

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

TAMIRES RIBEIRO DE ARAUJO

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO SISTEMICA UTILIZANDO LED E
LASER SOBRE A RESPOSTA SENSORIO-MOTORA NA LESÃO NERVOSA
PERIFÉRICA EM RATOS WISTAR**

São Paulo, SP

2021

2021

TAMIRES RIBEIRO DE ARAUJO

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO SISTEMICA UTILIZANDO LED E
LASER SOBRE A RESPOSTA SENSORIO-MOTORA NA LESÃO NERVOSA
PERIFÉRICA EM RATOS WISTAR**

Dissertação de mestrado apresentada
como pré requisito para obtenção de título
de Mestrado em Ciências da Reabilitação

Orientadora: Prof^a Dr^a. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

São Paulo, SP

Araujo, Tamires Ribeiro de.

Efeitos da fotobiomodulação sistêmica utilizando led e laser sobre a resposta sensorio-motora na lesão nervosa periférica em ratos wistar. / Tamires Ribeiro de Araujo. 2021.

48 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

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

1. Regeneração nervosa. 2. Terapia a laser em baixa intensidade. 3. Nervo isquiático. 4. Fotobiomodulação sistêmica. 5. LED.
- I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita. II. Título.

São Paulo, 15 de março de 2021.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): TAMIRES RIBEIRO DE ARAUJO

Título da Dissertação: "Efeitos da Fotobiomodulação Sistêmica Utilizando Led e Laser Sobre a Resposta Sensorio-motora na Lesão Nervosa Periférica Em Ratos Wistar"

Presidente: PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA-FERRARI



Membro: PROFA. DRA. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA



Membro: PROFA. DRA. MÔNICA ROSAS DA COSTA IEMMA



AGRADECIMENTOS

À **Universidade Nove de Julho** e ao **Programa de Ciências da Reabilitação** pela oportunidade e infraestrutura.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari** pelo acolhimento tão caloroso, pela sensibilidade de entender o momento de cada um, por toda paciência e orientação, por todo apoio durante os experimentos e durante a escrita desta dissertação, por saber ouvir e aconselhar, por acalantar e motivar em cada etapa, eu não poderia ter sorte maior do que tê-la como minha orientadora, um coração enorme, um cuidado de mãezona todo especial que só ela tem! Espero corresponder expectativa e confiança deposita em mim ao longo desses 2 anos.

À Profa. Dra. **Sandra Kalil Bussadori** que recebeu e acolheu na ausência da profa Raquel, pelo suporte, pela confiança e por ter aceitado minha banca de qualificação e todas as considerações que agregaram muito para conclusão desse trabalho.

À minha incrível família **Ribeiro** por sempre me apoiarem, especialmente minha super **madrinha Cleide e meu padrinho Geraldo** que sempre acreditaram em mim, sempre me incentivaram e que sempre cuidaram de mim, que SEMPRE estiveram comigo nos momentos mais difíceis da minha vida, por cuidarem tão bem da minha **mãe Cleuza** que desde o último 1 ano e meio vêm evoluindo com saúde frágil o que compromete sua cognição e suas funções motoras, sem apoio de vocês não seria possível levar esse trabalho à frente! E claro sempre comemorando comigo nos momentos de conquista, assim como será ao término dessa defesa!

À uma pessoa muito especial na minha vida que sempre me mostrou o caminho direta ou indiretamente, que apareceu na minha vida em um momento onde eu só tinha um sonho de **ser fisioterapeuta** e não tinha a menor ideia de por onde começar quando você apresentou o caminho da faculdade! Por anos perdemos o contato e você reapareceu no momento onde eu me preparava para iniciar essa jornada do mestrado, me ajudou em todos os processos, desde

estudar para prova, montar um projeto até a finalização da dissertação. Só tenho a te agradecer **Brunno Lemes!** Como a gente brinca rs minha vida acadêmica foi graças aos seus empurrõezinhos e hoje não podia deixar de te agradecer por sempre estar comigo e continuar me incentivando, agora com a nova pós... Muito obrigada por tudo que você fez e faz!

Aos colegas do laboratório de pesquisa da UNINOVE por terem me ajudado de maneira direta ou indireta na execução do trabalho, especialmente: **Lucas** que foi peça chave me ajudando em todas as etapas deste trabalho desde do desenho do trabalho, da cirurgia, tratamento, avaliação e correções da escrita para finalização dessa tese. A **Taina** que me auxiliou de forma solícita e sempre muito pertinente em seus apontamentos, uma pessoa incrível que tive a honra de conhecer. A **Andréia** por ter despendido tempo para nos ajudar nos dias de cirurgia e eutanásia sua ajuda foi de extrema valia para que tudo corresse dentro do planejado.

E obvio que não podia faltar meu agradecimento super especial para minhas amiguinhas, meu grupinho da Itália **Tamiris** e **Daysi!** NADA desse trabalho teria dado certo se elas não estivessem comigo, me apoiando, me ajudando, tirando minhas dúvidas, me fazendo companhia, me acalmando quando eu achava que não daria conta. Um dos meus maiores presentes que mestrado me deu! É maravilhoso ter vocês na minha vida para continuarmos na busca do Cannoli perfeito!

Aos amigos **Conceição** e **Michel** pelo companheirismo no primeiro ano, nas discussões de caso, nos trabalhos e nos nossos cafés com vários papos cabeça guiados com sabedoria pela mana Conceição com muitas reflexões que levo para vida, nosso trio foi muito especial!

As minhas amigas **Katymila** e **Emelli** pelo apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim e fazer tudo isso mais leve!

E por último e não menos importante minha coordenadora **Rosi** por sempre me ajudar na escala para que eu conseguisse conciliar meus estudos e meu trabalho que são muito importantes para mim. Obrigada por tornar isso possível.

RESUMO

Introdução: A Lesão Nervosa Periférica (LNP) são lesões que causam grande prejuízo funcional. Um recurso de fotobiomodulação (FBM) que vem sendo explorado como auxiliar ao tratamento da LNP é a FBM sistêmica (FBMS), que já demonstrou efeitos positivos em outras condições clínicas incluindo, redução do processo inflamatório e aumento na produção de ATP. **Objetivo:** Comparar os efeitos da FBMS com LBI e LED após LNP sobre a motricidade, sensibilidade e morfologia muscular. **Metodologia:** Foram utilizados ratos Wistar distribuídos em 4 grupos, controle, Lesão, FBMS-LED e FBMS-laser. A LNP ocorreu através da técnica de esmagamento do nervo ciático e o tratamento com FBMS-LED (850nm, 40mW, 3.2J) e FBMS-LBI (780nm, 40mW, 3.2J), administrado na região da cauda do animal. As avaliações foram realizadas o Índice Funcional da ciático (IFC), teste de von Frey e foram coletados os músculos tibiais anterior direito e esquerdo, para análise da massa muscular e histológica por coloração de Hematoxilina & Eosina (HE) com 7, 14 e 21 dias após lesão. **Resultados:** O IFC apresentou melhora funcional no grupo FBMS-LBI em todos os períodos, houve redução algica com 14 dias no teste de von frey no grupo FBMS-LBI, a relação D/E demonstrou redução de atrofia muscular no grupo FBMS-LBI com 7 dias, o diâmetro da fibra muscular evidenciou aumento no grupo FBMS-LED com 14 dias e houve aumento da área se secção transversa (AST) nos grupos FBMS-LED e FBMS-LBI com 7 dias. **Conclusão:** A FBMS utilizando ambas as fontes de luz, LED e LBI, demonstrou modular de forma positiva a recuperação neuromuscular após LNP sendo os resultados potencializados nos grupos tratados com LBI.

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

ABSTRACT

Introduction: Peripheral Nerve Injury (PNI) are injuries that cause great functional damage. A feature of photobiomodulation (PBM) that has been explored as an aid to the treatment of PNI is systemic PBM (SPBM), which has already demonstrated positive effects in other clinical conditions including, reduction of the inflammatory process and increase in the production of ATP.

Objective: To compare the effects of SPBM with LLT and LED after PNI on motricity, sensitivity and muscle morphology. **Methodology:** Wistar rats distributed in 4 groups, control, Lesion, SPBM-LED and SPBM-LLT, were used. The PNI occurred through the sciatic nerve crushing technique and treatment with SPBM-LED (850nm, 40mW, 3.2J) and SPBM-LLT (780nm, 40mW, 3.2J), administered in the animal's tail region. Assessments were made using the Functional Sciatic Index (FSI), von Frey test and the right and left anterior tibial muscles were collected for analysis of muscle and histological mass by Hematoxylin & Eosin (HE) staining with 7, 14 and 21 days after injury. **Results:** The FSI showed functional improvement in the SPBM-LLLT group in all periods, there was pain reduction with 14 days in the von frey test in the FBMS-LBI group, the L/R ratio showed a reduction in muscle atrophy in the FBMS-LBI group at 7 days, the diameter of the muscle fiber showed an increase in the SPBM-LED group at 14 days and there was an increase in the cross-section area (CSA) in the SPBM-LED and SPBM-LLT groups at 7 days. **Conclusion:** The SPBM-LLT using both light sources, LED and LLLT, using the neuromuscular recovery after LNP to positively modulate the results being enhanced in the groups treated with LLLT.

