fibras jovens e angiogênese (Alves et al. 2014; Ribeiro et al. 2015) e diminuição da concentração tecidual de citocinas pró-inflamatórias (Almeida et al. 2013). No entanto, há efeitos variados de acordo com os diferentes parâmetros de aplicação, como por exemplo, aumento de funcionalidade (Hsieh et al. 2012), atenuação da disestesia (Masoumpoor et al. 2014) e atenuação da progressão da atrofia (Shen et al. 2013), corroborando com os achados dos ensaios *in vivo* que investigaram a funcionalidade de pós LNP.

Além disso, a FBM promove efeitos positivos sobre a morfologia muscular pós LNP, como um aumento no diâmetro das fibras e área de secção transversa, sendo estes fatores mediados pelos fatores regulatórios miogênicos, como miogenina que apresentou um aumento nos grupos irradiados e uma diminuição de calcineurina e miostatina. Além de uma modulação positiva nas subunidades dos receptores nicotínicos de acetilcolina nos animais irradiados.

Estes resultados sugerem um protocolo de irradiação na área de lesão nervosa e nos músculos afetados, os resultados permitem concluir que a

irradiação no local de lesão nervosa promove uma melhora nos parâmetros funcionais e diminuição do tempo de reparo, sendo estes fatores mediados pelas proteínas que influenciam no fenótipo de fibras musculares e pelos fatores regulatórios miogênicos, além de uma modulação nos receptores nicotínicos de acetilcolina; a irradiação no músculo irradiado pela fibra lesionada influencia positivamente os distúrbios de sensibilidade que acompanhariam uma LNP.

Estudos futuros podem ser realizados com a finalidade de investigar as alterações nas cadeias de miosina musculares e na morfologia da placa motora, além da expressão gênica e marcadores celulares de CS nos nervos isquiáticos irradiados pós LNP.

6. CONCLUSÃO

O levantamento dos parâmetros de irradiação é importante para a padronização de um protocolo com objetivo de evidenciar os efeitos do LBI na regeneração pós LNP, e com isso, investigar maiores efeitos a respeito de um determinado espectro e energia. A partir da revisão foi possível demonstrar os efeitos positivos sobre o reparo neuromuscular através do uso do LBI vermelho e do infravermelho, havendo melhora nos índices funcionais, nos aspectos morfológicos e na expressão de citocinas e fatores de crescimento. A maioria dos estudos utilizou uma potência de até 50 mW e energia total de até 15 J aplicado no modo de múltiplos pontos.

A partir da cultura de CS, foi possível verificar que a FBM pode aumentar a atividade metabólica e mitose sem alterar a viabilidade celular, apresentando melhores resultados sobre a migração celular quando realizada com laser infravermelho.

Além disso, a FBM promoveu uma melhora dos aspectos funcionais avaliados no presente estudo no que se refere a análise de marcha, sensibilidade mecânica e massa muscular, com melhores resultados nos aspectos motores e de massa muscular quando administrada na área de lesão nervosa em 1 e 2 semanas e melhores resultados no aspecto sensitivo quando administrado na área de lesão muscular em 2 semanas. Além de um aumento no diâmetro das fibras musculares e área de secção transversa principalmente nas 3 e 4 semanas quando administrada tanto na área muscular quanto nervosa, além de modular a expressão gênica desde um período mais agudo até o mais tardio avaliado, sendo para este parâmetro a irradiação mais indicada se realizada na área nervosa por apresentarem resultados mais positivos, como a diminuição da expressão gênica de calcineurina e miostatina no período de 3 semanas e o aumento na expressão gênica de miogenina, β -nAChR, δ -nAChR e ϵ -nAChR em relação a irradiação administrada isoladamente no músculo afetado.

Portanto, o método de irradiação combinada, sendo administrado tanto na área de lesão nervosa quanto no músculo afetado foi o melhor, sendo indicado em protocolos futuros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams L, Carlson BM, Henderson L, Goldman D. Adaptation of nicotinic acetylcholine receptor, myogenin and MRF4 gene expression to long-term muscle denervation. *J Cell Biol*, 1995; 131:1341-9.

Akgul T, Gulsoy M, Gulcur HO. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. *Lasers Med Sci*, 2014; 29:351-7.