Keys Words: Nerve regeneration, low-level laser therapy, sciatic nerve, systemic photobiomodulation, LED.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Lesão nervosa periférica	12
1.2. Alterações no músculo esquelético desnervado	14
1.3. Fotobiomodulação.....	15
1.4. Instrumentos de avaliação após LNP.....	19
1.5. Justificativa.....	22
2. OBJETIVO	23
2.1. Geral	23
2.2. Específicos.....	23
Comparar os efeitos da FBM sistêmica com LBI e LED após lesão nervosa periférica induzida por compressão no que se refere a:	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Ética	24
3.2. Animais	24
3.3. Grupos experimentais	24
3.4. Procedimento cirúrgico.....	25
3.5. FBMS	27
3.6. Avaliações.....	28
3.6.1. Análise funcional da marcha.....	28
3.6.2. Teste de von Frey.....	30
3.6.3. Análise da massa muscular.....	30
3.6.4. Avaliação qualitativa e quantitativa dos aspectos morfológicos musculares	31
3.7. Eutanásia	32
3.8. Análise dos resultados	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Análise funcional da marcha	33
4.2. Análise da Sensibilidade	33
4.3. Análise da massa muscular	34
4.4. Efeitos da FBM sobre a morfologia muscular.....	35
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÃO	42
7. Referência	43
8. Anexo	48

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Parâmetros utilizados para o tratamento com FBM.....	25
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grupos experimentais, tratamentos e análises realizadas.....	23
Figura 2. Demonstração do local de lesão por esmagamento do nervo isquiático.....	24
Figura 3. Vista isométrica e vista superior do modelo da passarela utilizado para o IFC.....	26
Figura 4. Representação dos parâmetros obtidos para cálculo do IFC, da esquerda para a direita estão representadas as patas do nervo lesionado e normal.....	27
Figura 5. Efeitos da FBMS sobre o IFC de ratos Wistar pós LNP de nervo isquiático após 7, 14 e 21 dias.....	32
Figura 6. Efeitos da FBMS sobre a nocicepção de ratos Wistar pós LNP de nervo isquiático após 7, 14 e 21 dias.....	33
Figura 7. Efeitos da FBMS sobre a atrofia muscular ($r=E/D$) de ratos Wistar pós LNP de nervo isquiático após 7, 14 e 21 dias.....	33
Figura 8. Fotomicrografias dos músculos em cortes transversais corados com hematoxilina e eosina (400X).....	34
Figura 9. Efeitos da FBMS sobre o diâmetro das fibras musculares de ratos Wistar pós LNP de nervo isquiático após 7, 14 e 21 dias.....	35
Figura 10. Efeitos da FBMS sobre área de secção transversa das fibras musculares de ratos Wistar pós LNP de nervo isquiático após 7, 14 e 21 dias....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
ALT	Aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AsGaAl	Arseneto de gálio alumínio
AST	Area de secção transversa
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CK	Creatina quinase
cm ²	centímetros quadrados
D	Direito
E	Esquerdo
FBM	Fotobiomodulação
FBMS	Fotobiomodulação sistêmica
G	gramas
H	Hora
HE	Hematoxilina e eosina
IFC	Índice funcional do ciático
IFP	Índice funcional peroneio (fibular)
IFT	Índice funcional do tibial
ILIB	Intravascular irradiation of blood
ISTL	Irradiação sanguínea a laser
IT	Abertura dos dedos intermediários
J	Joules
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
LBI	Laser em baixa intensidade
LDH	Lactato desidrogenase
LED	Luz por emissão de diodo
LNP	Lesão nervosa periférica

Mg/kg	Micrograma por quilo
Min	minutos
ml/kg	Mililitros por quilo
Mm	Milímetros
Ms	Milissegundo
mW	miliWatts
mW/cm ²	milliWatts por centímetro quadrado
N	Numero
Nm	nanometros
pH	Potencial hidrogeniônico
PL	Comprimento da pegada
R	relação
S	segundos
TA	Músculo tibial anterior
TAE	Músculo tibial anterior esquerdo
TOF	Distância ao pé oposto
TS	Abertura total dos dedos
UNINOVE	Universidade Nove de Julho
W	Watt
W/cm ²	Watt/cm ²
Mm	Micrometro

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lesão nervosa periférica

A lesão nervosa periférica (LNP) é conhecida comumente como interrupção dos impulsos nervosos causando perda de funcionalidade, sensibilidade, fraqueza muscular e conseqüentemente perda de massa muscular e essas conseqüências afetam diretamente a qualidade de vida, acometendo por ano cerca de 13 a 23 pessoas a cada 100.000 indivíduos ¹.

A LNP pode ser traumática ou não traumática, com compressão total ou parcial, secundárias a estiramento súbito de um membro, laceração ou isquemia. Dentre o número total de LNP, cerca de 1/3 tem recuperação incompleta do nervo, levando a resultados funcionais ruins, incluindo a perda e/ou recuperação parcial da função motora e sensorial, dor crônica e atrofia muscular do alvo final e fraqueza profunda. Conseqüentemente, a perda da função normal do membro pode comumente resultar em morbidade vitalícia e incapacidade permanente.^{2 3}

Pode-se classificar a LNP em cinco categorias: (1) neuropraxia, ou lesão neural devido à compressão ou tração, sem danos estruturais do nervo, (2) axonotmese, ou perda de continuidade dos axônios nervosos, (3) neurotmese, ou transecção completa ou ruptura de todo o nervo. Os graus 4 e 5 tem com base no aumento da gravidade dos danos à estrutura nervosa requerem intervenção cirúrgica.^{4 3}

Os nervos periféricos propagam sinais entre a medula espinhal e o restante do corpo e são compostos por diversas combinações de neurônios motores, neurônios sensoriais e autônomos. Os neurônios motores e autônomos recebem sinais por meio de seus dendritos, provenientes dos neurônios do sistema nervoso central na medula espinhal, pela via eferente utilizando principalmente o neurotransmissor acetilcolina, já os neurônios sensoriais recebem os sinais por meio de seus dendritos, provenientes de células especializadas como os corpúsculos de Paciniano, pela via aferente e esses sinais são transmitidos ao sistema nervoso central que fornecem informações sensoriais ao cérebro e possivelmente aos interneurônios da medula espinhal quando uma resposta reflexa é necessária.⁵

Um nervo periférico é composto por fibras nervosas envoltas por várias camadas diferentes de tecido conjuntivo estromal, sendo elas o endoneuro, a qual compõe a camada estrutural mais profunda, estando em contato direto com o axônio envolvendo-o de forma individualizada; o perineuro, que recobre o endoneuro em uma camada intermediária, agrupando axônios e formando os fascículos e a camada mais externa de tecido conjuntivo que reveste o nervo, que é chamado de epineuro. O epineuro é dividido em dois, o epineuro epifascicular o qual se encontra disperso entre os fascículos e o epineuro epineural, o qual está localizado ao redor do tronco do nervo.⁶

Além da composição anterior, os nervos periféricos possuem fibras mielinizadas e não mielinizadas. Os nervos mielinizados são circundados por células de Schwann, tratam-se de células especializadas que proporcionam isolamento e melhoraram a velocidade de condução de impulsos nervosos ao limitar os locais de transferência iônica ao longo do axônio para os nódulos de Ranvier.⁷ Os grandes neurônios motores (Tipo A α) são fibras bastante mielinizadas, seguidos por fusos musculares aferentes (Tipo A β). Já os neurônios sensoriais que estão envolvidos na transmissão da dor e temperatura, por não serem mielinizados (Fibras tipo C) tem a condução do impulso com velocidade mais lenta.⁵

Quando ocorre LNP, a porção distal do nervo sofre uma degeneração progressiva, conhecida como degeneração Walleriana, dada pela degeneração dos axônios, quebra da mielina, proliferação de células gliais, comprometimento da barreira hematoencefálica, infiltração e ativação de macrófagos no momento da lesão. Na degeneração Walleriana as células de Schwann exercem um papel importante na fase inicial onde passam pelo processo de desdiferenciação no nervo distal, removendo restos de mielina que funcionam como uma barreira para o recrescimento do axônio já que contem sinais inibitórios do crescimento axonal, incluindo glicoproteína associada à mielina.⁸

Após a ocorrência da LNP é iniciado o processo de reparo, esse processo envolve o crescimento neuronal, reinervação e conseqüentemente recuperação funcional. Quando a lesão é acompanhada por degeneração Walleriana, como nas lesões por esmagamento, os músculos inervados pelas fibras afetadas sofrem uma deterioração progressiva com restituição insuficiente do tecido que

sofreu degeneração. Como consequência, esse tipo de LNP leva atrofia muscular, redução de área de secção transversa (AST) das fibras musculares e redução dos receptores nicotínicos de acetilcolina da placa motora resultante do comprometimento das fibras motoras que levam a um distúrbio funcional.^{9 10}

Dentre os modelos de LNP por esmagamento, a compressão do nervo ciático de roedores se mostrou um modelo confiável de estudo, pois, causa uma ruptura das fibras nervosas mantendo intactas a maiorias das estruturas de suporte do nervo, facilitando a regeneração após a lesão. Esse modelo de lesão é realizado por meio do esmagamento do nervo utilizando uma pinça ajustável, sendo capaz de reproduzir o aspecto de lesão em modelos por máquinas de peso morto e de resistência a tração já comprovado por meio de análise macroscópica e por meio de análise do Índice Funcional do Ciático (IFC) indicando o grau de comprometimento funcional compatível entre as técnicas.¹¹

12

1.2. Alterações no músculo esquelético desnervado

As fibras musculares inervadas pelo nervo acometido pela LNP, passam pelo processo de atrofia muscular por desnervação. Essas fibras ainda permanecem viáveis logo após a desnervação e as miofibrilas são absorvidas, os filamentos de miosina e actina são catabolizados, células musculares reduzem o seu tamanho e o espaço extra celular dilatado é preenchido com colágeno.¹³

A desnervação leva a um efeito profundo nas características mecânicas ativas dos músculos. No início, a maior dificuldade para realizar a contração muscular é devido a diminuição na área de secção transversa total das fibras musculares. Com a diminuição da área de secção transversa total do músculo a tensão máxima gerada pela contração do músculo desnervado também diminui proporcionalmente. Conforme o tempo de desnervação vai se prolongando, a desorganização progressiva e a substituição das fibras musculares por colágeno diminui a capacidade de força.¹³.

A medida que o músculo atrofia, após a desnervação, individualmente cada fibra muscular diminui seu diâmetro,¹⁴ com tudo, o número total de fibras musculares não se altera nas primeiras 51 semanas, pelo contrário, além das

fibras musculares individuais que encolhem, elas também mudam de tipo, alterando a distribuição e a proporção dos tipos de fibra dentro do músculo.¹⁵ Ainda que haja uma discussão sobre as taxas de atrofia variando de acordo com os tipos de fibras musculares, há um consenso de que as fibras tipo I e II sofrem atrofia após a desnervação e que no curto prazo, essas modificações são mais evidentes nas fibras musculares do tipo II.¹⁶ Deste modo, o diâmetro da fibra muscular fornece um índice confiável para analisar a extensão da desnervação e da atrofia muscular,⁵ podendo prever o grau de recuperação alcançável pelo reparo do nervo.¹⁷

A medicina segue sendo desafiada no que tange ao reparo pós traumático e na prevenção de atrofia muscular, um recurso não invasivo e indolor que vem sendo aplicado com este fim, é a terapia por fotobiomodulação (FBM). Esta terapia vem demonstrando efeitos promissores no tratamento da LNP tanto para restaurar ou prevenir temporariamente a atrofia muscular por desnervação quanto para aumentar a regeneração de nervos periféricos severamente lesionados, culminando dessa forma com melhora funcional e sensitiva.¹⁸

Estudos realizados em animais sugerem que a função dos músculos desnervados pode ser preservada parcialmente devido a prevenção temporária de alterações bioquímicas induzidas pela desnervação. A função dos músculos desnervados podem ser restauradas consideravelmente por tratamento de FBM com uso de laser de baixa intensidade (LBI) iniciados o mais precoce possível após a LNP.¹⁸