Albornoz PM, Delgado PJ, Forriol F, Maffulli N. Non-surgical therapies for peripheral nerve injury. *Br Med Bull*, 2011; 100: 73-100.

Alcântara CC, Gigo-Benato D, Salvini TF, Oliveira AL, Anders JJ, Russo TL. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute neural recovery and inflammation-related gene expression after crush injury in rat sciatic nerve. *Lasers Surg. Med.* 2013; 45(4):246-52.

Almeida P, Tomazini SS, Frigo L, Carvalho PTC, Vanin AA, Santos LA, Albuquerque-Pontes GM, Marchi TD, Tairova O, Marcos RL, Lopes-Martins RAB, Leal-Junior ECP. What is the best treatment to decrease pro-inflammatory cytokine release in acute skeletal muscle injury induced by trauma in rats: low-level laser therapy, diclofenac or cryotherapy? *Lasers Med Sci*, 2013; 29:653-8.

Alves AN, Fernandes KPS, Deana AM, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Effects of low-level laser therapy on skeletal muscle repair: a systematic review. *Am J Phys Med Rehabil* 2014;93:1073-1085.

Alves AN, Fernandes KPS, Melo CA, Yamaguchi RY, França CM, Teixeira DF, Bussadori SK, Nunes FD, Mesquit-Ferrari RA. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci* 2014; 29(2):813-21.

Anders JJ, Moges H, Wu X, Erbele ID, Alberico SL, Saidu EK, Smith JT, Pryor BA. *In Vitro* and *In Vivo* Optimization of Infrared Laser Treatment for Injured Peripheral Nerves. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2014; 46:34-45.

Andreo L, Soldera CB, Ribeiro BG, de Matos PRV, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA. Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury. *Lasers in Med Sci*, 2017; 32:2155-65.

Askari N, Yaghoobi MM, Shamsara M, Esmaeili-Mahani S. Tetracycline - regulated expression of *OLIG2* gene in human dental pulp stem cells lead to mouse sciatic nerve regeneration upon transplantation. *Neuroscience*, 2015; 305: 197-208.

Austin PJ, Wu A, Moalem-Talor G. Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. *J Vis Exp*, 2012; 61:e3393.

Azevedo E, Silva A, Martins R, Andersen ML, Tufik S, Manzano GM. Activation of C-fiber nociceptors by low-power diode laser. *Arq Neuropsiquiatr*, 2016; 74(3):223-7.

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.

Barbosa RI, Marcolino AM, Guirro RRJ, Mazzer N, Barbieri CH, Fonseca MCR. Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci*, 2010; 25: 423-430.

Baumann AP, Ibejunjo 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, Pereira DM, Carvalho PTC. Influence of laser (660 nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci*, 2009; 24:893-9.

Bobinski F, Alarcón Ferreira TA, Córdova MM, Dombrowski PA, da Cunha C, Santo CC, Poli A, Wanderley Pires RG, Martins-Silva C, Sluka KA, Soares Santos AR. Role of brainstem serotonin in analgesia produced by low-intensity exercise on neuropathic pain following sciatic nerve injury in mice. *Pain*. 2015; doi: 10.1097/j.pain.0000000000000372.

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.

Câmara CNS, Brito MVH, Silveira EL, Silva DSG, Simões VRF, Pontes RWF. Histological analysis of low-intensity laser therapy effects in peripheral nerve regeneration in Wistar rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 2011; 26(1):12-8.

Carlton JM, Goldberg NH. Quantitative integrated muscle function following reinnervation. *Plast Reconstr Surg*, 1986; 37:611-2.

Chen Y-J, Wang Y-H, Wang C-Z, Ho M-L, Kuo P-L, Huang M-H, Chen C-H. Effect of Low Level Laser Therapy on Chronic Compression of the Dorsal Root Ganglion. *PLoS ONE*, 2014; 9(3):e89894.

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

Cruz-Martinez A, Arpa J. Muscle fiber conduction velocity in situ (MFCV) in denervation, reinnervation and disuse atrophy. *Acta Neurol Scand*, 1999;100:337-40.

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.

Dias FJ, Issa JPM, Coutinho-Netto J, Fazan VPS, Sousa LG, Iyomassa MM, Papa CP, Watanabe I. Morphometric and high resolution scanning electron microscopy analysis of low-level laser therapy and latex protein (*Hevea brasiliensis*) administration following a crush injury of the sciatic nerve in rats. *Journal of Neurological Sciences*, 2015; 349:129-37.

Dias FJ, Issa JPM, Iyomassa MM, Coutinho-Netto J, Calzzani RAJ, Iyomassa DM, Sousa LG, Almeida SRY, Cury DP, Watanabe I. Application of a Low-Level Laser Therapy and the Purified Protein from Natural Latex (*Hevea brasiliensis*) in the Controlled Crush Injury of the Sciatic Nerve of Rats: A Morphological, Quantitative, and Ultrastructural Study. *BioMed Res Int*, 2013;2013:597863.

Dow DE, Carlson BM, Hasset CA, Dennis RG, Faulkner JA. Electrical stimulation of denervated muscles of rats maintains mass and force, but not following grafting. *Restor Neurol Neurosci*, 2006; 24:41-54.

Dubový P, Brázda V, Klusáková I, Hradilová-Svíženská I. Bilateral evaluation of interleukin-6 protein and mRNA in both lumbar and cervical dorsal root ganglia following unilateral chronic compression injury of the sciatic nerve. *J Neuroinflammation*, 2013; 10:55.

Eser F, Aktekin LA, Bodur H, Atan Ç. Etiological factors of traumatic peripheral nerves injuries. *Neurol India*. 2009; 57(4):434-7.

Gomes LEA, Dalmarco EM, André ES. The Brain-Derived Neurotrophic Factor, Nerve Growth Factor, Neurotrophin-3, and Induced Nitric Oxide Synthase Expression After Low-Level Laser Therapy in na Axonotmesis Experimental Model. *Photomedicine na Laser Surgery*, 2012; 11(30): 642-7.

Hadi AM, Mouchaers KTB, Schaliij I, Grunberg K, Meijer GA, Vonk-Nondegraaf A, Laarse WJVD, Beliën JAM. Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. *Cell Oncol* 2011; 34: 343-354.

Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys*. 2017;4(3):337-361.

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

Hsieh YL, Chou LW, Chang PL, Yang CC, Kao MJ, Hong CZ. Low-Level Laser Therapy Alleviates Neuropathic Pain and Promotes Function Recovery in Rats With Chronic Constriction Injury: Possible Involvements in Hypoxia - Inducible Factor 1 α (HIF-1 α). *Researc in Systems Neuroscience*, 2012; 520:2903-16.

Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*, 2004; 25(9): 1583-92.

Junqueira LCU, Montes GS, Sanches EM. Picrosirius staining plus polarization microscope, a specified method for collagen detection in tissue sections. *Histochemistry*, 1982; 74:153-6.

Kang H, Tian L, Mikeshi M, Lichtmann JW, Thompson WJ. Terminal Schwann Cells Participate in Neuromuscular Synapse Remodeling during Reinnervation following Nerve Injury. *The J Neurosci*, 2014; 34(18):6323– 33.

Karu T. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 2008; 84:1091-9.

Kim JR, Oh SH, Kwon GB, Namgung U, Song KS, Jeon BH, Lee JH. Acceleration of Peripheral Nerve Regeneration Through Assymmetrically Porous Nerve Guide Conduit Applied with Biological/Physical Stimulation. *Tissue Eng. Part A*. 2013; 19(23-24):2674-85.

Li R, Liu Z, Pan Y, Chen L, Zhang Z, Lu L. Peripheral Nerve Injuries Treatment: a Systematic Review. *Cell Biochem. Biophys*; 2014; 68(3):449-54.

Mandelbaum-Livnat MM, Almog M, Nissan M, Loeb E, Shapira Y, Rochkind S. Photobiomodulation Triple Treatment in Peripheral Nerve Injury: Nerve and Muscle Response. *Photomed Laser Surg*, 2016; 34(12):638-45

Masoumpoor M, Jameie SB, Janzadeh A, Nasirinezhad F, Soleimani M, Kerdary M. Effects of 660- and 980-nm low-level laser therapy on neuropathic pain relief following chronic constriction injury in rat sciatic nerve. *Lasers Med Sci*, 2014; 29: 1593-8.