1.3. Fotobiomodulação

A terapia por FBM é a indução de reações fotoquímicas e aumento do metabolismo celular a partir da interação da luz com o tecido.¹⁹ A aplicação de luz não invasiva nos comprimentos de onda que transpõem a camada cutânea, começou a ser utilizada como uma potencial terapia para melhorar os resultados funcionais de diversas lesões neurais.²⁰ Também possui efeito protetor imediato, inibindo o processo de perda da atividade funcional do nervo lesado por um período prolongado, também diminui a formação de cicatriz no local da lesão, reduz a degeneração nos neurônios motores correspondente da medula

espinhal, aumenta mielinização e crescimento axonal de forma exponencial, podendo ser considerado como um potencial tratamento LNP.¹⁸

O LBI é um recurso que já demonstrou efeitos positivos no tratamento de LNPs modulando o reparo neuromuscular por luz vermelha ou infravermelha. A maioria dos estudos analisados utilizou uma potência de até 50mW e energia total de até 15J administrada em vários pontos. A determinação desses parâmetros é importante para a padronização de um protocolo para melhorar o processo de regeneração após uma lesão de nervo periférico.¹⁰

Um estudo realizado por Andreo et al. 2017, avaliou os efeitos do LBI no reparo muscular de ratos Wistar após a LNP por esmagamento, o tratamento foi administrado com laser de baixa potência (780nm, 0,04cm², 1W/cm², 3.2J de energia total) sobre o nervo lesado e/ou o músculo tibial anterior. Os efeitos do FBM foram favoráveis na morfologia muscular e na expressão gênica dos receptores de calcineurina, miogenina e acetilcolina. A FBM levou a uma aceleração do processo de reparo muscular e os efeitos foram mais evidentes 2 semanas após a LNP.¹²

Outro estudo de Andreo et al. 2018 avaliou a funcionalidade sensório motora em ratos Wistar após LNP por esmagamento que foram tratados com FBM utilizando LBI e os resultados demonstraram melhora os aspectos funcionais relacionados à marcha, sensibilidade mecânica e massa muscular, com melhores resultados nos aspectos motores e massa muscular quando a irradiação ocorreu sobre o nervo lesado e melhores resultados nos aspectos sensoriais quando a irradiação foi sobre o músculo, demonstrando a eficácia da terapia por fotobiomodulação com LBI após LNP.⁹

Mandelbaum-Livnat et al. 2016, avaliaram a eficácia do tratamento com FBM com LBI após LNP (esmagamento do nervo isquiático), aplicado simultaneamente em três áreas: área lesada do nervo periférico, segmentos correspondentes da medula espinhal e músculo desnervado correspondente (tratamento triplo) para o tratamento de LNP incompleta em ratos com o objetivo final de melhora da motricidade e morfologia muscular. Os resultados mostraram que a FBM com LBI (780nm, 1.061W/cm², 250mW, 45 e 105J) aumentou a recuperação funcional (avaliada através do índice funcional do ciático) e melhora

da recuperação morfológica no músculo e, portanto, poderia ter aplicações terapêuticas diretas no músculo, principalmente durante a atrofia progressiva decorrente de LNP.²¹

Além do LBI, o diodo emissor de luz (LED) é uma alternativa de fonte de luz utilizada para a FBM que vem sendo cada vez mais explorada. Acreditava-se que a coerência da luz do LBI era essencial para obter os resultados terapêuticos, mas recentemente os LED vem desafiando essa teoria, emitindo luz não coerente em uma ampla faixa de comprimento de onda e mesmo assim demonstrando importantes resultados terapêuticos. Ainda não foram determinadas precisamente as diferenças terapêuticas entre o LED e o LBI, e, se realmente há uma diferença, ela seria resultado da coerência ou da luz monocromática do LBI.²²

Segundo Heiskanen & Hamblin (2018), o custo por mW de potência óptica é exponencialmente menor para os LEDs em comparação com o LBI, além disso o LEDs podem ser organizados em matrizes planas o que aumenta significativamente a área do feixe facilitando a aplicação em grandes áreas do corpo, sendo essa uma limitação do LBI que normalmente têm área do feixe menores e devido ao seu custo encarece essa possibilidade.²³

Os estudos na literatura incluindo os descritos aqui nesta contextualização utilizam principalmente a aplicação da FBM no local acometido ou lesionado. Com menos estudos, mas também com resultados importantes, existe a irradiação de sangue com laser intravascular (ILIB, do inglês "*intravascular irradiation of blood*") que objetiva efeitos sistêmicos. O ILIB vindo sendo estudado desde 1981 e foi desenvolvido para ser utilizado em tratamentos de doenças cardiovasculares com evidências de propriedades reológicas do sangue e melhora da microcirculação, demonstrando uma redução da área de infarto, das arritmias cardíacas e de morte súbita.²⁴

A técnica ILIB consiste de um cateter intravenoso introduzido em um dos membros superiores, geralmente na artéria radial, acoplado a uma fibra óptica que irradia o sangue com LBI, sendo utilizada principalmente no comprimento de onda vermelho e infravermelho. Contudo, devido a suas características invasivas a sua utilização ficou restrita, limitando a sua aplicação. Mais recentemente esta

técnica passou por modificação tornando-se um método não invasivo e simples de ser aplicado, sendo realizado de maneira transcutânea sobre vasos periféricos incluindo por exemplo a aplicação sobre a artéria radial,²⁵ sublingual.²⁶

A irradiação do sangue por LBI de forma transcutânea, tem demonstrado efeitos anti-inflamatórios e modulação da resposta imune sendo observada a influência positiva nas propriedades reológicas do sangue, tendência decrescente de agregação trombócitos, sendo a deformabilidade de eritrócitos potencializada que resulta em um suprimento de oxigênio mais eficaz e com isso melhora do processo de cicatrização. Além disso, foi comprovada a ativação de atividade fagocitária dos macrófagos em conjunto com modificações estruturais e também foi observada efeitos positivos sobre a proliferação de linfócitos e subpopulações de células B e T.²⁷

A irradiação sanguínea transcutânea a laser (ISTL) é frequentemente usada para irradiar áreas próximas a grandes vasos sanguíneos. É considerado um método seguro e não possui efeitos colaterais. A ISTL é fundamentada na modificação do sangue pela influência da luz do LBI o que promove uma melhora na regeneração, assim como na técnica de aplicação intravenosa a ISTL.²⁸ Além disso, também ocorre melhora da microcirculação, sobretudo nas estruturas do sistema nervoso central, especialmente no hipotálamo por possuir um micro sistema vascular altamente desenvolvido. A irradiação intravenosa estimula a atividade funcional do hipotálamo e do sistema límbico o que leva a ativação de processos hormonais, imunológicos, metabólicos e vegetativos com mobilização de reservas adaptativas.²⁹

Estudos que relatam o uso da FBMS em modelo *in vivo* possuem diferentes formas de aplicação e parâmetros dosimétricos, assim apresentando grande variação dos protocolos experimentais, dentre eles os que descrevem a irradiação da artéria e veia localizada na cauda de ratos.^{30 31 32} Os estudos apresentaram resultados no que concernem a redução da lipoperoxidação e do controle do balanço hídrico cardíaco e hepático da ISTL (633nm, 1mW, 2 min/sessão) em animais com hipotensão arterial,³⁰ a modulação hemodinâmica levando a redução em longo prazo da pressão sanguínea, diastólica e redução

da frequência cardíaca (780nm, 40mW, 90s, 30J/cm², 21 sessões) em modelo de ratos espontaneamente hipertensos.³¹

Adicionalmente, também é possível encontrar na literatura o uso da irradiação transcutânea da veia ou artéria auricular em modelos animais.^{33 34 35} Os estudos demonstraram a modulação dos níveis de colesterol total, LDL e HDL, reduzir a deformação dos eritrócitos, além de atuar de forma sistêmica reduzindo a esteatose hepática e o infiltrado inflamatório no fígado e baço da ISTL (650nm, 100mW, 30min, 45J/cm², 192 sessões) em coelhos com hipercolesterolemia e a melhor organização da epiderme e disposição das fibras colágenas próximas ao ideal após irradiação única (660nm; 3,213J/cm²; 6,426J; 900s; 1 ou 2 sessões) em modelo murino de reparo cutâneo.³⁴ Adicionalmente, Tanin et al. (1996) observaram que a irradiação em coelhos (628nm; 2-2,5mW; 10 min; 10 sessões) submetidos a lesão nervosa periférica do nervo ciático foi capaz de aumentar a produção de hemoglobina, trombócitos, albumina (normalizando os níveis de proteína total) e alterações na composição bioquímica com aumento dos níveis da enzima alanina aminotransferase (ALT), ureia, colesterol e redução da creatinina.³³

Contudo, estudos utilizando protocolos com FBMS ainda não foram conduzidos em LNP, sendo necessário preencher esta lacuna visando a padronização de um protocolo que garanta uma recuperação da motricidade, sensibilidade e trofismo muscular que podem gerar sequelas incapacitantes aos indivíduos acometidos.

1.4. Instrumentos de avaliação após LNP

Uma serie de métodos avaliativos tem sido utilizada para mensurar a recuperação funcional e o reparo do tecido neural após a LNP de ciático em animais.

O IFC é um método quantitativo e não invasivo largamente utilizado para avaliar a pegada do animal, que leva em consideração as relações entre a distância dos dedos dos pés e entre as patas traseiras, onde é feita a medida do comprimento médio da pegada, a extensão dos dedos e extensão dos dedos do meio com o calcâneo, obtidas através das pagadas tingidas por tinta lavável impressas em folha pautada. Os animais são induzidos a caminhar em uma trilha

padronizada com uma casa escura no final e durante essa caminhada é onde obtemos as pegadas. O método foi desenvolvido por De Medinaceli et al. (1982), sendo modificado por e Bain et al. (1989).³⁶

Para avaliar as funções sensoriais, podem ser utilizadas ferramentas como o teste de Von Frey, bem como o reflexo plantar do membro posterior, pensado para ser um indicador do envolvimento do trato corticoespinal.³⁷ Von Frey desenvolveu estudos para avaliar a hiperalgesia utilizando monofilamentos, onde eram utilizados pelos de cavalo de diferentes diâmetros para avaliar a sensibilidade tátil e pressão no final de 1800. A técnica desenvolvida por Von Frey passou por aprimoramentos estabelecidos por vários pesquisadores, dentre eles Weinstein et al. (1993), que provaram a possibilidade de utilizar um número menor de monofilamentos sem que houvesse desvantagens no resultados obtidos quando comparado com a técnica de Von Frey, sendo eles os primeiros a introduzirem os monofilamentos de náilon.³⁸ Posteriormente foi transformada em um método eletrônico usado primeiramente em humanos ³⁹ e posteriormente em ratos.⁴⁰ Este teste consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão à pata dos animais é realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro. Os animais são colocados em caixas de acrílico, sob uma tela de arame durante 20 minutos antes do experimento para ambientação e é percutido 3 vezes com o transdutor na região a ser avaliada.⁴¹

Além dos instrumentos que avaliam de forma funcional a marcha (IFC) e a função sensorial, a avaliação morfológica dos tecidos envolvidos, ou seja, nervoso e muscular, nos permitem analisar a evolução do processo de reparo e as adaptações decorridas desde a LNP. Neste contexto existem diferentes análises que podem ser uteis como grau de atrofia muscular (área de secção transversa da fibra), deposição e organização de colágeno dentre outros. As análises morfológicas podem ser realizadas de diversas formas incluindo a coloração por hematoxilina e eosina, tricoma de massom, tetróxido de ósmio e azul de toluidina. A coloração histológica mais utilizada para análises morfométricas e morfológicas é a hematoxilina e eosina (HE), uma vez que a hematoxilina colore os núcleos de roxo e a eosina (rosa/vermelha) contrasta a

coloração nuclear, corando as estruturas eosinofílicas, como as fibras musculares.⁴²

1.5. Justificativa

A LNP pode gerar um impacto negativo na qualidade de vida dos indivíduos em decorrência das sequelas incapacitantes.^{1 43} 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. Estudos prévios desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram os efeitos positivos no que se refere a reparo muscular, a funcionalidade da marcha, sensibilidade mecânica e massa muscular, sendo estes potencializados quando a aplicação foi realizada no local da lesão.^{9 10} Entretanto, o objetivo deste trabalho difere no sentido de utilizar a aplicação de forma sistêmica que pode modular todos os tecidos e respostas envolvidos no reparo neuro muscular podendo ser favorável ao processo de reparo nervoso e muscular após a LNP. Vale ressaltar que utilizando a FBMS em estudo prévio, do nosso grupo de pesquisa, de lesão muscular aguda foi possível verificar efeitos positivos para o reparo muscular na redução do edema, mionecrose e no aumento de novas fibras musculares, assim como na redução dos marcadores bioquímicos creatina quinase (CK), alanina aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) e lactato a níveis semelhantes ao comportamento dos animais não lesionados.⁴⁴

2. OBJETIVO

2.1. Geral

- Comparar os efeitos da FBM sistêmica com LBI e LED após lesão nervosa periférica.

2.2. Específicos

Comparar os efeitos da FBM sistêmica com LBI e LED após lesão nervosa periférica induzida por compressão no que se refere a:

- Função motora (IFC);
- Sensibilidade dolorosa (von Frey);
- Trofismo muscular ($r=E/D$);
- Morfologia muscular (AST e diâmetro da fibra muscular).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no laboratório de pesquisa, localizado na Universidade Nove de Julho (UNINOVE), após aprovação do comitê de ética animal Nº 3249161020.

3.1. Ética

Os procedimentos e cuidados com os animais foram realizados por pessoas treinadas e conduzidos de acordo com o “Guidelines for the care and use of laboratory animals” (8th edition, National Academy Press, Washington D. C., 2011). Foram tomadas as medidas apropriadas para minimizar a dor, desconforto e estresse dos animais.

3.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 12 semanas de idade, pesando entre 300-350g, provenientes do biotério na Universidade Nove de Julho (UNINOVE). Os animais foram alocados em gaiolas de polipropileno em ambiente com temperatura controlada entre 22 e 25°C, ciclo claro/escuro de 12h:12h, sem restrição de água e comida e de fácil alcance.

3.3. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em 4 grupos, as avaliações funcionais foram realizadas no dia 7, 14 e 21, após indução da LNP e eutanásia após 7, 14 e 21 dias da LNP.

Grupo Controle: os animais não foram submetidos a nenhum procedimento (n=5 animais);

Grupo Lesão: os animais foram submetidos à LNP por compressão, porém não foram tratados (n=15 animais, sendo eutanasiados 5 animais com 7 dias, 5 animais com 14 dias e 5 animais com 21 dias);

Grupo LED sistêmico: os animais foram submetidos à LNP por compressão e receberam tratamento com LED (850nm, 40mW, 3,2J em um único ponto)

sistêmico, (n=15 animais, sendo eutanasiados 5 animais com 7 dias, 5 animais com 14 dias e 5 animais com 21 dias);

Grupo LBI sistêmico: os animais foram submetidos à LNP por compressão e receberam tratamento com LBI (780nm, 40mW, 3,2J em um único ponto) sistêmico, (n=15 animais, sendo eutanasiados 5 animais com 7 dias, 5 animais com 14 dias e 5 animais com 21 dias);

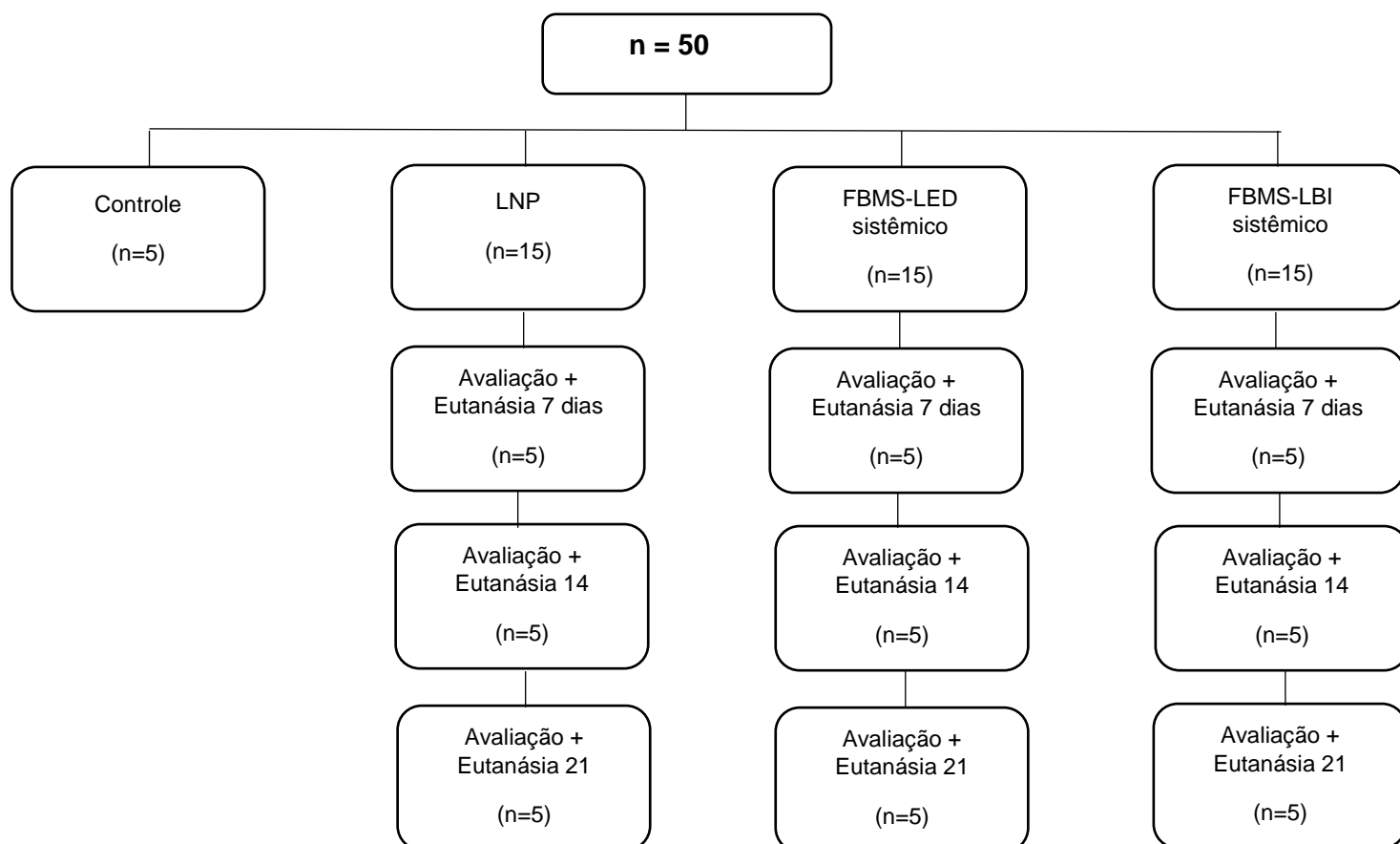


Figura 1: Grupos experimentais, tratamentos e análise realizadas.

3.4. Procedimento cirúrgico

O procedimento de esmagamento do nervo isquiático foi realizado conforme descrito por Belchior et al. (2009),⁴⁵ e Andreo et al. (2017).¹⁰ Após a aclimatização dos animais, estes serão pesados e submetidos à anestesia com injeção intraperitoneal utilizando 1 ml/kg de 1% ketamina HCL (Dopalen,

Vetbrands, São Paulo, Brasil) e 2% xilazina (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). 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, o esmagamento foi realizado 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 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.

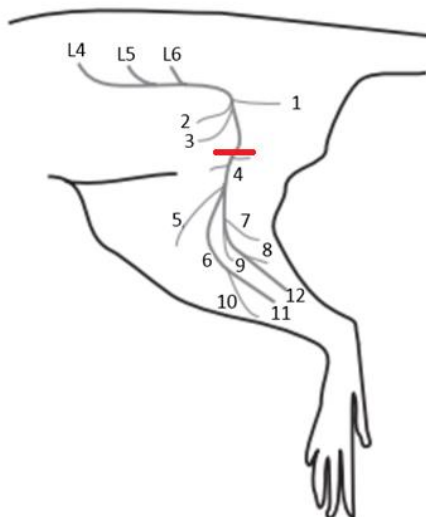


Figura 2: Demonstração do local de esmagamento do nervo isquiático (em vermelho) (adaptado de Hebel e Stromberg, 1986).

Nos quatro primeiros dias de pós-operatório, foram administrados cloridrato de tramadol (5mg/kg de peso animal) e dipirona (50mg/kg peso animal) 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).