McCroskery R, Thomas M, Maxwell L, Sharma L, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol*, 2003; 162(6):1135-47.

Medalha CC, Gangi GCD, Barbosa CB, Fernandes M, Aguiar O, Faloppa F, Leite VM, Rennó ACM. Low-level laser therapy improves repair following complete resection of the sciatic nerve in rats. *Lasers Med Sci*, 2012; 27:629-35.

Moges H, Wu X, McCoy J, Vasconcelos OM, Bryant H, Grunberg NE, Anders JJ. Effect of 810 nm Light on Nerve Regeneration After Autograft Repair of Severely Injured Rat Median Nerve. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2011; 43:901-6.

Mohammed IFR, Al-Mustawfi N, Kaka LN. Promotion of Regenerative Processes in Injured Peripheral Nerve Induced by Low-Level Laser Therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2007; 25(2):107-11.

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.

Nishimoto H, Inui A, Ueha T, Inoue M, Akahane S, Harada R, Mifune Y, Kobuku T, Nishida K, Kuroda R, Sakai Y. Transcutaneous carbon dioxide application with hydrogel prevents muscle atrophy in a rat sciatic nerve crush model. *J Orthop Res*, 2018; 36(6):1653-58.

Pachioni CAS. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Pan HC, Yang DY, Chiu YT, Lai SZ, Wang YC, Chang MH, Cheng FC. Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2006; 13:570-5.

Passarella S, Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2014; 140:344-58.

Pissulin CNA, Castro PATS, Codina F, Pinto CG, Vechetti-Junior IJ, Matheus SMM. GaAs laser therapy reestablishes the morphology of the NMJ and nAChRs after injury due to bupivacaine. *J Photochem Photobiol B*, 2017; 167:256-63.

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.

Raimondo S, Fornaro M, Di Scipio F, Ronchi G, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S. Chapter 5: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part I -morphological techniques. *Int Rev Neurobiol*, 2009; 87:81-103.

Reis FA, Belchior ACG, Carvalho PTC, Silva BAK, Pereira DM, Silva IS, Nicolau RA. Effect of laser therapy (660 nm) on recovery of the sciatic nerve in rats after injury through neurotmesis followed by epineural anastomosis. *Lasers Med Sci*, 2009; 24:741-7.

Rochkind S, Geuna S, Shainberg A. Phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration. *International Review of Neurobiology*, 2009; 87:445-64.

Rochkind S, Geuna S, Shainberg A. 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.

Ruff RL. Neurophysiology of the neuromuscular junction: Overview. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 998:1-10.

Salgado ASI, Alves ACA, Kerppers I, 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.

Santos AP, Suaid CA, Xavier M, Yamane F. Functional and morphometric differences between the early and delayed use of phototherapy in crushed median nerves of rats. *Lasers Med Sci*, 2011; 27:479-86.

Schamalbruch H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat Record*, 1986; 215(1):71-81.

Seddon, HJ. *Surgical disorders of the peripheral nerves*, 1975. Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh 2^aed.

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.

Shen CC, Yang YC, Liu BS. Large-area irradiated low-level laser effect in a biodegradable nerve guide conduit on neural regeneration of peripheral nerve injury in rats. *Injury Int J Care*, 2011; 42:803-13.

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.

Sousa FFA, Andraus RAC, Barbieri CH, Mazzer N. Influence of laser radiation in nerve regeneration in different treatments sites. *Acta Ortop Bras*, 2009; 17(6): 331-5.

Souza FI. Estudo da ação das neuregulinas 1-alfa e 1-beta na regeneração nervosa. Estudo experimental em camundongos isogênicos (C57BL/6J). Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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.

Takhtfooladi MA, Jahanbakhsh F, Takhtfooladi HA, Yousefi K, Allahverdi A. Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm²) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci*, 2015; 30:1047-52.

Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil*. 2008; 87(5):381-5.

Tos P, Ronchi G, Papalia I, Sallen V, Legagneus J, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part I – experimental models. *International Review of Neurobiology*, 2009; 87:47-79.

Wang C-Z, Chen Y-J, Wang Y-H, Yeh M-L, Huang M-H, Ho M-L, Liang J-I, Chen C-H. Low-Level Laser Irradiation Improves Functional Recovery and Nerve Regeneration in Sciatic Nerve Crush Rat Injury Model. *PLoS ONE*, 2014; 9(8):e103348.