3.5. FBMS

A FBMS foi realizada com base nos parâmetros descritos anteriormente por Andreo et al.⁹ para a irradiação área de LNP, 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 FBMS

Meio ativo	Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)	Diodo Emissor de Luz (LED)
Local de irradiação	Sistêmico na cauda	Sistêmico na cauda
Comprimento de onda	780nm	850nm
Área do feixe	0.04cm ²	2.84cm ²
Potência média	40mW	40mW
Densidade de potência	1W/cm ²	0,04W/cm ²
Densidade de energia	10J/cm ²	0,4J/cm ²
Total de pontos	1 ponto	1 ponto
Tempo por ponto	80s	80s
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. 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 FBMS 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.^{46 47} Foi utilizada a técnica pontual de um único ponto diretamente sobre a base da cauda de cada animal.

3.6. Avaliações

3.6.1. Análise funcional da marcha

A análise funcional de marcha foi realizada utilizando o IFC, descrito anteriormente por Bain 1989.⁴⁸ Para obtenção das pegadas, as patas foram tingidas em tinta, deixando a cor impressa nas tiras de pautada.

Os animais aprenderam a caminhar na passarela antes do procedimento cirúrgico. A confecção do dispositivo foi realizada seguindo o método de De Medinaceli et al. fechada nas laterais, contendo uma casinhola no final (figura 3).⁴⁹

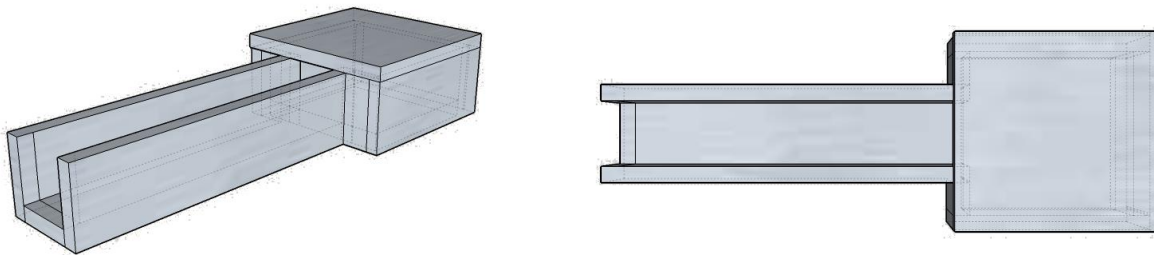


Figura 3: Vista isométrica e vista superior do modelo da passarela utilizado para o IFC (desenhado com o SketchUp make, versão 15.3.331, 2015, Trimble Navigation Limited).

As impressões das patas foram digitalizadas e analisados os parâmetros sugeridos por Bain et al., conforme figura 4: 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*).

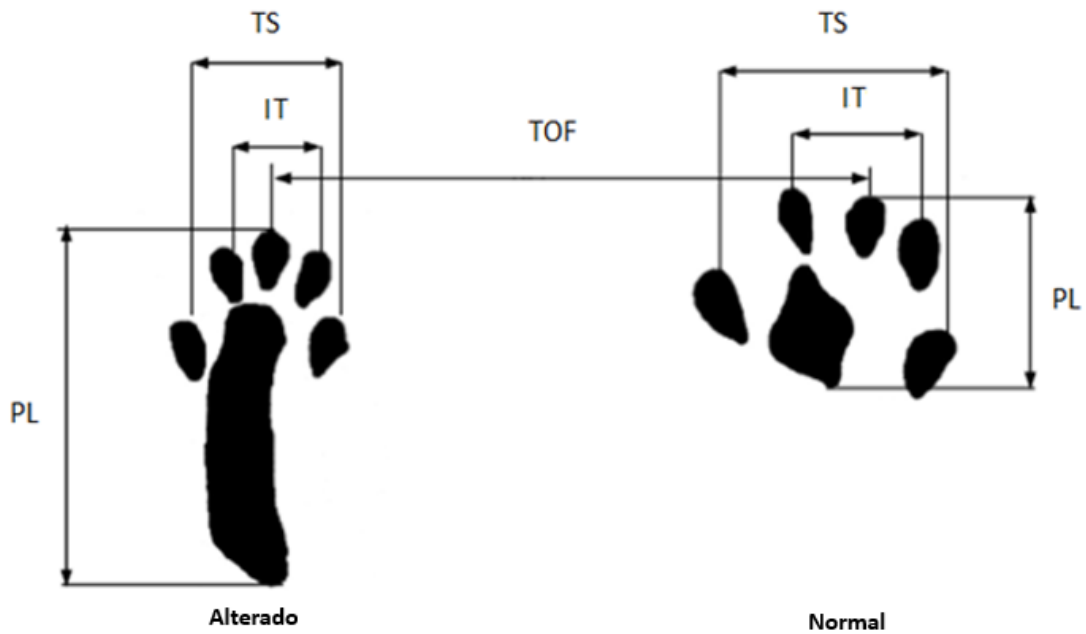


Figura 4: Representação dos parâmetros obtidos para cálculo do IFC, da esquerda para a direita estão representadas as patas do nervo lesionado e normal.

O IFC foi calculado a partir da fórmula:

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

$$IFT = -37,2 \times \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 104,4 \times \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 45,6 \times \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8,8$$

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

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. ⁴⁸

3.6.2. 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. ⁵⁰ Os animais foram acondicionados em uma caixa transparente sobre uma tela de arame para acesso à superfície plantar da pata 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 pudesse 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 3 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. ⁵⁰

3.6.3. Análise da massa muscular

Após a eutanásia dos animais nos diferentes períodos de análise, os músculos TA direito e esquerdo serão cuidadosamente removidos por meio da ressecção do tendão de origem e da inserção óssea e limpos conforme descrito anteriormente. ⁵¹ Os músculos foram pesados em uma balança semi-analítica e para cada animal será 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).⁵¹

3.6.4. 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 serão 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 serão 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 serão 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 serão consideradas 5 áreas por lâmina de 3 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.

3.7. Eutanásia

Os animais foram eutanasiados com superdose de anestésico a base de ketamina 10% (400 mg/Kg de peso do animal) e de xylazina 2% (40 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.

Os músculos TA foram removidos e pesados para análise da massa muscular e o TAE foi seccionado transversalmente, a porção inferior será utilizada para análises histológica.

3.8. 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% ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Análise funcional da marcha

A avaliação funcional da marcha pelo IFC evidenciou no grupo controle resultados dentro do padrão de normalidade mais próximos de zero. Todos os grupos lesionados com e sem tratamento (LNP, FMBS-LED e FBMS-LBI) apresentaram redução nos escores de IFC e apresentaram diferença estatisticamente significantes em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) nos dias 7 e 14 (figura 5). Foi observado em 7 dias redução entre grupo LNP e FBMS-LED em relação ao grupo FMBS-LBI, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (figura 5). Após 14 dias houve redução significativa dos valores entre o grupo LNP comparado com grupo FBMS-LBI ($p < 0,05$) (figura 5). Aos 21 dias houve redução significativa dos valores entre o grupo LNP comparado com grupo controle e grupo FBMS-LBI ($p < 0,05$) (figura 5).

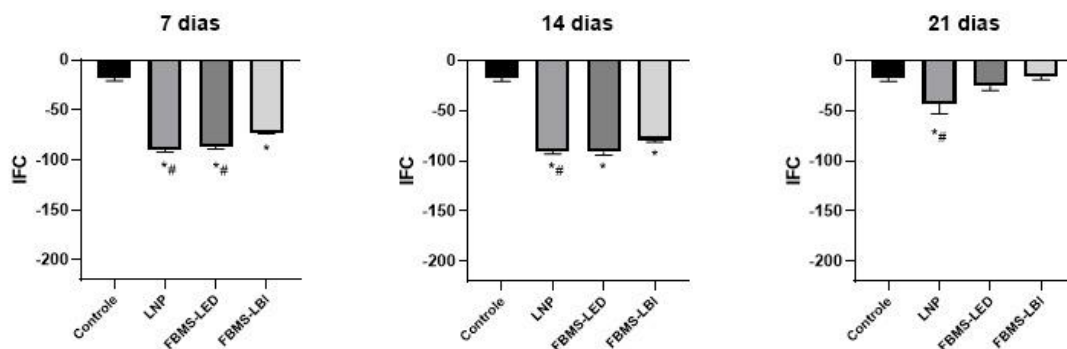


Figura 5 – Efeitos da FBMS sobre o IFC de ratos Wistar pós LNP de nervo isquiático após 7, 14 e 21 dias. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Controle e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo laser.

4.2. Análise da Sensibilidade

A análise de nocicepção utilizando o teste de von Frey permitiu verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em 7 e 21 dias (Figura 6). Em 14 dias o grupo FBMS-LBI apresentou redução significativa ($p < 0,05$) da pressão necessária para a sensibilidade nociceptiva em comparação com o grupo somente lesão (LNP), demonstrando melhora na sensibilidade dolorosa.

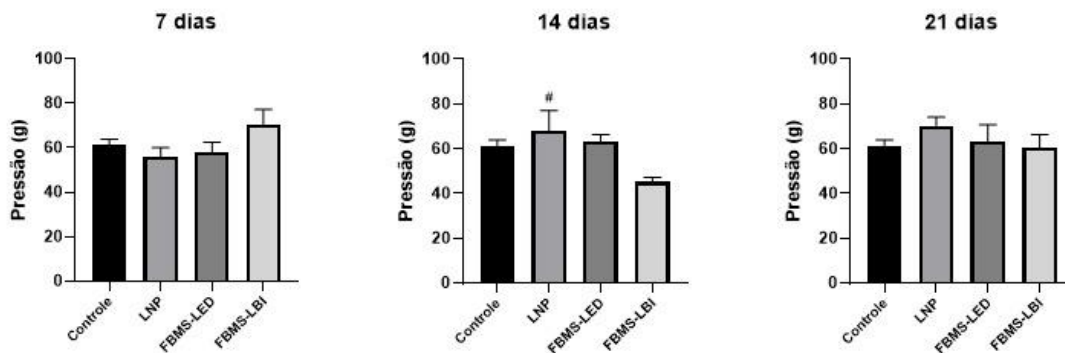


Figura 6 – Efeitos da FBMS sobre a nocicepção de ratos Wistar pós LNP de nervo isquiático após 7, 14 e 21 dias. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo laser.

4.3. Análise da massa muscular

Os resultados da análise da massa muscular avaliada por meio da relação entre o músculo tibial anterior esquerdo e direito encontram-se na figura 7. O grupo controle apresentou valores dentro do padrão de normalidade esperado próximo de 1. Em 7 dias o grupo FBMS-LBI apresentou razão esquerdo/direito menor quando comparado ao grupo controle, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Após 14 e 21 dias houve redução da razão esquerdo/direito de todos os grupos lesionados (LNP, FMBS-LED e FBMS-LBI) comparado com o grupo controle, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Não foram encontradas nestes dois últimos períodos de análise diferenças significativas entre o grupo somente LNP em comparação aos grupos que receberam FBMS com LBI ou LED. Figura 7)

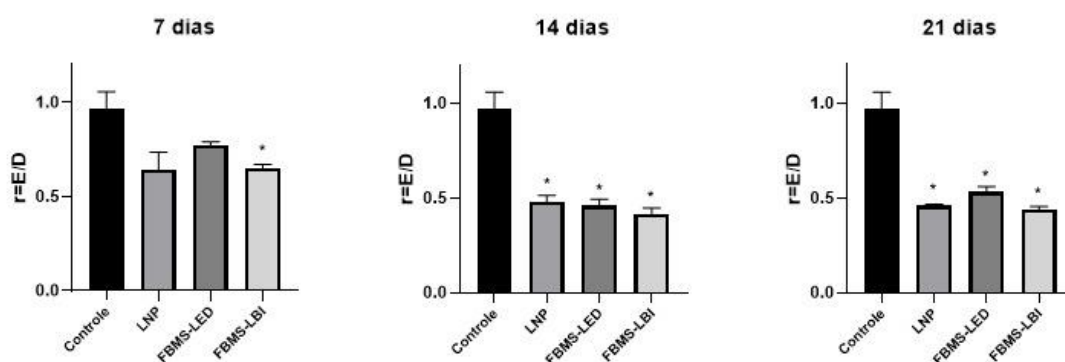


Figura 7 – Efeitos da FBMS sobre a atrofia muscular ($r = E/D$) de ratos Wistar pós LNP de nervo isquiático após 7, 14 e 21 dias. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.4. Efeitos da FBM sobre a morfologia muscular

Na figura 8 encontram-se as imagens de histologia obtidas após coloração por HE dos diferentes grupos experimentais. Como esperado o grupo Controle apresentou núcleos periféricos com as fibras musculares poligonais organizadas por endomísio e perimísio como esperado (Figura 8). Após 7 dias o grupo LNP demonstrou um aumento do espaço intersticial, maior evidência das fibras anguladas bem como um menor diâmetro e área das fibras musculares quando comparados aos grupos FBMS-LED e FBMS-LBI, nos demais períodos todos os grupos experimentais apresentaram esta mesma evolução (atrofia muscular, aumento do interstício, maior deposição de colágeno e fibras anguladas) de maneira similar.

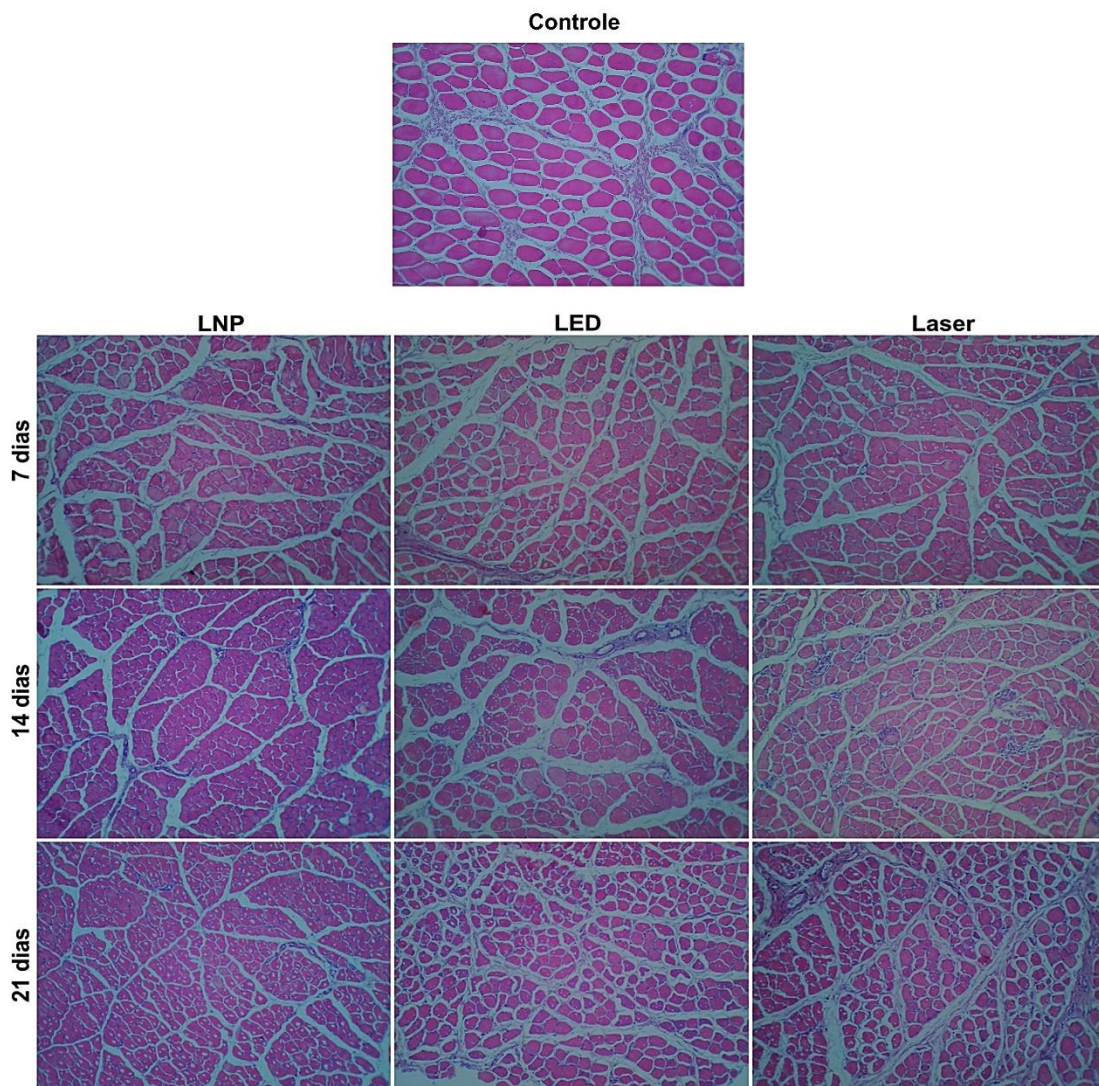


Figura 8 – Fotomicrografias dos músculos em cortes transversais corados com hematoxilina e eosina (400X)

Os resultados de diâmetro da fibra muscular (Figura 9) nos períodos 7, 14 e 21 dias permitiram verificar uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos lesionados (LNP, FBMS-LED e FBMS-LBI). Em 14 dias o grupo FBMS-LED apresentou um aumento no diâmetro das fibras em relação ao grupo somente lesão (LNP). Em 21 dias não foram observadas diferenças significativas entre os grupos LNP e que receberam LED ou LBI.

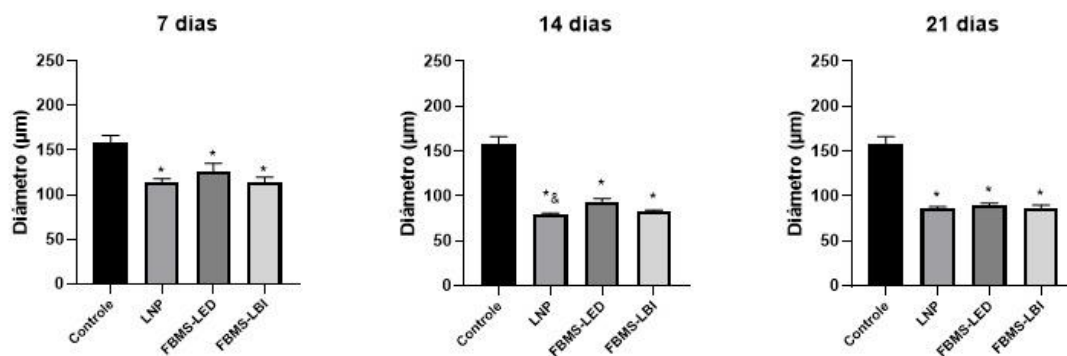


Figura 9 – Efeitos da FBMS sobre o diâmetro das fibras musculares de ratos Wistar pós LNP de nervo isquiático após 7, 14 e 21 dias. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LED.

Os resultados da análise de AST das fibras musculares (Figura 10) permitiram verificar que após 7 dias houve um aumento significativo da AST nos grupos irradiados (FBMS-LED e FBMS-LBI) em comparação ao grupo LNP sem tratamento. Contudo após 14 e 21 dias não houve diferença na AST entre o grupo LNP e os submetidos a FBMS com LBI ou LED.

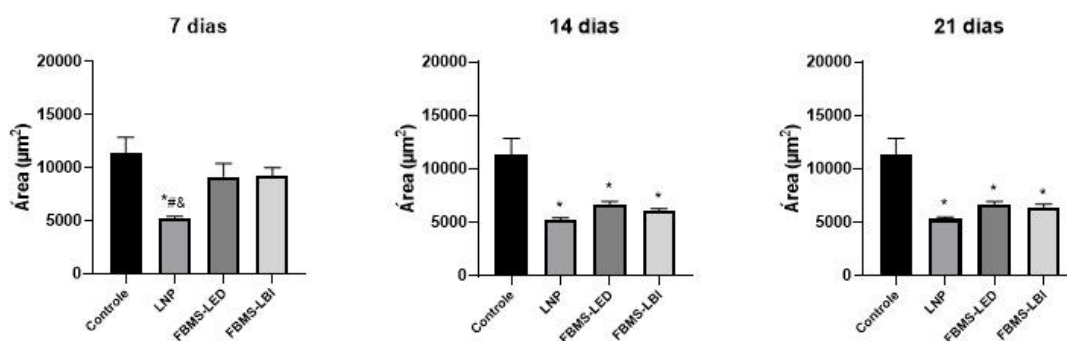


Figura 10 – Efeitos da FBMS sobre área de secção transversal das fibras musculares de ratos Wistar pós LNP de nervo isquiático após 7, 14 e 21 dias. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Laser e & $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LED.

5. DISCUSSÃO

Esse estudo teve como objetivo central identificar os efeitos da FBMS utilizando diferentes fontes de luz (LED e LBI) em ratos submetidos a LNP. Estudos anteriores demonstraram efeitos benéficos na utilização da FBM local no tratamento da LNP incluindo maior recuperação motora e sensitiva, trofismo muscular, modulação na expressão gênica de fatores regulatórios miogênicos e receptores nicotínicos de acetilcolina. A proposta do presente estudo foi verificar como a aplicação transcutânea de diferentes fontes de luz (FBMS) poderiam influenciar o reparo neuromuscular após LNP visto que os efeitos locais tanto da FBM sobre o reparo muscular pós lesão aguda e sobre o reparo nervoso pós LNP já foram evidenciados em estudos prévios conduzidos por nosso grupo de pesquisa.