Wang Z-Z, Washabaugh CH, Yao Y, Wang J-M, Zhang L, Ontell MP, Watkins SC, Rudnicki MA, Ontell M. Aberrant Development of Motor Axons and Neuromuscular Synapses in MyoD-Null Mice. *The Journal of Neuroscience*, 2003; 23(12):5161-9.

Wu P, Chawla A, Spinner RJ, Yu C, Yaszemski MJ, Windebank AJ, Wang H. Key changes in denervated muscles and their impact on regeneration and reinnervation. *Neural Regeneration Research*, 2014; 9(20):1796-1809.

Wu RH, Wang P, Yang L, Li Y, Liu M. A potential indicator of denervated muscle atrophy: the ratio of myostatin to follistatin in peripheral blood. *Genet Mol Res*, 2011; 10 (4): 3914-23.

Xiao L, Tsutsui T. Human dental mesenchymal stem cells and neural regeneration. *Hum Cell*, 2013; 26(3): 91-6.

Xing H, Zhou M, Assinck P, Liu N. Electrical stimulation influences satellite cell differentiation after sciatic nerve crush injury in rats. *Muscle & Nerve*; 2015; 51(3):400-11.

Yachnev IL, Plakhova VB, Podzorova SA, Shelykh TN, Rogachevsky IV, Krylov BV. Mechanism of Pain Relief by Low-Power Infrared Irradiation: ATP is an IR-Target Molecule in Nociceptive Neurons. *Med Chem*, 2012; 8(1):14-21.

Yafe A, Shklover J, Weisman-Shomer P, Bengal E, Fry M. Differential binding of quadruplex structures of muscle-specific genes regulatory sequences by MyoD, MRF4 and myogenin. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(12): 3916-3925.

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

8. APÊNDICE

8.1 Apêndice 1

Artigo publicado na Lasers in Medical Science

Lasers Med Sci
https://doi.org/10.1007/s10103-017-2359-7



REVIEW ARTICLE

Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury

L. Andreo¹ · C. B. Soldera² · B. G. Ribeiro² · P. R. V. de Matos³ · S. K. Bussadori^{1,2} · K. P. S. Fernandes¹ · R. A. Mesquita-Ferrari^{1,2}

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

standardization of a LLLT protocol to enhance the regeneration process following a peripheral nerve injury.

Keywords Nerve regeneration · Low-level laser therapy · Sciatic nerve · Photobiomodulation

Introduction

Peripheral nerve injury (PNI) is more common than a spinal cord injury. While PNI does not pose a fatal risk, it can exert a negative impact on quality of life due to the possibility of the non-occurrence of complete regeneration, resulting in a motor disorder (paralysis) or sensory disorder (anesthesia, paresthesia, and painful neuropathy). Thus, there is considerable interest in the investigation of the most adequate form of treatment, since nerve fibers have regenerative potential [1–5].

After a PNI, the repair process is initiated, involving neuronal growth, reinnervation, and functional recovery. PNI is classified into three types: neuropraxia, in which no structural changes occur and there is minimal sensory or motor loss resulting from mild pressure; axonotmesis, in which Wallerian degeneration of the axon occurs distally, with no loss of Schwann cells and the maintenance of connective tissue; and neurotmesis, the complete sectioning of the nerve, which can lead to tissue fibrosis due to proximal and distal degeneration [6].

Different models of PNI are used in experimental studies, such as crushing [7], nerve compression [8, 9], laceration, and complete cross-sectioning [10, 11]. The standardization of such injuries constitutes the greatest challenge. In studies involving axonotmesis or neuropraxia, the acquisition of a standardized injury is less likely in comparison to neurotmesis, since there is no assurance of an injury with the same amount of fibers in all experiments [12, 13]. With neurotmesis, the continuity of the nerve is interrupted and the muscles innervated by the fiber in

✉ R. A. Mesquita-Ferrari
raquel.mesquita@gmail.com; http://www.uninove.br

¹ Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, University Nove de Julho (UNINOVE), Rua Vergueiro, 349, São Paulo, SP CEP 01504001, Brazil

² Postgraduate Program in Rehabilitation Science, UNINOVE, São Paulo, SP, Brazil

³ Undergraduate Program in Physical Therapy, UNINOVE, São Paulo, SP, Brazil

Published online: 23 October 2017

Springer

8.1 Apêndice 2

Comprovante de aceite do artigo 3 na revista Photochemistry and Photobiology

Photochemistry and Photobiology

Decision Letter (PHP-2018-05-RA-0105.R2)

From: HAMBLIN@HELIX.MGH.HARVARD.EDU
To: lucas.andreo@hotmail.com
CC: jean.cadet@usherbrooke.ca
Subject: Photochemistry and Photobiology - Decision on Manuscript ID PHP-2018-05-RA-0105.R2
Body: 30-Oct-2018

Dear Ms. Andreo:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Effects of photobiomodulation on functionality in Wistar rats with sciatic nerve injury" in its current form for publication in Photochemistry and Photobiology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

The "AcceptedArticle" publication procedure used by Photochemistry and Photobiology implies that accepted papers will be posted online within a few days after acceptance, in the form of an uncorrected PDF-proof. The paper is immediately given a Digital Object Identifier (DOI), which allows it to be cited and tracked. Once the manuscript is proofread and corrected, the EarlyView article will be posted online and the Accepted Article version removed.

Please note that your galley proofs will be sent via email within approximately 4 weeks of this letter. Please add the following address to your "accept" or "white list" to avoid the proofs being marked as spam. The address is: spseproof@sps.co.in

The galley proof serves as your opportunity to review and make corrections to your article during the production process. You will work with the proofreader, who will incorporate any alterations you may have along with any minor changes (spelling, grammar). Corrections after the articles appear online can only be made in the form of a "correction line" added to the text, or a separately published erratum at the discretion of the editor.

Regarding the copyright; the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting you to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) you will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

If you have not already uploaded the graphical abstract files, please send them by mail to: asp.ed@usherbrooke.ca

Please feel free to contact us if you have any questions.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Photochemistry and Photobiology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Michael Hamblin
Associate Editor, Photochemistry and Photobiology
HAMBLIN@HELIX.MGH.HARVARD.EDU

Reviewer(s)' Comments to Author:
Reviewer: 1

Comments to the Author
Dear authros,
Congrats for all clarifications.

Date Sent: 30-Oct-2018

File 1: * [Graphical-Abstract-specifications.doc](#)

9. ANEXOS

9.1 Anexo 1

Comprovante de aprovação pelo CEUA



Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN002.2016

Título do Projeto: EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE O TROFISMO MUSCULAR E REPARO NERVOSO PÓS TUBULIZAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS WISTAR

Orientador: Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

Aluno: Lucas Andreo Dias dos Santos

Objetivos: Analisar os efeitos da PBM sobre o tecido muscular de ratos Wistar pós ressecção do nervo isquiático.

Método: O procedimento de ressecção do nervo isquiático será realizado 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 serão 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. Os animais serão tricotomizados, posicionados em decúbito ventral e limpos com uma solução de iodo-povidina na face posterior da coxa, será realizada uma incisão cutânea retilínea paralela ao ísquio. O nervo isquiático será isolado das demais estruturas, sendo realizada a transecção do nervo 2mm acima da ramificação removendo 2mm do nervo (Monte-Raso, 2006). Após o procedimento será realizada a tubulização conforme descrito anteriormente (Souza, 2007), será utilizado tubos de polietileno, sendo primeiramente realizada a transfixação da prótese, exteriorização da agulha, penetração do epineuro (no sentido interno para externo), transfixação da prótese (interno para externo), tensionamento e invaginação do coto proximal e posterior tubulização do coto distal. Para este procedimento será utilizado um tubo de polietileno de 8mm e de sutura (fio mononylon 10.0, agulha 75um, Ethicon) conforme figura 2. Depois será realizada a sutura das áreas incisadas utilizando-se fio de poliamida (6,0) e os animais serão mantidos em gaiolas com aquecimento para prevenir a hipotermia. Nos quatro primeiros dias de pós-operatório, acetaminofeno (13,5mg/100mL, Tylenol, Jaansen-Cilag Farmacêutica Ltda, São José dos Campos, SP) será adicionado à água dos animais para analgesia e uma dose única de oxitetraciclina dihidratada subcutânea (0,1mL/kg, Terramicina LA, Pfizer Inc, Guarulhos, SP) será administrado para profilaxia de complicações secundárias à possíveis infecções (Silva-Couto et al. 2012). A PBM será realizada com base nos parâmetros descritos anteriormente por Silva-Couto et al. (2012) sendo utilizado o Twin Laser® (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil)

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo)

Serão utilizados 105 ratos fêmeas da linhagem Wistar, pesando entre 200-250g (3-4 meses de vida) mantidos no biotério da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). O n é alto, porém é justificado, pois os grupos serão acompanhados por períodos diferentes (7, 14, 21 e 28 dias).

Condições de alojamento e nutrição

Os animais serão mantidos em caixas plásticas apropriadas, temperatura ambiente entre 22° - 27°C e luminosidade controlada com ciclo de 12 horas (claro/escuro), com comida padrão e água ad libitum.

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais

Uso de analgésico

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração)

Cetamina, 100mg/kg, Intraperitoneal.

Xilazina, 10mg/kg, Intraperitoneal.

Tramadol, 5mg/kg, s.c., 8/8h nos 4 primeiros dias de pós operatório (combinação)+Dipirona sódica,

50mg/kg, s.c., 8/8h nos 4 primeiros dias de pós operatório (combinação)

Eutanásia: Todos os animais serão eutanasiados com superdose de anestésico 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 (3 vezes a dose utilizada para anestesia dos animais) após 7, 14, 21 e 28 dias (5 animais em cada período, totalizando 20 animais por grupo). Para aplicação serão 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.

Pertinência e valor científico do estudo proposto

Em decorrência das lesões nervosas periféricas gerarem um impacto negativo na qualidade de vida de indivíduos acometidos, faz-se necessário uma investigação terapêutica a fim de otimizar o processo de regeneração nervosa.

O LBP pode ser uma promissora terapia neste contexto.

Data de início: 01/06/2016

Data de término: 20/02/2018

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

(X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

() Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

() Não-Aprovado

Comentários:

-Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA – UNINOVE, o relatório final sobre a pesquisa (Lei Procedimentos para Uso Científico de Animais – Lei no 11.794-8 de outubro de 2008).

São Paulo, 25 de maio de 2016.



Prof. Dra. Kátia De Angelis
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

9.2 Anexo 2

Relatório final de atividades realizadas durante o período sanduíche



Parecer

O *Dr. LUCAS ANDREO DIAS DOS SANTOS*, doutorando da Universidade Nove de Julho, do PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE, esteve como estudante de mobilidade no Laboratório de Metabolismo e Regeneração Óssea da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, a realizar o projeto de investigação “EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS DE SCHWANN ST88-14”, no período de 04/2017 a 01/2018, sob minha orientação.

As atividades foram realizadas de maneira adequada e dentro do cronograma apresentado no projeto de pesquisa enviado e aprovado pela CAPES na ocasião da concessão da bolsa-auxílio. Durante a sua estadia no laboratório, mostrou um excelente desempenho, em que se destaca o espírito de iniciativa, grande autonomia e persistência, acompanhados de método, disciplina e rigor na execução do trabalho laboratorial, bem como no tratamento e interpretação dos resultados. Salienta-se também a sua elevada perspicácia científica em adaptar protocolos experimentais e explorar novas linhas de pesquisa a partir dos resultados que foram sendo observados ao longo da execução do plano de trabalhos.

A nível de relações humanas, a sua grande empatia pessoal, delicadeza no convívio e sempre pronta disponibilidade para partilhar os seus conhecimentos, constituíram uma mais-valia muito importante no trabalho em curso no laboratório. Estes aspetos, aliados à sua maturidade científica, conferem-lhe um papel essencial em qualquer grupo de trabalho.

O *Dr. Lucas Andreo Dias dos Santos* mostrou possuir características científicas e humanas para efectuar investigação científica de qualidade, e a Universidade do Porto tem todo o interesse na continuação desta colaboração.

Prof. Doutora Maria Helena Raposo Fernandes
Laboratório de Metabolismo e Regeneração óssea (responsável)
(www.fmd.up.pt/bonelab)
Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Porto, 24 de março de 2018