O IFC é o padrão ouro para avaliar a função do nervo ciático,⁵² porém foram relatadas algumas dificuldades na hora de realizar a avaliação em ratos. A LNP pode resultar em automutilação da parte desnervada em roedores, esse comportamento é denominado autotomia e pode ser causado devido a disestesia dolorosa que se projeta para os três dedos laterais do pé,⁵³ além disso outros problemas foram relatados que podem prejudicar a avaliação dos resultados como desenvolvimento de contraturas em flexão, manchas e arrastamento da cauda na impressão.^{54 55} No nosso estudo pudemos observar autotomia em 2 animais do grupo LNP 21 dias, o primeiro apresentando automutilação com 16 dias e o segundo com 18 dias da lesão e não foram utilizados para análise dos dados.

No presente estudo foi possível observar no teste de IFC uma melhora na recuperação do movimento estatisticamente significativa no grupo irradiado com LBI sistêmico em comparação ao grupo LNP sem tratamento em todos os períodos avaliados e aos 7 dias houve uma melhora funcional estatisticamente significativa em comparação ao grupo irradiado com o LED. Contudo vale ressaltar que a FBMS com LED mostrou uma tendência a resultados positivos neste índice em 21 dias em relação ao grupo LNP sem tratamento e mesmo não sendo estatisticamente significativa esse achado nos desperta interesse em buscar resultados em período superior a 21 dias. Assim, ambas as fontes de luz

utilizadas de maneira sistêmica demonstraram efeitos positivos na funcionalidade de marcha após LNP sendo os resultados para o LBI mais pronunciados e precoces, sendo esse nosso resultado mais expressivo encontrado em nosso estudo. Estes resultados estão em concordância com o estudo realizado em 2013 por Marcolino et al.⁵⁶ que demonstraram que o tratamento local com LBI (830nm, 30mW, 10/40/80J/cm²) apresentou melhora no IFC no após 7º de LNP por esmagamento do nervo isquiático dia entre os grupos irradiados com 40J/cm² e o grupo simulado (P <0,05) e no período de 14 dias, os grupos irradiados com tanto com 40J/cm² quanto com 80 J/cm² também apresentaram resultados melhores em relação ao grupo simulado; porém, com 21 dias não houve diferença entre os grupos (p<0,05), o que difere dos presentes achados que evidenciaram melhora funcional após LNP do nervo isquiático ainda em 21 dias no grupo irradiado com LBI sistêmico. Em adição, o estudo de Belchior et al. em 2009⁴⁵ a FBM local por LBI (660nm, 26,3mW, 4J/cm²) após LNP por esmagamento, mostrou resultados significativamente positivos sobre a recuperação funcional do nervo ciático após três semanas de tratamento corroborando com os nossos achados. Outro estudo de Marcolino et al, em 2010⁵⁷ a intervenção LBI local (830nm, 30mW, 4J/cm²) se mostrou capaz de acelerar a recuperação da marcha nas 2 primeiras semanas após LNP por esmagamento do nervo isquiático e Barbosa et. al, 2010 apresentaram melhora na recuperação funcional da marcha (P <0,05) em 14 dias após a LNP em relação ao grupo de controle através do LBI local (660/830nm, 30mW, 10J/cm²) após esmagamento do nervo isquiático. Considerando o IFC, os resultados da FBM local demonstraram uma variação temporal entre 7 e 14 dias para os melhores resultados nos índices de recuperação funcional.

Serafim et al,⁵⁸ desenvolveram um estudo utilizando LED (940nm, 9,5mW, 4J/cm²) local com distância de 1 cm entre a fonte emissora de luz e o local de irradiação em que analisaram o IFC, edema e contagem de células mononucleares e obtiveram resultados estatisticamente significantes em todas as variáveis analisadas incluindo a redução da migração de células mononucleares para o tecido lesionado, uma redução de edema e da degeneração das fibras nervosas, e um aumento dos escores de recuperação funcional nos períodos de 7, 14 e 21 dias sugerindo que a FBM com comprimento

de onda de 940nm melhora a recuperação morfofuncional e a regeneração nervosa. Estes resultados estão em concordância com os encontrados no presente estudo contudo não foi avaliada a AST das fibras musculares e como demonstrado a FBMS induziu um aumento no diâmetro das fibras musculares, fato este importante que reflete a recuperação neuromuscular e sugerindo que os estudos incorporem este tipo de avaliação que permite avaliar a interação entre as células do sistema imune e tecido muscular.

Em se tratando da sensibilidade avaliada através do teste de Von Frey, o grupo FBMS-LBI apresentou o melhor resultado uma vez que uma menor pressão foi necessária para a resposta de retirada da pata do animal, assim como demonstrado por Andreo et al (2019) que evidenciaram também uma menor pressão necessária para retirada após 7 dias quando irradiado com LBI local (780nm, 40mW, 3.2J de energia total em 4 pontos) na área correspondente à LNP. Devido ao LED ser uma luz não colimada, não coerente e não estar com as ondas em fase isso pode alterar a resposta tecidual pois a energia é mais dispersa ao longo do tecido, podendo esta ser uma justificativa para os diferentes resultados entre os dois grupos. Efeitos fotobiomodulatórios sobre a sensibilidade mecânica são importantes, uma vez que alterações sensitivas podem levar a sequelas incapacitantes que afetam diretamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos por uma LNP.⁹

O estudo de Gigo-Benato et al. (2010) investigou os efeitos da FBM (660 e 780nm, 40mW, 10/60/120J/cm²) sobre o IFC, histologia, morfometria e zimografia do nervo ciático e músculo tibial anterior após LNP por esmagamento do nervo isquiático, provou que houve recuperação das fibras musculares, mielina e fibras nervosas em comparação com o grupo de controle quando utilizado comprimento de onda de 660 nm tanto com 10J/cm² ou 60J/cm².⁵⁹ Em adição esses autores verificaram que a terapia FBM com 780nm não evitou a atrofia das fibras musculares e a recuperação da função nos grupos irradiados comparados ao grupo não tratada.⁵⁹ Os resultados presentes diferem um pouco destes autores uma vez que os grupos irradiados tanto com LBI quando com LED obtiveram resultados melhores em relação ao grupo LNP sem tratamento no que se refere a um retardo na perda de AST. Contudo em 14 e 21 dias ambas as fontes de luz não foram capazes de retardar a perda da AST ficando os

valores próximos ao grupo LNP sem tratamento e reduzidos em relação ao grupo controle. Shen et al (2013) utilizaram FBM local com LBI (660nm, 50mW, 2 min, diariamente por 10 dias, próximo à área de lesão nervosa) em modelo de LNP por transecção seguida de tubulização em ratos Wistar e demonstraram uma redução da atrofia muscular no grupo desnervado e tratado com LBI quando comparado ao grupo não irradiado, além desse achado, foi observado na análise histológica maior regeneração neural associada à um aumento da área nervosa, no diâmetro da fibra nervosa, maior número de fibras nervosas, do diâmetro axonal e da espessura da bainha de mielina avaliados 12 dias após lesão.⁵¹ Andreo et. al., (2019) utilizaram o mesmo modelo de LNP do presente estudo e verificaram que no período após uma semana os grupos lesionados apresentaram diminuição no diâmetro e área de secção transversa de forma progressiva em 1, 2, 3 semanas seguido por um aumento do diâmetro das fibras musculares na semana 4. Os grupos irradiados localmente (780nm, 40mW, 3.2J de energia total em 4 pontos ao redor da área de lesão nervosa) apresentaram aumento no diâmetro da fibra muscular e na AST em 3 e 4 semanas e os grupos irradiados no musculo apresentaram um aumento já em 2 semanas na AST.⁹ Os presentes resultados demonstraram que a FBMS utilizando ambas fontes de luz, LBI e LED, mostrou ser capaz de manter a AST próximo aos valores do grupo controle sem lesão após 7 dias contudo após este período todos os grupos lesionados com ou sem tratamento apresentaram valores semelhantes, sem diferença estatística.

A FBMS tanto com LED quanto com LBI mostraram resultados promissores para o tratamento de LNP nas 2 primeiras semanas após a lesão, sendo uma alternativa ao método de aplicação local, sendo esse o primeiro o primeiro estudo no seguimento. A FBMS-LBI mostrou eficiente na melhora na função em 7 e em 14 dias, já a FBMS-LED mostraram resultados positivos reduzindo a algia e aumentando diâmetro das fibras musculares em 14 dias e ambos os tratamentos (FBMS-LED e FBMS-LBI) demonstraram que postergam a perda da AST em 7 dias sendo uma alternativa no tratamento agudo de LNP.

Partindo dessas análises podemos concluir que o grupo com melhor desempenho foi FBMS-LBI, demonstrando uma melhora importante na recuperação funcional motora retornando ao padrão de normalidade encontrado

no grupo controle, contudo ainda são necessárias maiores avaliações dos mecanismos de ação como expressão gênica e proteica dos fatores regulatórios miogênicos, receptores nicotínicos de acetilcolina, fatores neurotróficos e infiltrado inflamatório no local da lesão. A partir destes resultados poderia ser concluído os eventuais mecanismos de ação que interferem na regeneração nervosa pós esmagamento do nervo isquiático.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, foi evidenciado que a FBMS se mostrou eficiente na melhora da sensibilidade, do trofismo muscular e principalmente na recuperação funcional motora após LNP quando tratado com FBMS sendo os resultados mais pronunciados quando utilizado o LBI.

7. Referência

1. Taylor, C. A. & Rice, J. B. The Incidence of Peripheral Nerve. 381–385 (2008). doi:10.1097/PHM.0b013e31815e6370
2. Atkins, S. *et al.* Scarring impedes regeneration at sites of peripheral nerve repair. *Neuroreport* **17**, 1245–1249 (2006).
3. Wang, M. L. *et al.* Peripheral nerve injury , scarring , and recovery. *Connect. Tissue Res.* **60**, 3–9 (2019).
4. Sullivan, R., Dailey, T., Duncan, K., Abel, N. & Borlongan, C. V. Peripheral Nerve Injury : Stem Cell Therapy and Peripheral Nerve Transfer. (2016). doi:10.3390/ijms17122101
5. Menorca, R. M. G., Fussell, T. S. & Elfar, J. C. Peripheral Nerve Trauma: Mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin.* **29**, 317–330 (2013).
6. Rigoard, P. *et al.* Anatomy and physiology of the peripheral nerve. *Neurochirurgie* **55**, S3–S12 (2009).
7. Nave, K. & Werner, H. B. Myelination of the Nervous System : Mechanisms and Functions. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013101
8. Chen, P., Piao, X. & Bonaldo, P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol.* **130**, 605–618 (2015).
9. Andreo, L. *et al.* Effects of Photobiomodulation on Functionality in Wistar Rats with Sciatic Nerve Injury. 879–885 (2019). doi:10.1111/php.13048
10. Andreo, L., Soldera, C. B., Ribeiro, B. G., Matos, P. R. V. De & Bussadori, S. K. Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury. (2017).
11. Sasso, L. L. *et al.* Photobiomodulation in sciatic nerve crush injuries in rodents: A systematic review of the literature and perspectives for clinical treatment. *J. Lasers Med. Sci.* **11**, 332–344 (2020).
12. Martinelli, S. A. *et al.* Effects of Photobiomodulation with Low-level Laser Therapy on Muscle Repair Following a Peripheral Nerve Injury in Wistar Rats. (2020). doi:10.1111/php.13255
13. Lien, S. C., Cederna, P. S. & Kuzon, W. M. Optimizing Skeletal Muscle Reinnervation with Nerve Transfer. *Hand Clin.* **24**, 445–454 (2008).
14. Rowan, S. L. *et al.* Denervation Causes Fiber Atrophy and Myosin Heavy Chain Co-Expression in Senescent Skeletal Muscle. **7**, (2012).

15. Ashley, Z. *et al.* Atrophy , but not necrosis , in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year. (2007). doi:10.1152/ajpcell.00085.2006.
16. Kostrominova, T. Y. *et al.* Comparison of gene expression of 2-mo denervated , 2-mo stimulated-denervated , and control rat skeletal muscles. 227–243 (2019).
17. Wu, R. H. *et al.* A potential indicator of denervated muscle atrophy : the ratio of myostatin to follistatin in peripheral blood. **10**, 3914–3923 (2011).
18. Rochkind, S., Geuna, S. & Shainberg, A. *PHOTOTHERAPY IN PERIPHERAL NERVE INJURY : EFFECTS ON. International Review of Neurobiology* **87**, (Elsevier Inc., 2009).
19. Pedram, M. S. *et al.* PT CR. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* #pagerange# (2018). doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.09.022
20. Hu, D., Zhu, S. & Potas, J. R. Red LED photobiomodulation reduces pain hypersensitivity and improves sensorimotor function following mild T10 hemiconfusion spinal cord injury. *J. Neuroinflammation* **13**, 1–15 (2016).
21. Mandelbaum-livnat, M. M., Almog, M. & Nissan, M. Photobiomodulation Triple Treatment in Peripheral Nerve Injury : **34**, 638–645 (2016).
22. Manuscript, A. & Nuts, T. Nihms339992. **40**, 516–533 (2013).
23. Heiskanen, V. & Hamblin, M. R. Photobiomodulation: Lasers: vs. light emitting diodes? *Photochem. Photobiol. Sci.* **17**, 1003–1017 (2018).
24. Isabella, A. P. J. *et al.* Effect of irradiation with intravascular laser on the hemodynamic variables of hypertensive patients: Study protocol for prospective blinded randomized clinical trial. *Medicine (Baltimore)*. **98**, e15111 (2019).
25. Felipe, R. *et al.* ILIB (intravascular laser irradiation of blood) as an adjuvant therapy in the treatment of patients with chronic systemic diseases — an integrative literature review. (2020).
26. Silva, T. *et al.* PLOS ONE Effects of photobiomodulation on interleukin-10 and nitrites in individuals with relapsing- remitting multiple sclerosis – Randomized clinical trial. 1–13 (2020). doi:10.1371/journal.pone.0230551
27. Momenzadeh, S. *et al.* The intravenous laser blood irradiation in chronic pain and fibromyalgia. *J. Lasers Med. Sci.* **6**, 6–9 (2015).
28. Kilik, R. *et al.* Proteomic Analysis of Plasma Proteins after Low-Level

- Laser Therapy in Rats. **68**, (2019).
29. Brill, GE, Grigoriev, SN and Romanova, T. Changes of leucocytes metabolism in He—Ne laser blood irradiation in vitro. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 1689–1699 (2017).
 30. Roshchina, A. A. *et al.* Water Status and LPO in Rat Tissues during Massive Blood Loss and Irradiation with He-Ne Laser. 136–138 (2003).
 31. Tomimura, S. *et al.* Brief Communication Hemodynamic Effect of Laser Therapy in Spontaneously Hypertensive Rats. 161–164 (2014).
doi:10.5935/abc.20140117
 32. Amjadi, A., Mirmiranpour, H., Sobhani, S. O. & Goudarzi, N. M. Intravenous laser wavelength radiation effect on LCAT , PON1 , catalase , and FRAP in diabetic rats. (2019).
 33. Tanin L V., Petrovsky GG, T. R. Blood-stimulatory and biochemical effects of intravenous laser irradiation of blood with low-active laser radiation in rabbits with peripheral nerve damage. *Proc SPIE - Int Soc Opt Eng.* **2922**, 406–413 (1996).
 34. Wang, H. *et al.* The hematologic effects of low intensity 650 nm laser irradiation on hypercholesterolemia rabbits. **8**, 2293–2300 (2016).
 35. Ramos, F. S. *et al.* The effects of transcutaneous low-level laser therapy on the skin healing process: an experimental model. *Lasers Med. Sci.* **33**, 967–976 (2018).
 36. Paula, A. A., Nicolau, R. A., Lima, M. de O., Salgado, M. A. C. & Cogo, J. C. “Low-intensity laser therapy effect on the recovery of traumatic spinal cord injury”. *Lasers Med. Sci.* **29**, 1849–1859 (2014).
 37. Kjell, J. & Olson, L. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. *Dis. Model. Mech.* **9**, 1125–1137 (2016).
 38. Weinstein, S. Fifty years of somatosensory research: From the Semmes-Weinstein Monofilaments to the Weinstein Enhanced Sensory Test. *J. Hand Ther.* **6**, 11–22 (1993).
 39. Jensen, K., Andersen, H. Ø., Olesen, J. & Lindblom, U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. *Pain* **25**, 313–323 (1986).
 40. Ängeby Möller, K., Johansson, B. & Berge, O. G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *J. Neurosci.*

- Methods* **84**, 41–47 (1998).
41. Vivancos, G. G. *et al.* An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **37**, 391–399 (2004).
 42. Guardiola, O. *et al.* Induction of acute skeletal muscle regeneration by cardiotoxin injection. *J. Vis. Exp.* **2017**, 1–6 (2017).
 43. Eser, F., Aktekin, L. A., Bodur, H. & Atan, Ç. Etiological factors of traumatic peripheral nerve injuries. **57**, (2009).
 44. Lopez, T. Análise dos efeitos da fotobiomodulação sistêmica no reparo muscular. *Univ. Nove Julho* (2020).
 45. Carulina, A. & Belchior, G. Influence of laser (660 nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. 893–899 (2009). doi:10.1007/s10103-008-0642-3
 46. Silva-Couto, M. A. *et al.* Effects of low-level laser therapy after nerve reconstruction in rat denervated soleus muscle adaptation. *Brazilian J. Phys. Ther.* **16**, 320–327 (2012).
 47. Alves, A. N. *et al.* Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med. Sci.* **29**, 813–821 (2014).
 48. Bain. Bain Et Al.1989.Pdf.
 49. de Medinaceli, L., Freed, W. J. & Wyatt, R. J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp. Neurol.* **77**, 634–643 (1982).
 50. Takasaki, I., Andoh, T., Shiraki, K. & Kuraishi, Y. Allodynia and hyperalgesia induced by herpes simplex virus type-1 infection in mice. **86**, 95–101 (2000).
 51. Shen, C., Yang, Y., Huang, T., Chan, S. & Liu, B. Neural regeneration in a novel nerve conduit across a large gap of the transected sciatic nerve in rats with low-level laser phototherapy. 2763–2777 (2013). doi:10.1002/jbm.a.34581
 52. kanaya1996.pdf.
 53. Varejão, A. S. P., Melo-Pinto, P., Meek, M. F., Filipe, V. M. & Bulas-Cruz, J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol. Res.* **26**, 186–194 (2004).
 54. Track, W., In, A., Presence, T. H. E. & Contractures, C. SCIATIC NERVE

- REGENERATION IN THE RAT . VALIDITY OF. (1989).
55. Wang, T. *et al.* Functional evaluation outcomes correlate with histomorphometric changes in the rat sciatic nerve crush injury model: A comparison between sciatic functional index and kinematic analysis. *PLoS One* **13**, 1–13 (2018).
 56. Mara, L., Mazzer, N., Roberto, R. & Guirro, D. J. Assessment of Functional Recovery of Sciatic Nerve in Rats Submitted to Low-Level Laser Therapy with Different Fluences . An Experimental Study Laser in Functional Recovery in Rats. **5**, 49–53 (2013).
 57. Gonçalves, R. B. *et al.* Efeitos da aplicação do laser de baixa potência na regeneração do nervo isquiático de ratos Effects of low-power laser on injured rat sciatic nerve regeneration. **17**, 34–39 (2010).
 58. Guivernau, K., Serafim, G. & Ramos, S. D. P. Effects of 940 nm light-emitting diode (led) on sciatic nerve regeneration in rats. 113–119 (2012). doi:10.1007/s10103-011-0923-0
 59. Gigo-Benato D, Russo TL, Tanaka EH, Assis L, Salvini TF, P. Effects of 660 and 780 nm Low-Level Laser Therapy on Neuromuscular Recovery After Crush Injury in Rat Sciatic Nerve. **682**, 673–682 (2010).

8. Anexo



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO LOCAL E SISTEMICA SOBRE A RESPOSTA SENSORIO-MOTORA NA LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA EM RATOS WISTAR", protocolada sob o CEUA nº 3249161020 (ID 000234), sob a responsabilidade de **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari e equipe; Tamires Ribeiro de Araujo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 20/10/2020.

We certify that the proposal "EFFECTS OF LOCAL AND SYSTEMIC PHOTOBIMODULATION ON THE SENSORY MOTOR RESPONSE IN PERIPHERAL NERVE INJURY IN WISTAR RATS", utilizing 105 Heterogenics rats (105 males), protocol number CEUA 3249161020 (ID 000234), under the responsibility of **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari and team; Tamires Ribeiro de Araujo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 10/20/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [11/2020](#) a [03/2021](#)

Área: [Ciências da Reabilitação](#)

Origem: [Biotério - Unidade Vergueiro](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [8 a 10 semanas](#)

N: [105](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [200 a 250 g](#)

Local do experimento: Biotério da Universidade Nove de Julho. Rua Vergueiro, 235/249 - Liberdade, São Paulo - SP.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2021

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho