



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

CARLA BERNARDO SOLDERA

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO UTILIZANDO LED ASSOCIADO AO
EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS
MUSCULARES E REPARO DO TECIDO NERVOSO PÓS LESÃO POR
ESMAGAMENTO DE NERVO CIÁTICO EM RATOS WISTAR**

SÃO PAULO
2020



CARLA BERNARDO SOLDERA

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO UTILIZANDO LED ASSOCIADO AO
EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS
MUSCULARES E REPARO DO TECIDO NERVOSO PÓS LESÃO POR
ESMAGAMENTO DE NERVO CIÁTICO EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada 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
2020**

Soldera, Carla Bernardo.

Efeitos da fotobiomodulação utilizando LED associado ao exercício físico sobre os aspectos morfológicos musculares e reparo do tecido nervoso pós lesão por esmagamento de nervo ciático em ratos Wistar. / Carla Bernardo Soldera. 2020.

76 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

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

1. Fotobiomodulação. 2. Lesão nervosa periférica. 3. LED. 4. Exercício físico.

I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita. II. Título.

CDU 615.831



São Paulo, 17 de dezembro de 2020.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Carla Bernardo Soldera

Título da Tese: "Efeitos da fotobiomodulação utilizando Led associado ao exercício físico sobre os aspectos morfológicos musculares e reparo do tecido nervoso pós lesão por esmagamento de nervo ciático em ratos wistar".

Presidente: PROF^a. DR^a. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI

Membro: PROF^a. DR^a. SANDRA KALIL BUSSADORI

Membro: PROF^a. DR^a. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA

Membro: PROF^a. DR^a. ELAINE MARCÍLIO SANTOS

Membro: PROF^a. DR^a. STELLA REGINA ZAMUNER

*“Os pescadores sabem que o mar é perigoso e a tormenta terrível,
mas este conhecimento não os impede de lançar-se ao mar”*

(Vincent van Gogh)

AGRADECIMENTOS

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

À **CAPES** - Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP) 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, 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, Alessandro Deana, Daniela Teixeira, Rodrigo Labat, Paulo de Tarso.**

À minha família por sempre me apoiarem, especialmente minha super **Mãe** (Nini) que sempre teve muita calma e paciência comigo.

Aos colegas do laboratório de pesquisa da UNINOVE por terem me ajudado na execução do trabalho, especialmente: **Lucas, Agnelo e Bia.**

Aos colegas professores por me auxiliarem nesse processo de adaptação.

Aos colegas fisioterapeutas, enfermeiros e médicos dos hospitais que trabalho por sempre me encorajarem a não desistir mesmo nesse caminho árduo.

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

RESUMO

Contextualização: Lesões traumáticas do sistema nervoso periférico são comuns atualmente, sendo um importante problema médico. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do exercício imediato associado a terapia de fotobiomodulação utilizando LED como reabilitação após lesão nervosa periférica por esmagamento do nervo ciático em ratos Wistar. **Metodologia:** Foram utilizados 45 ratos da linhagem Wistar, divididos aleatoriamente em 5 grupos: Controle; Lesão; Lesão+LEDn+Exercício; Lesão+LEDnm+Exercício; Lesão+Exercício. Os animais foram eutanasiados em 7, 14 dias de pós-operatório. A terapia de fotobiomodulação consistiu no uso de LED 850 nm, área do feixe de 1cm² (região nervosa total de 4 pontos, energia por ponto 0,8J, tempo por ponto de 20seg, energia total 3.2J e região muscular total de 8 pontos, energia por ponto 0,4J, tempo por ponto de 10seg, energia total 3.2J), de forma pontual em contato com a pele do animal, com aplicações diárias por 5 dias consecutivos, iniciando 2h após a lesão por esmagamento. Para o treino de exercício, foi utilizada esteira ergométrica adaptada para o treino com ratos contendo raias e controle digital de velocidade. O protocolo de exercício consistiu em treinos diários iniciados após 24horas de pós-operatório sendo realizado 30min/dia, cinco dias por semana, sem inclinação. Após cada período experimental foi realizado a análise funcional da marcha através do índice funcional do ciático, análise da hiperalgesia mecânica através do teste de Von Frey, análise da massa muscular para avaliar a atrofia muscular, avaliação qualitativa e quantitativa dos aspectos morfológicos musculares e análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas. **Resultados:** Em relação a avaliação da marcha, todos os grupos lesionados apresentaram uma piora no índice funcional avaliado após 7 e 14 dias de lesão, sendo observado em 7 dia que o grupo Lesão+LEDn+Exercício apresentou um melhor desempenho quando comparado com os demais grupos lesionados e tratados. Já em 14 dias o grupo Lesão+LEDn+Exercício apresentou um melhor desempenho quando comparado ao grupo Lesão. No que se diz respeito a análise da massa muscular, após 7 dias, todos os grupos lesionados, tratados ou não demonstraram uma diminuição da relação de massa muscular indicando aumento de atrofia quando comparado ao grupo Controle, sendo que o mesmo ocorreu em 14 dias. O grupo Lesão+LEDn+Exercício em 14 dias demonstrou uma melhora quando comparado ao grupo Lesão indicando uma menor atrofia muscular. Em relação a hiperalgesia, no período de 7 e 14 dias todos os grupos lesionados, tratados ou não demonstraram uma diminuição na nocicepção em relação ao grupo Controle. Já em 14 dias, os grupos Lesão+LEDn+Exercício e Lesão+LEDnm+Exercício apresentaram melhores resultados quando comparados ao grupo Lesão. Foi demonstrado também que no mesmo período que os grupos lesionados e tratados com LED tanto na região nervosa como nervo e músculo associado ao exercício apresentaram melhores resultados quando comparados ao grupo Lesão+Exercício apenas. **Conclusão:** Com base nos resultados, é possível concluir que o uso da fotobiomodulação quando aplicada na região nervosa associada ao exercício de início precoce pode contribuir para uma melhora funcional da marcha, reduz a atrofia muscular e atua positivamente na nocicepção.

Palavras-chave: lesões, sistema nervoso periférico, nervo ciático, atrofia muscular, teste de Von Frey.

ABSTRACT

Contextualization: Traumatic injuries of the peripheral nervous system are common today, being an important medical problem. The aim of the present study was to evaluate the effects of immediate exercise associated with photobiomodulation therapy using LED as a rehabilitation after peripheral nerve injury by crushing the sciatic nerve in Wistar rats. **Methodology:** 45 Wistar rats were used, randomly divided into 5 groups: Control; Injury; Injury+LEDn+Exercise; Injury+LEDnm+Exercise; Injury+Exercise. The animals were euthanized 7 and 14 days after the operation. Photobiomodulation therapy consisted of the use of 850nm LED, 1cm² beam area (nerve region total of 4 points, energy per point 0.8J, time per point of 20sec, total energy 3.2J and muscle region total of 8 points, energy per point 0.4J, time per point 10sec, total energy 3.2J), in a punctual way in contact with the animal's skin, with daily applications for 5 consecutive days, starting 2h after the crush injury. For exercise training, a treadmill adapted for training with rats containing lanes and digital speed control was used. The exercise protocol consisted of daily training started 24 hours after the operation, being performed 30 minutes/day, five days a week, without inclination. After each experimental period, functional analysis of gait was performed using the functional sciatic index, analysis of mechanical hyperalgesia using the Von Frey test, analysis of muscle mass to assess muscle atrophy, qualitative and quantitative assessment of muscle morphological aspects and qualitative analysis and quantitative of collagen fibers. **Results:** Regarding gait assessment, all injured groups showed a worsening in the functional index assessed after 7 and 14 days of injury, and it was observed in 7 days that the Injury+LEDn+Exercise group performed better when compared to the others. injured and treated groups. In 14 days, the Injury+LEDn+Exercise group performed better when compared to the Injury group. Regarding the analysis of muscle mass, after 7 days, all injured groups, treated or not, showed a decrease in the muscle mass ratio indicating an increase in atrophy when compared to the Control group, and the same occurred in 14 days. The Injury+LEDn+Exercise group in 14 days showed an improvement when compared to the Lesion group indicating less muscle atrophy. Regarding hyperalgesia, in the period of 7 and 14 days all injured groups, treated or not, showed a decrease in nociception in relation to the Control group. In 14 days, the Injury+LEDn+Exercise and Injury+LEDnm+Exercise groups showed better results when compared to the Injury group. It was also shown that in the same period that the injured and treated groups with LED both in the nerve region and in the nerve and muscle associated with exercise showed better results when compared to the Injury+Exercise group only. **Conclusion:** Based on the results, it was possible to conclude that the use of photobiomodulation when applied to the nervous region associated with early-onset exercise can contribute to a functional improvement in gait, reduces muscle atrophy and acts positively on nociception.

Keywords: injuries, peripheral nervous system, sciatic nerve, muscle atrophy, Von Frey test.

ÍNDICE

1.	Introdução.....	12
2.	Objetivo.....	31
2.1	Geral.....	31
2.1	Específico.....	31
3.	Materiais e métodos.....	32
3.1	Local.....	32
3.2	Animais.....	32
3.3	Grupos experimentais.....	32
3.4	Procedimento cirúrgico.....	33
3.5	Terapia de fotobiomodulação – LED.....	35
3.6	Protocolo de exercício.....	36
3.7	Análise funcional da marcha – IFC.....	37
3.8	Análise da hiperalgesia mecânica - Teste de Von Frey.....	39
3.9	Eutanásia.....	40
3.10	Análise da massa muscular.....	40
3.11	Avaliação qualitativa e quantitativa dos aspectos morfológicos musculares....	40
3.12	Análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas.....	41
3.13	Análise estatística.....	41
4.	Resultados.....	42
4.1	Análise funcional da marcha.....	42
4.2	Análise da massa muscular e grau de atrofia	44
4.3	Análise von Frey.....	46
4.4	Avaliação qualitativa e quantitativa dos aspectos morfológicos musculares....	47
4.5	Análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas.....	50
5.	Discussão.....	51
6.	Considerações finais.....	54
7.	Conclusão.....	55
8.	Referência bibliográfica.....	56
9.	Anexos.....	70

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1:	Classificação das lesões nervosas periféricas.....	13
Figura 2:	Demonstração esquemática da localização anatômica do nervo ciático de ratos, sua origem e ramificações.....	18
Figura 3:	Demonstração <i>in vivo</i> do nervo ciático de rata Wistar caracterizando o segmento proximal (p) e segmento distal (d).....	18
Figura 4:	Demonstração do procedimento cirúrgico e procedimento de esmagamento do nervo ciático esquerdo.....	34
Quadro 1:	Parâmetros utilizados para o tratamento com LED.....	35
Figura 5:	Locais de aplicação pontual de LED em diferentes grupos de estudo.....	35
Figura 6:	Animais acondicionados para o treino de exercício em esteira ergométrica.....	37
Figura 7:	Vista isométrica e vista superior do modelo da passarela utilizado para o IFC.....	38
Figura 8:	Representação dos parâmetros obtidos para cálculo do IFC.....	38
Figura 9:	A- Animais acondicionados para a realização do teste de hiperalgesia mecânica (Teste de Von Frey) B-. Animais acondicionados após 20min C- Analgesímetro digital Insight Ltda.....	39
Figura 10:	Efeitos do exercício e da fotobiomodulação sobre a funcionalidade da marcha nos tempos experimentais de 7 dias (A) e 14 dias (B).....	42
Figura 11:	Imagem superior com esquema de passarela onde foi coletado o IFC. Imagem inferior com vista superior da plataforma com animal desempenhando a marcha para coleta do IFC.....	43
Figura 12:	Vista da descarga evidenciando deformidade no membro lesionado e imagem capturada após coleta do IFC.....	44
Figura 13:	Efeitos do exercício e da fotobiomodulação sobre a atrofia muscular ($r=E/D$) nos tempos experimentais de 7 dias (A), 14 dias (B).....	45
Figura 14:	Macroscopia do tamanho (atrofia) e características do músculo tibial anterior direito (sem lesão) e esquerdo (lesionado) no período de 14 dias.....	45
Figura 15:	Efeitos do exercício e da fotobiomodulação sobre a hiperalgesia nos tempos experimentais de 7 dias (A) e 14 dias (B).....	46
Figura 16:	Efeitos do exercício e da fotobiomodulação sobre o diâmetro das fibras musculares nos tempos experimentais de 7 dias (A) e 14 dias (B).....	47
Figura 17:	Fotomicrografias dos músculos em cortes transversais corados com hematoxilina e eosina (400x).....	48
Figura 18:	Efeitos do exercício e da fotobiomodulação sobre a média de colágeno quantificado como porcentagem nos tempos experimentais de 7 dias (A) e 14 dias (B).....	49
Figura 19:	Cortes histológicos dos músculos TA corados com Picrosirius Red sem e com luz polarizada.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADM	Amplitude de movimento
ANOVA	Análise de variância
AST	Área de secção transversa
C	Controle
CS	Células de Schwann
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CLed	Controle submetido à fototerapia com LED
cm	Centímetros
cm ²	Centímetro quadrado
CON	Controle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FBM	Fotobiomodulação
FDA	Food Drug Administration
Fig.	Figura
FRM	Fator regulatório miogênico
FRMs	Fatores reguladores miogênicos
g	Gramas
h	Horas
HE	Hematoxilina e eosina
IFC	Índice Funcional Ciático
J	Joules
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
L	Lesão do nervo ciático sem fototerapia LED
LED	Diodo emissor de luz
LEDn	LED aplicado na região nervosa
LEDnm	LED aplicado na região nervosa e muscular
LEDs	Diodos emissores de luz
LNP	Lesão nervosa periférica
LNPs	Lesões de nervos periféricos
min	Minutos
MMP-2	Metalproteinases de Matriz tipo 2
mW	MiliWatts
mW/cm ²	MilliWatts por centímetro quadrado
nAChR	Receptores nicotínicos de acetilcolina

NASA	National Aero Space Agency
NEISS	Sistema Nacional de Vigilância Eletrônica de Lesões dos EUA (National Electronic Injury Surveillance System)
NIE	Nervo isquiático esquerdo
nm	Nanômetro
NT-3	Neurotrofina
PCS	Precursor da célula de Schwann
pH	Potencial hidrogeniônico
razão g	Diâmetro da fibra
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TA	Músculo tibial anterior
TC	Tecido conjuntivo
TEM	Teste de esforço máximo
TFBM	Terapia de fotobiomodulação
TMT	Treinamento em esteira
UNINOVE	Universidade Nove de Julho

1. Introdução

O sistema nervoso divide-se em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O SNC compreende o cérebro, tronco cerebral e tratos ascendentes e descendentes da medula espinhal. O SNP é composto pelas estruturas que se localizam externamente à membrana pia-máter da medula espinhal e tronco cerebral, incluindo as raízes nervosas, plexos e nervos periféricos, até o limite da junção neuromuscular (Radanovic, 2015).

As fibras nervosas que saem diretamente da medula compõem as raízes nervosas, e as raízes dorsais são sensoriais, e as raízes ventrais, motoras. Ao emergir da medula, os nervos espinhais se juntam e misturam-se formando os plexos, de onde sairão os nervos periféricos. Em humanos existem quatro plexos motores principais: cervical, braquial, lombar e sacral. O plexo lombar é formado pelos nervos que saem de L1 a L3, parte de L4; o plexo sacral é constituído por nervos que partem de L4 a S3. Dos plexos, emergem os troncos nervosos principais que vão se ramificando em direção à periferia dos membros, em nervos cada vez menores e que inervam regiões mais específicas e distantes (Radanovic, 2015).

Durante o desenvolvimento dos nervos periféricos, as células da crista neural geram células gliais mielinizantes e não mielinizantes em um processo paralelo à gliogênese das camadas germinativas do SNC. Ao contrário da gliogênese central, o desenvolvimento da crista neural envolve uma fase embrionária prolongada dedicada à geração, primeiro, do precursor da célula de Schwann (CS) e, em seguida, da célula de Schwann imatura, uma célula cujo destino como célula mielinizante ou não mielinizante ainda não foi determinado (Jessen, 2005).

O precursor da célula de Schwann (SCP) representa a primeira etapa no processo de gliogênese em nervos em crescimento. Além de gerar células de Schwann, essas células provavelmente fornecem suporte trófico essencial para os neurônios sensoriais e motores e são necessárias para a coesão estrutural dos nervos periféricos. Eles também têm o potencial de gerar neurônios e podem ser a fonte da população de fibroblastos encontrada nos nervos periféricos (Jessen, 2005).

Nas fibras mielínicas as células de Schwann formam a bainha de mielina. O tecido conectivo dos nervos é dividido em endoneuro, perineuro e epineuro. O endoneuro é o tecido conectivo intrafascicular e constitui a membrana elástica das fibras mielínicas. O perineuro, constituído por células mesoteliais, fibras elásticas e conjuntivas é uma estrutura lamelar que circunda os fascículos individualmente. Atua

como barreira de difusão e parece atuar na regulação da composição do líquido tissular endoneural. O epineuro é constituído por fibras elásticas e conjuntivas e contém tecido gorduroso. Ele limita um conjunto de fascículos (Vale, 1988)

De acordo com a classificação de Seddon (1975), três tipos de lesões nervosas periféricas podem ser descritas, sendo a neuropraxia uma lesão leve com perda motora e sensitiva, sem alteração estrutural; axonotmese é comumente vista em lesões por esmagamento ocorrendo perda de continuidade axonal e subsequente degeneração Walleriana do segmento distal (nesse tipo de lesão não ocorre perda de célula de Schwann, e a recuperação irá depender do grau de desorganização do nervo e também da distância do órgão terminal); neurotmese como separação completa do nervo, com desorganização do axônio causada por uma fibrose tecidual com consequente interrupção do crescimento axonal como observado na figura 1 (Siqueira, 2007; Minamoto, 2007).

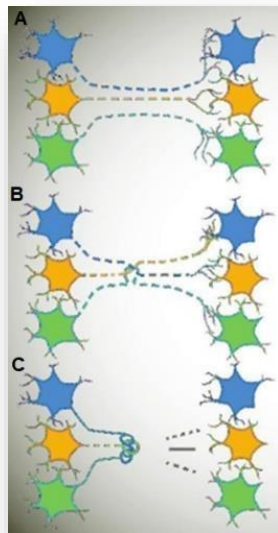


Figura 1: Classificação das LNPs onde “A” representa neuropraxia uma lesão leve com perda motora e sensitiva, sem alteração estrutural; “B” representa axonotmese é comumente vista em lesões por esmagamento ocorrendo perda de continuidade axonal e subsequente degeneração Walleriana do segmento distal (nesse tipo de lesão não ocorre perda de célula de Schwann, e a recuperação irá depender do grau de desorganização do nervo e também da distância do órgão terminal); “C” representa neurotmese com separação completa do nervo e consequente interrupção do crescimento axonal. (Adaptado de Radanovic, 2015)

Um dos mecanismos propostos para tornar a regeneração mais eficiente se dá pela redução do número de neurônios que sofrem essa degeneração, o que inclui a modulação da ação dos fatores neurotróficos. Todas as células do organismo necessitam da ação de fatores tróficos para prevenir a apoptose e promover a sua sobrevivência. O fator neurotrófico é a substância que regula e mantém a função do

neurônio e promove o seu crescimento. No processo de regeneração do nervo, receptores específicos são expressos em maior quantidade na região do cone de crescimento aos quais se unem os fatores neurotróficos específicos. Esses fatores são transportados retrogradamente ao corpo celular e atuam modulando a interação entre enzimas denominadas caspases e proteínas pró-apoptóticas mediante a ocorrência de reações de fosforilação. A inibição dessas enzimas, que são consideradas as principais efetoras da morte celular, possibilita a manutenção da fisiologia normal da célula. Dessa forma, os fatores neurotróficos exercem seus efeitos diretamente sobre o metabolismo celular, mas esses fatores podem ainda atuar de forma indireta, pela ação no metabolismo de células de suporte cujo representante principal é a célula de Schwann (Martins, 2005).

A produção dos fatores neurotróficos, após a lesão, obedece a uma ordem temporal, ou seja, esses fatores são secretados à medida em que sinais celulares atingem o DNA no núcleo da célula (neurônio ou célula de Schwann) e induzem à produção de RNA, responsável pela síntese da proteína relacionada. Esses sinais em geral são proteínas produzidas a partir de reações bioquímicas após a ligação de moléculas aos receptores específicos de membrana (Martins, 2005).

Na extremidade distal relacionada a lesão, as alterações que ocorrem no axônio se iniciam com a degeneração walleriana. Durante esse evento, o citoesqueleto e o axoplasma se degeneram, deixando o correspondente tubo endoneural vazio. A destruição da mielina estimula a atividade dos macrófagos, resultando na remoção da maioria dos seus fragmentos por essas células e pelas células de Schwann. As células de Schwann têm fundamental papel na regeneração, atuando como condutores físicos que possibilitam o direcionamento dos axônios durante o crescimento em direção ao órgão-alvo. Essas células também produzem elementos da matriz extracelular como proteoglicanas, colágeno e fatores neurotróficos. A regeneração que ocorre no sistema nervoso periférico está diretamente relacionada à possibilidade de manutenção das células de Schwann independentemente da degeneração do axônio (Martins, 2005).

Apesar da grande capacidade regenerativa do SNP, a LNP traumática frequentemente causa incapacidade ao indivíduo acometido. A reabilitação após trauma do SNP geralmente emprega exercícios terapêuticos na tentativa de reanimar os órgãos-alvo e estimular a recuperação funcional. Nos últimos anos, importantes determinantes neurobiológicos da regeneração do SNP e da reinervação bem-sucedida do órgão-alvo foram revelados. Tal conhecimento fornece pistas para a concepção de novas estratégias para tratar e reabilitar danos traumáticos do SNP. O exercício físico, por meio de esteira ou roda, é neuroprotetor e neuroregenerativo (Siqueira, 2007).

Morfologicamente, ocorre um aumento no tecido conjuntivo intramuscular e atrofia muscular evidenciada pela diminuição na área da secção transversal das fibras musculares. A atrofia decorrente da desnervação afeta tanto fibras musculares lentas quanto rápidas, resultando em diminuição do diâmetro da fibra muscular e da força muscular. Além disso, a transição dos tipos de fibras musculares no sentido de lenta para rápida leva ao aumento da velocidade de contração muscular, com consequente diminuição da capacidade de gerar força. Tais alterações causam dor e sensibilidade ao longo da fibra nervosa, que podem resultar em limitações aos indivíduos acometidos. Apesar dos nervos periféricos possuírem a capacidade de regeneração, a recuperação é criticamente dependente do tratamento pós-lesão. Tratamentos não cirúrgicos, como o exercício físico e terapia de fotobiomodulação, podem atuar na regeneração nervosa periférica (Andrade, 2020; Minamoto, 2007; Cavalcante, 2012)

A desnervação também promove alterações em estruturas que dão sustentação ao material proteico e aos sarcômeros, os envoltórios de tecido conjuntivo. As propriedades do tecido conjuntivo são determinadas pela quantidade, tipo e organização de um conjunto de proteínas e carboidratos, a matriz extracelular. O espaçamento entre as fibras colágenas confere viscoelasticidade à matriz extracelular, aumentando a capacidade de resistir a cargas de tensão e facilitando o deslizamento tridimensional de uma fibra sobre a outra (Minamoto, 2007).

Lesões traumáticas do sistema nervoso periférico são comuns atualmente, sendo um importante problema médico causado por acidentes com veículos automotores, trauma penetrante após incidentes com arma de fogo ou arma branca e por esmagamento ou estiramento do tecido nervoso após quedas, resultando em perda de controle neural nos segmentos desnervados do corpo, e deficiências graves para os pacientes (Kouyoumdjian, 2006; Souza, 2010; Possamai, 2012).

Lesões de nervos periféricos raramente são seguidas de retorno completo da função. Os déficits são particularmente importantes para a função motora, resultando em paralisia e atrofia muscular (Lago, 2006).

Pesquisas estimam que aproximadamente 2% dos pacientes atendidos em centros de pronto socorro apresentam esse tipo de lesão, o que representa uma das mais significantes formas de morbidade e incapacidade atualmente (Possamai, 2012; Taylor, 2008).

Após um levantamento realizado no Sistema Nacional de Vigilância Eletrônica de Lesões dos EUA (National Electronic Injury Surveillance System – NEISS), analisando os dados por idade, sexo, atividade esportiva/recreativa e às taxas de incidência por ano apresentadas aos departamentos de emergência nos Estados Unidos, foi identificado que entre 2009-2018, 551.612 pacientes apresentaram LNP, dos

quais 120.675 (21,9%) foram associados a exercícios, esportes ou recreação. A LNP aumentou significativamente entre 2009-2018 com uma taxa de incidência geral de 36,9 por 1.000.000 pessoas-ano. A maioria das LNP ocorreu por meio de exercícios (n=56.328, 46,7%). A LNP atingiu o pico na quarta década de vida em homens e na quinta década de vida em mulheres, com os homens representando significativamente mais do que as mulheres. As lesões ocorreram predominantemente no futebol para menores de 20 anos e no exercício para maiores de 20 anos. Precauções e treinamento apropriado são recomendados para indivíduos que participam de exercícios, esportes ou recreação de alta intensidade para limitar o risco de uma lesão neurológica (Li, 2020).

Como consequência das LNPs, os músculos que seriam inervados por aquela fibra sofrem deterioração progressiva (Rochkind, 2016), ocorrendo uma insuficiência na reposição da perda degenerativa tecidual (Shen, 2013), sendo assim as principais alterações decorrentes desta lesão a atrofia muscular, diminuição da área de secção transversa (Silva-Couto, 2012) e diminuição dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) da placa motora (Rochkind, 2016) resultantes do comprometimento de fibras motoras, podendo levar à um distúrbio funcional (Dubový, 2013).

As lesões de nervos periféricos (LNPs) resultam em déficits na transmissão dos impulsos nervosos e podem resultar em comprometimentos motores, sensoriais e autonômicos (Machado, 1998; Monte-Raso, 2006). Os pacientes frequentemente queixam-se de dor, de diversa natureza e intensidade, sendo para muitos o sintoma mais significativo da lesão podendo interferir na qualidade de vida e atividade profissional desse indivíduo (Murray, 2005).

O equilíbrio entre as pistas inibitórias presentes no ambiente e a capacidade de crescimento intrínseca do neurônio lesado determina a extensão da regeneração axonal após a lesão. O corpo celular de um neurônio lesado deve receber informações precisas e oportunas sobre o local e a extensão do dano axonal para aumentar sua capacidade de crescimento intrínseca e se regenerar com sucesso (Abe, 2008).

Provavelmente por esse motivo, a axotomia das fibras motoras oferece um aspecto especialmente atraente para modelos de estudo de mecanismos induzidos por lesão de plasticidade. Muitas informações agora estão disponíveis sobre os muitos aspectos diferentes desta resposta nos motoneurônios onde pode ser observado a expressão e manutenção de um fenótipo funcionalmente diferenciado em motoneurônios maduros é dependente do fornecimento contínuo de fatores tróficos derivados do músculo. A ativação do programa trófico, por sua vez, resulta na produção de fatores estabilizadores críticos para preservar um fenótipo neuronal maduro, condução axonal e processos metabólicos de relevância para a sinalização elétrica e química. A axotomia das fibras motoras interrompe o suprimento normal de fatores

tróficos transportados retrogradamente do músculo e, assim, libera a repressão transcricional de genes associados ao crescimento. A capacidade regenerativa é, de fato, estimulada pela chegada de sinais retrógrados ativadores. Esses sinais positivos de lesão são produzidos em resposta a citocinas e fatores de crescimento liberados por células não neuronais. A síntese interrompida de fatores de manutenção tem um efeito prejudicial sobre os mecanismos que regulam a excitabilidade intrínseca, canal iônico, expressão e direcionamento do receptor, expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de neurotransmissores ou estabilidade de arborizações dendríticas e contatos sinápticos aferentes. A reversão em direção a um fenótipo parcialmente diferenciado permite que a maquinaria metabólica concentre sua atividade na síntese de novos componentes celulares necessários para reparar a membrana axonal lesada e promove a regeneração axonal (González Forero, 2014).

O esmagamento, modelo utilizado na presente proposta, possui como característica a vantagem de não envolver as variáveis introduzidas na lesão por secção seguida de sutura. De fato, na lesão por esmagamento controlado há manutenção, ao menos em parte, da estrutura do nervo, o que facilita a regeneração, além de não haver necessidade de realizar a sutura, que requer treinamento prévio com as técnicas microcirúrgicas, além de instrumental e material adequados, em geral de alto custo (Monte-Raso, 2009).

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

De Medinaceli et al., concluíram que uma lesão provocada por esmagamento é uma modalidade útil para o estudo de regeneração dos nervos periféricos, pois ela mimetiza um tipo de axoniotmese, na qual os danos são suficientes para romper o axônio, levando à degeneração Walleriana distal, mas o prognóstico de recuperação funcional é bom, devido à preservação das estruturas de sustentação, como a célula satélite, a membrana basal e o tecido conectivo de suporte (Mazzer, 2006).

O nervo ciático de ratos (figura 2 e 3) é um modelo confiável para estudar diferentes tipos de lesão e métodos de tratamento e o modelo de lesão por esmagamento é um dos mais utilizados uma vez que causa ruptura das fibras nervosas sem ruptura da maior parte das estruturas de sustentação do nervo, o que facilita a regeneração subsequente à lesão. (Monte-raso, 2009)

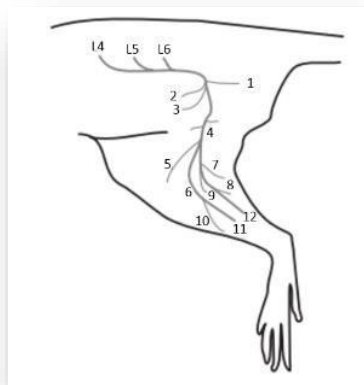


Figura 2: Demonstração esquemática da localização anatômica do nervo ciático de ratos, sua origem e ramificações. 1: n. pudendo, 2: n. glúteo cranial, 3: n. glúteo caudal, 4: n. ciático, 5: n. sural, 6: n. fibular comum, 7: n. cut.sural med., 8: n. gastrocnêmicos lat., 9: n. gastrocnêmio med., 10: n.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

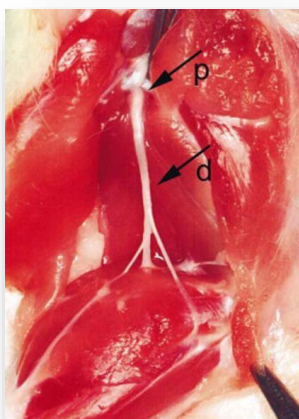


Figura 3: Demonstração in vivo do nervo ciático de rato Wistar caracterizando o segmento proximal (p) e segmento distal (d). (Fonte: Foto adaptada de Suaid et al., 2016. Aspectos da anatomia macro e microscópica do nervo ciático em ratos Wistar).

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

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

Os nervos periféricos são estruturas funcionais responsáveis pela união do SNC com os órgãos periféricos, constituídas pela união de fibras nervosas motoras, sensitivas e autonômicas, envoltas por tecido conjuntivo ou de sustentação. Esta estrutura é capaz de propagar o potencial de ação através da sua extensão, por meio de um complexo conjunto de canais iônicos de membrana. A lesão dos nervos periféricos pode resultar em comprometimentos motores, sensoriais e autonômicos incluindo paresias e/ou plegias, hipotrofias, limitações da amplitude de movimento articular (ADM), encurtamentos musculares, retrações teciduais, dor, edema, parestesias, áreas de hipoestesia e/ou anestesia, limitações funcionais além de uma série de outras complicações secundárias. Ao contrário da lesão do sistema nervoso central, quando os axônios periféricos são lesados, há uma resposta regenerativa robusta que resulta em bons resultados funcionais com lesões do nervo distal. No entanto, as lesões do nervo proximal resultam em má recuperação, em parte devido à taxa lenta de regeneração e alterações crônicas da denervação que ocorrem nos segmentos distais do nervo e no músculo-alvo. As estratégias que aumentam o crescimento axonal teriam um efeito benéfico na regeneração do nervo periférico (Silva, 2010)

A busca por estratégias que possibilitem acelerar esse processo de regeneração, têm sido um dos principais objetivos de estudo na área. Neste contexto, muitos modelos experimentais têm sido utilizados para adquirir conhecimentos sobre a regeneração nervosa e muscular e desenvolver estratégias para promover a recuperação (Rodriguez, 2004).

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

Atualmente, tem-se dado atenção ao desenvolvimento de abordagens não cirúrgicas para auxiliar o retorno funcional após a LNP. Essas surgem como métodos complementares às cirurgias e representam incremento importante para o processo de reinervação (Possamai, 2012).

Há diversos tratamentos para LNP, porém somente em lesões do tipo neurotmesa há necessidade de intervenção cirúrgica como neurorrafia (Anders, 2013), enxertia (Moges, 2011) e a tubulização (Shen, 2013). Outros tratamentos, como

estímulos físicos, como o laser em baixa intensidade (LBI) (Mohammed, 2007; Shen, 2011; Moges, 2011; Câmara, 2011, Silva-Couto, 2012; Santos, 2011; Hsieh, 2012; Gomes, 2012; Akgul, 2013; Rochkind, 2013; Shen, 2013; Anders, 2013), eletroterapia e ultrassom terapêutico para estimular a reinervação (Kim, 2013), assim como os biológicos, como fatores de crescimento e inoculação celular (Pan, 2006) e exercício físico (Van Meeteren, 1997; Sobral, 2008).

A terapia de fotobiomodulação (TFBM) tem sido investigada por causa de sua relação íntima com processos de recuperação de tecidos, como danos em nervos periféricos. Pesquisas científicas têm demonstrado a aplicação de TFBM em tecidos ósseos e nervos periféricos com bons resultados, esteja ou não associado a outros métodos de apoio na reparação de tecidos (Rosso, 2018).

A definição atual para fotobiomodulação (FBM) é o mecanismo pelo qual a radiação óptica não ionizante na faixa espectral do visível e do infravermelho próximo é absorvida pelos cromóforos endógenos para eliciar eventos fotofísicos e fotoquímicos em várias escalas biológicas, sem provocar danos térmicos; e terapia de fotobiomodulação (TFBM) é uma terapia de fótons baseada na princípios da FBM. Envolve o uso de formas não ionizantes de luz de fontes, incluindo lasers, diodos emissores de luz (LEDs) e luz de banda larga, no visível e no infravermelho próximo espectro, para causar mudanças fisiológicas e terapêuticas benéficas. Estes termos e suas definições são precisos e específico (Anders, 2019).

A aplicação do LED como recurso terapêutico vem se ampliando na última década. Estudos desenvolvidos pela NASA (National Aero Space Agency) nos Estados Unidos demonstraram fortes evidências de que a eficiência dos LEDs em processos de foto estimulação celular é semelhante à dos LASERs de baixa potência – terapia LLLT. Testes clínicos com aplicação de LEDs em cicatrização de úlceras em seres humanos já foram liberados pela FDA (Food Drug Administration) norte americana (Whelan, 2003; Whelan, 2001).

Foi observado que existem várias características da TFBM que estão relacionadas a redução de tempo da reparação tecidual e sua capacidade de aumentar a proliferação celular. Na reabilitação por exemplo, a fisioterapia faz o uso da TFBM aplicando nas fases pós-operatória como auxílio no processo de recuperação muscular, nervosa, articular e outros processos funcionais (Rosso, 2018).

Nos últimos anos, fontes de luz não coerentes, como diodos emissores de luz (LEDs) tornaram-se comum. As vantagens dos LEDs incluem facilidade de uso doméstico, capacidade de irradiar uma grande área de uma só vez, possibilidade de dispositivos vestíveis e custo menor do equipamento (Heiskanen, 2018).

LEDs são fontes de luz baseadas no fenômeno de eletroluminescência de materiais semicondutores. Um potencial elétrico aplicado ao semicondutor causa separação de elétrons na seção negativa e lacunas na seção positiva. Quando os elétrons e as lacunas se recombinam na seção intrínseca, a luz é produzida cujo comprimento de onda depende da energia dos elétrons (Heiskanen, 2018).

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

Alguns estudos demonstram resultados satisfatórios do uso do LED em experimentação animal, tais como na cicatrização de feridas (Whelan, 2001), modulação da dor (Whelan, 2003) e neovascularização (Corazza, 2007), induz uma redução significativa na inflamação, um aumento nas fibras musculares imaturas, uma diminuição na atividade de MMP-2 (Metaloproteinases de Matriz tipo 2) e um aumento em fibras de colágeno durante o processo de reparação após uma lesão aguda do músculo (Melo, 2016). Resultados positivos também são encontrados em humanos, tais como no rejuvenescimento de pele (Lee, 2007; Trelles, 2006), alívio de distúrbios do sono e estresse (Glickman, 2006), tratamento de acne (Papageorgiou, 2000) e mucosites (Lang-bicudo et al. 2008).

Silva et al. realizou um estudo morfométrico da terapia LED em tendinite de ratos, as análises histológicas e histomorfométrica revelaram que os animais tratados com LED apresentaram maior ação pró-inflamatória quando comparados ao grupo sadio (C) no tempo experimental de 14 dias. Também demonstraram aumento qualitativo e quantitativo no número de fibroblastos aos 7 dias de tratamento, e das fibras colágenas aos 14 dias para grupo tratado com LED em relação ao grupo sadio (C). Não foi percebido o mesmo quando se comparou aos grupos tendinite demonstrando assim os efeitos benéficos do uso da terapia com LED. (Silva, 2011)

Serafim et al. 2012, avaliaram o efeito da fotobiomodulação com diodo emissor de luz (LED) com comprimento de onda de 940 nm na regeneração nervosa de ratos utilizando uma dose de 4 J / cm² por dez dias consecutivos a partir do primeiro dia de pós-operatório. Os resultados indicam que a FBM utilizando LED com comprimento de onda de 940 nm aplicada imediatamente após a lesão nervosa melhora o processo de

regeneração, reduzindo as áreas de edema, o número de células mononucleares presentes no infiltrado inflamatório, e induziu um aumento da pontuação de recuperação funcional em 7, 14 e 21 dias (Serafim, 2012).

Os LEDs em geral possuem um custo reduzido em relação aos lasers. Como regra geral, o custo por mW de potência óptica é aproximadamente cem vezes menor para LEDs em comparação com lasers. Um dos fatores mais importantes que dificultam a aceitação da FBM na área da saúde é o custo-benefício. Além dos altos preços dos dispositivos, custos adicionais podem surgir, nesse sentido, a adoção de luzes LED nas práticas de tratamento utilizando FBM poderia apoiar uma aceitação mais ampla pela comunidade médica (Heiskanen, 2018).

Além disso, vários LEDs podem ser organizados em matrizes planas, aumentando a área do feixe significativamente, facilitando o tratamento de grandes áreas do corpo, o que tem sido uma limitação dos lasers que normalmente tem pontos de tamanhos pequenos em sua aplicação (Heiskanen, 2018).

Pigatto et al. 2013, utilizaram um modelo de compressão do nervo ciático de ratos para avaliar a evolução da dor após terapia de LED com comprimento de onda de 890nm com uma potência de 390 mW e densidade de energia de 124,8 J/cm². Os testes empregados foram: análise de alodínia; mecânica estática, alodínia mecânica dinâmica, alodínia térmica ao frio, hiperalgesia térmica ao calor e nocicepção espontânea. O LED no espectro infravermelho promoveu efeito analgésico em modelos experimentais submetidos a constrição do nervo ciático, observado através dos testes de alodínia mecânica e térmica ao frio, hiperalgesia térmica ao calor e nocicepção espontânea. Os resultados obtidos com nosso estudo sugerem que esse recurso físico pode ser utilizado no tratamento de pacientes com dor neuropática.

Além da FBM um dos tratamentos mais utilizados para o manejo e reabilitação após LNP é o exercício que pode ocorrer de diversas formas de aplicação e protocolos. A regeneração axonal é um processo lento, havendo uma janela terapêutica para a adequação da reinervação muscular antes da degeneração da placa motora, sendo importante a utilização de medidas terapêuticas que tenham potencial para acelerar este processo. A explicação para que o exercício físico possa de alguma forma acelerar a regeneração nervosa baseia-se na proposta de que, durante o período de desnervação o exercício tem a capacidade de estimular as terminações aferentes dos músculos que estejam próximos ao local da lesão, estes por sua vez, podem exercer algum estímulo em neurônios motores espinais através de conexões sinápticas que normalmente permaneceriam silenciosas tendo como resultado o fortalecimento muscular devido a ativação, proliferação e diferenciação de células miogênicas e células satélites, atuando

na recuperação das fibras, além de aumentar a ramificação terminal dos nervos na junção neuromuscular (Koeber, 2006; Peretti, 2017).

O exercício físico, por meio de locomoção voluntária ou forçada, é uma das várias estratégias possíveis para aumentar a regeneração do nervo periférico e melhorar a reinervação do alvo (English, 2014; Udina, 2011). Embora o exercício físico possa ajudar na recuperação após lesão do SNP ou atuar de forma oposta, a visão de que o exercício físico estimula os principais processos neurobiológicos subjacentes à regeneração nervosa está obtendo ampla aceitação.

O exercício físico resulta em aumento da velocidade de condução do impulso nervoso e recuperação sensório-motora (Van Meeteren, 1997) bem como na manutenção das propriedades musculares, auxiliando no trofismo e minimizando a fraqueza muscular após a desnervação, promove a regeneração axonal e a recuperação funcional e pode melhorar a coordenação sensório-motora e a restauração de circuitos adequados no nível espinhal (Udina, 2011), aumenta o alongamento do axônio (Sabatier, 2008), promove as propriedades regenerativas das células de Schwann e o reparo do nervo (Gordon, 2015) e melhora a recuperação do músculo funcional após a lesão do nervo (Marqueste, 2004). No entanto, a literatura tem mostrado evidências conflitantes sobre os efeitos benéficos e deletérios do exercício na regeneração nervosa periférica e reinervação muscular.

A indicação de exercícios físicos como abordagem terapêutica após lesões nervosas periféricas, apesar de resultados clínicos favoráveis, ainda não é consenso na literatura pertinente. Crescente corpo de evidências vem sendo obtido demonstrando os efeitos do exercício físico. Várias formas de exercício têm sido usadas durante a reabilitação de pacientes com LNP, para auxiliar na manutenção das propriedades musculares durante desnervação ou paralisia e para promover a recuperação funcional após a lesão ou doenças neurodegenerativas. Entretanto, falta, em todos esses trabalhos, padronização do protocolo utilizado, e os resultados obtidos são estritamente relacionados, à intensidade de exercício e ainda ao número e duração de sessões utilizadas (Possamai, 2012).

Guedert et al. 2014, relataram pesquisas utilizando esteira e nado forçado como meio de promover o exercício, mostram o benefício deles na regeneração nervosa. No entanto, concluem que se faz necessário uma maior investigação acerca dos parâmetros até que se possa extrapolar os resultados para o meio clínico.

Estudos com coelhos após esmagamento do nervo ciático mostraram que o exercício de natação auxilia tanto na remoção da mielina degenerada quanto na sua síntese durante a regeneração do nervo (Sarikcioglu, 2001).

Porém, contrários à ideia de que o exercício exerça efeitos positivos durante a lesão nervosa, Gutmann e Jakoubek (1963), ao submeterem ratos que possuíam lesão por esmagamento do nervo isquiático ao nado forçado, mostraram retardo na maturação sináptica, concluindo que o exercício não é benéfico nas fases iniciais pós lesão nervosa. Essa ideia também foi compartilhada por outros pesquisadores tal como Tam et al. 2001, que evidenciaram que a corrida voluntária nas rodas de exercício prejudica o brotamento de motoneurônios sendo que o aumento da atividade neuromuscular não é recomendado como reabilitação imediatamente após a lesão nos estágios iniciais (Guedert 2014).

Correr na esteira não é uma atividade natural para os animais. E, como os roedores não são capazes de receber e compreender instruções, precisam ser impelidos a este movimento, o que o caracteriza como obrigatório. Assim, parece existir um consenso na literatura que, para os animais, a corrida na esteira se caracteriza como um exercício forçado (Lerman, 2002; Melo, 2009; Garland Jr, 2011).

A capacidade dos animais para corrida na esteira é mensurada através de testes de esforço progressivos máximos. A progressividade é caracterizada pelo aumento da intensidade de esforço em intervalos de tempo regulares. Nestes testes a inclinação da esteira permanece constante ao longo deles, portanto, a alteração da intensidade do exercício ocorre pelo aumento da velocidade de corrida. Devido ao seu caráter máximo, os testes não têm uma duração total pré-definida, pois, o animal deve correr até interromper o esforço voluntariamente, entendido como fadiga. O momento de fadiga é definido pela permanência do animal sem movimentação por cerca de 10 segundos ininterruptos. (Soares, 2003).

Embora se caracterize como um exercício forçado para o animal, a corrida na esteira parece ser ainda, o modelo predominante neste tipo de pesquisa (Howlett, 2003; Foley, 2006). Isso se deve, provavelmente, ao fato de a esteira garantir o controle do volume e da intensidade da corrida, permitindo estruturação e planejamento intencionais, inerentes ao exercício físico realizado pelo ser humano (Powers, 2000).

O sucesso da reinervação e da recuperação funcional após a lesão do nervo periférico são afetados pela distância do local da lesão dos alvos desnervados, que determina a duração do desnervação muscular, axonal lento e escalonado alongamento além do local da lesão, perda de suporte de regeneração pelo nervo distal e por células de Schwann desnervadas, reinervação imprecisa dos alvos, atrofia muscular severa e degeneração das fibras musculares (Dedkov, 2001; Gordon, 2015).

Diferentes tipos de exercícios, como treinamento resistido com peso (50 a 250g) preso na cauda dos animais (Ilha, 2007), exercício de natação (20 a 40 min) com carga progressiva de até 10% do peso corporal (Coradini, 2015), ciclismo passivo dos

membros (Udina et al. 2011) e exercícios em esteira (Boeltz, 2013; Bonetti, 2017; English, 2014) foram testados para tratar lesões do SNP.

Por todas essas razões, o exercício tem despertado interesse como forma de acelerar o crescimento axonal e restaurar a função. No entanto, a literatura tem mostrado evidências conflitantes sobre os efeitos benéficos e deletérios do exercício na regeneração nervosa periférica e reinervação muscular, possivelmente devido a variações no tipo de lesão nervosa, tipo de exercício realizado, duração e intensidade do treinamento e quando é iniciada (Armada-da-Silva, 2013; Cobianchi, 2017; Udina 2011).

Os protocolos de exercícios reabilitativos padrão para LNP precisam ser definidos adequadamente. A intensidade do exercício parece ser um parâmetro crítico para a neuroproteção e deve ser levada em consideração (Cobianchi, 2017).

Outro ponto bastante discutido na literatura é o período ideal para o início do exercício pós lesão sendo que o exercício tem lugar de destaque como método fisioterapêutico para reabilitação após lesão nervosa periférica, onde é capaz de determinar no homem e em outros animais, um conjunto de adaptações funcionais e estruturais com objetivo de prevenir atrofia muscular e recuperar a motricidade e a sensibilidade das áreas comprometidas. Porém, a literatura aponta controvérsia sobre o melhor período para realizar a atividade física. A maioria dos estudos discute os efeitos do exercício físico na fase de reinervação do músculo ou fase tardia (aproximadamente duas semanas após a lesão nervosa), afirmando que deve haver um período de repouso antes do exercício, pois a atrofia muscular e subsequente reinervação após compressão do nervo isquiático de ratos se torna evidente somente entre o 14^o e o 21^o dia pós-lesão. Por outro lado, o exercício realizado na fase de desnervação ou fase imediata (um a três dias após a lesão nervosa), acelera o retorno da função sensório-motora na fase inicial da recuperação e melhora a recuperação funcional em ratos (Sobral, 2008)

A pesquisa conduzida em roedores demonstra que o exercício de endurance (capacidade em manter determinada força ou contração muscular por longo período de tempo) modula várias das respostas celulares e moleculares à lesão do nervo periférico e, ao fazer isso, estimula a regeneração do nervo e a recuperação funcional após a lesão experimental do SNP. A corrida em esteira aumenta o número de neurônios em regeneração, a taxa de crescimento axonal e a extensão da reinervação muscular após lesão de nervo periférico. Além disso, a corrida em esteira tem a capacidade de aumentar a liberação de neurotrofinas e fatores de crescimento na medula espinhal, no nervo lesado e nos músculos reinervados. A corrida em esteira também parece prevenir o desenvolvimento de dor neuropática e alodínia (dor provocada por estímulos que normalmente não gerariam dor) sendo causada por alterações da especificidade

sensorial como resultado de danos nos nervos periféricos. Além disso, o exercício físico, mesmo que realizado por um curto período, exerce efeitos condicionantes positivos na capacidade de neuroregeneração, melhorando a resposta aguda às agressões de nervos periféricos. Alguns desses efeitos também podem ser obtidos com exercícios passivos ou estimulação manual (Armada-da-Silva, 2013).

Ilha et al. 2007 relataram que o treinamento de resistência melhora a regeneração do nervo ciático após uma lesão traumática experimental e que o treinamento de resistência ou a combinação de 2 estratégias podem atrasar a recuperação funcional e não alterar a regeneração das fibras do nervo e que em seu estudo em relação a porção distal do nervo ciático em regeneração, o grupo treinado em endurance mostrou um maior grau de maturação da fibra mielinizada do que os grupos sedentários, treinados com resistência. Além disso, o grupo treinado em endurance apresentou menor porcentagem de área de tecido conjuntivo endo neural e maior porcentagem de área de fibras mielinizadas do que o grupo sedentário.

Possamai et al. 2010 investigaram os possíveis efeitos provocados pelo exercício durante o processo de recuperação da função neuromuscular após a axonotmese do nervo ciático de ratos Wistar adultos. Os resultados revelaram que não houve interferência do exercício físico de 30 minutos diários sobre a regeneração nervosa periférica. Desta forma, acredita-se que a natação tenha sido ineficaz na aceleração da recuperação funcional, talvez em decorrência da duração dos exercícios. Outro ponto que provoca discussões é o tempo adequado do início da atividade física. Apesar dessas evidências conflitantes, não foi encontrada nenhuma alteração funcional significativa nem nos animais que foram exercitados desde 24h após a lesão nem naqueles com o início da atividade duas semanas após. Em síntese, a literatura oferece evidências conflitantes sobre os efeitos causados pelos vários tipos de tratamento em uma fase inicial após a lesão nervosa periférica. Parece que os 30 minutos diários utilizados no protocolo de exercícios não foram suficientes para interferir no processo de regeneração, sendo que a evolução funcional dos animais tratados acompanhou o rendimento apresentado pelos animais considerados sedentários. Adicionalmente, o protocolo de experimentação não foi capaz de promover prejuízos diretos sobre a recuperação funcional ou sobre as reações celulares envolvidas no processo regenerativo. Frente a isso, é premente a necessidade de ampliação dos estudos levando em conta não somente a rotina de exercícios, a recuperação da deambulação e as reações teciduais, mas também outras variáveis que comprovem diretamente os efeitos do exercício sobre os mecanismos regenerativos nervosos periféricos no nível molecular.

A utilização do exercício de subida em escada pode ser indicada em modelos experimentais pois ele se assemelha ao aplicado em humanos, não havendo ajuda externa para a realização do exercício, sendo a escada um aparato acessível prescrito para um simples exercício de força. Peretti et al. teve como objetivo em sua pesquisa avaliar histomorfométrica e morfológicamente o músculo tibial anterior de ratos submetidos à axonotmese e tratados com exercício. Os pesquisadores observaram que o protocolo de exercício promoveu melhora nos aspectos histomorfológicos, mas não reverteu totalmente os efeitos deletérios (Peretti, 2016).

Ilha et al. 2007 utilizaram o exercício em ratos sendo que todos os animais submetidos ao exercício começaram as atividades duas semanas após a axonotmese do nervo ciático. O grupo de treino de “endurance” apresentou rendimento funcional normal após a primeira semana de treino conforme o Índice Funcional do Ciático. Por outro lado, os grupos de treino para ganho de força e o de treinamento combinado apresentaram atraso na recuperação funcional.

Uma outra forma encontrada de protocolo de exercício pós LNP por esmagamento é a realizada em roda motorizada. Possamai et al. 2012 submeteram os animais de seu estudo a 30 minutos diários de atividade na roda motorizada com uma velocidade média de 3,5 km/hora. Nos animais exercitados foi observado que sua evolução funcional segue o mesmo padrão apresentado pelos animais sedentários, mas nas avaliações realizadas nos dias 7, 14 e 21, os índices funcionais dos animais tratados ficam abaixo dos apresentados pelos grupos controle. O rendimento depende do número de axônios que se regeneram e a sobrevivência desses neurônios, por sua vez, depende de quão apropriada é a função que ele realiza: se o músculo não trabalha normalmente, o neurônio não é nutrido suficientemente e morre. O estudo da reciprocidade funcional entre as células pré e pós-sináptica da junção neuromuscular (fibra nervosa e fibra muscular, respectivamente) demonstra que a relação entre as duas células é bastante sensível às alterações de atividade que acontecem no alvo neuronal, isto é, no músculo. O aumento do número de contrações musculares seletivamente produzido por estimulação elétrica foi positivamente correlacionado com o aumento da expressão de RNAm para a neurotrofina NT-3. Entretanto, o aumento do nível da síntese de NT-3 somente foi observado ao segundo e terceiro dias, o que não aconteceu no sexto e no sétimo dia de estimulação, sugerindo que os efeitos da despolarização dependem do estágio do desenvolvimento em que se encontra a placa motora. Baseado nisso, suspeita-se que o protocolo de exercício físico utilizado pudesse ter interferido de forma negativa na liberação de fibra nervosa e na atividade normal da junção neuromuscular. Outros autores também relataram resultados negativos e sugerem que o estresse relacionado à longa duração do exercício e ao uso forçado do segmento

corporal afetado é a principal influência negativa à regeneração nervosa. Apesar de o exercício ativo não ter interferido na manutenção da viabilidade neuronal nos sítios proximais à lesão, sua continuidade prejudicou a viabilidade dos cotos neurais distais, provável causa do atraso na recuperação funcional da marcha.

A dor neuropática é uma consequência frequente e adversa da lesão traumática do SNP e é uma das principais causas de incapacidade e má qualidade de vida nestas condições. Demonstrou-se que o exercício em esteira reduz a alodínia e a hiperalgesia (Cobianchi, 2010) ou esmagamento do nervo ciático (Bobinski, 2011). O impacto do exercício em esteira no desenvolvimento da alodínia depende do tempo e da duração do protocolo de exercícios. Consequentemente, a corrida em esteira por 1 h/dia do dia 3 ao dia 7 diminui os sinais de alodínia ao longo do todo o tempo de sobrevivência e melhora a recuperação funcional, ao mesmo tempo que manter o protocolo de exercícios por mais tempo produz o efeito oposto (Cobianchi, 2010). O efeito antinociceptivo da corrida em esteira de curta duração está relacionado à microglia e à ativação de astrócitos nos cornos dorsal e ventral da medula espinhal ipsilateral ao nervo ciático contraído (Cobianchi, 2010; Armada-da-Silva, 2013).

Pela presente revisão observamos que a regeneração é um mecanismo complexo cuja eficiência depende da ocorrência e integração de várias etapas dependentes de numerosos sinais celulares e moleculares. Dessa maneira, é fácil entender que apesar de o processo de regeneração ser extremamente eficiente quando observado em sua totalidade, a deficiência de uma etapa implica em prejuízo de todo o processo, levando a resultados clínicos insatisfatórios. O desafio é trazer, para a aplicação clínica, todos os avanços obtidos a partir da compreensão da regeneração, melhorando as taxas de sucesso após o tratamento cirúrgico das lesões traumáticas de nervos (Martins, 2005).

Não só a fase, mas também a intensidade parece ser um parâmetro importante a ser observado na realização do exercício. Em todos os estudos, não ocorreu um consenso no que diz respeito ao protocolo de tratamento aplicando a atividade física seja ela qual for a modalidade escolhida.

Em síntese, a aplicação de exercícios ativos, com ou sem carga em animais que sofreram uma LNP interfere no processo de recuperação funcional porém existe uma linha tênue entre o efeito benéfico e maléfico causado pelo exercício durante esse processo de recuperação que ainda não foi descoberta, necessitando mais estudos sobre o tema.

Nosso grupo de pesquisa evidenciou resultados positivos da terapia LED aplicada em diferentes locais (nervo e músculo e a associação de ambas as regiões) após LNP por esmagamento do nervo ciático promovendo uma melhora dos aspectos

funcionais 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 (Soldara, 2017; Andreo, 2018; Andreo, 2020).

Não foi encontrado nenhum estudo de associação de LNP com tratamento LED aplicado em diferentes regiões associado ao exercício físico, diante deste contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar os possíveis efeitos provocados pela fotobiomodulação utilizando LED associados ao exercício durante o processo de recuperação e um possível estabelecimento de protocolo de atendimento.

Justificativa

O estabelecimento de forma segura e controlada de protocolos em modelos experimentais que permitam otimizar o reparo muscular e nervoso após LNP e o entendimento dos mecanismos envolvidos contribuirá de forma ímpar para os avanços da reabilitação nesta área e será o ponto de partida para que futuros ensaios clínicos possam ser delineados e conduzidos com maior segurança. Diante de resultados prévios de nosso grupo de pesquisa que demonstraram efeitos positivos como o aumento do limiar algico, aumento na massa muscular e melhora na funcionalidade da marcha após LNP, este estudo visa investigar os efeitos terapêuticos (morfológicos e funcionais) da terapia de fotobiomodulação utilizando LED quando aplicado tanto no tecido muscular quanto nervoso associados ao exercício, uma vez que já foi demonstrado na literatura os efeitos positivos destes recursos em cada aplicação isoladamente, contudo a associação da aplicação ainda não foi avaliada.

2. Objetivo

2.1 Geral

Analisar os efeitos da FBM utilizando LED associado ao exercício sobre o reparo neuromuscular de ratos Wistar pós lesão por esmagamento do nervo ciático.

2.2 Específico

- Avaliar os efeitos da terapia de fotobiomodulação utilizando LED aplicados em diferentes regiões (nervo e músculo) associado ao exercício em ratos Wistar pós lesão por esmagamento do nervo isquiático sobre o tecido muscular no que se refere a:
 - ✓ Aspectos morfológicos do músculo desnervado, incluindo grau de atrofia muscular.
 - ✓ Área e organização de colágeno
 - ✓ Avaliar os aspectos funcionais que envolvem marcha através do Índice Funcional do Ciático
 - ✓ Avaliar a sensibilidade através da Hiperalgisia Mecânica

3. Materiais e métodos

3.1 Local

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

3.2 Animais

Foram utilizadas 45 ratas da linhagem Wistar, pesando entre 200-250g mantidos no biotério da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, temperatura ambiente entre 22° - 27°C e luminosidade controlada com ciclo de 12 horas (claro/escuro), com comida e água *ad libitum*.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEUA – UNINOVE (nº 1210020919).

3.3 Grupos experimentais

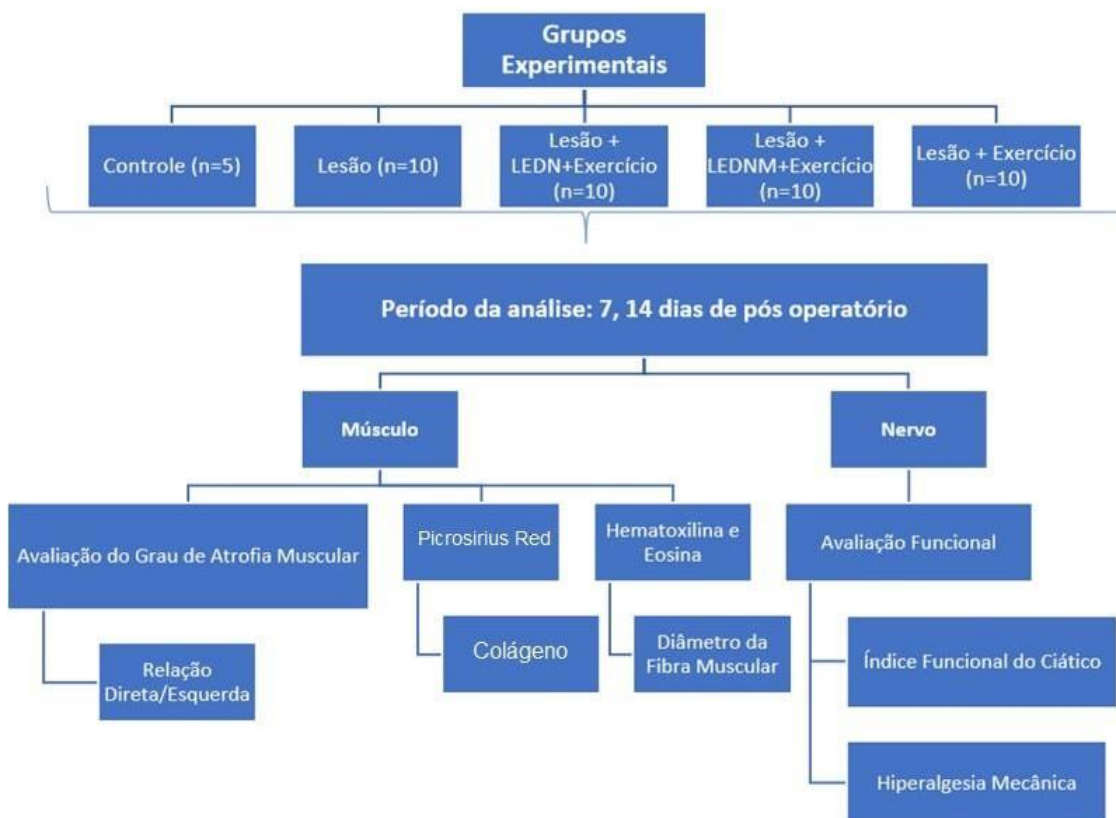
Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos:

- **Grupo Controle:** os animais não foram submetidos a nenhum procedimento (n=5);
- **Grupo Lesão:** realizado apenas o esmagamento do NIE dos animais (n=10) sem nenhum tipo de tratamento;
- **Grupo Lesão+Exercício:** realizado o esmagamento do NIE dos animais e associado o protocolo exercício (n=10);
- **Grupo Lesão+LEDn+Exercício:** realizado o esmagamento do NIE dos animais e estes receberam tratamento com irradiação LED na área correspondente à lesão nervosa associando ao protocolo de exercício (n=10);
- **Grupo Lesão+LEDnm+Exercício:** realizado o esmagamento do NIE dos animais do grupo e estes receberam tratamento com irradiação LED na área correspondente à lesão nervosa e no músculo associando o protocolo de exercício (n=10);

Os animais foram eutanasiados em 7, 14 dias de pós-operatório (cinco animais por período), justificando assim o número de 10 animais por grupo. A lesão foi realizada

somente no lado esquerdo, pois o lado direito foi utilizado como controle interno no índice de massa muscular, inviabilizando a bilateralidade da lesão.

A escolha dos tempos experimentais e local de aplicação do LED se deu através do resultado obtidos anteriormente em outros estudos onde ficou evidenciado um melhor resultados após esses dois momentos temporais e especialmente quando foi usado na região nervosa associada ou não à região muscular.



3.4 Procedimento cirúrgico

O procedimento de esmagamento do nervo ciático (figura 4) foi realizado conforme descrito por Salgado et al. (2011) e Belchior et al. (2009). Após os animais terem sido anestesiados com injeção intraperitoneal utilizando-se uma mistura de ketamina 10% (100 mg/Kg de peso do animal) e de xylazina 2% (10 mg/Kg de peso do animal). Para aplicação da anestesia foi utilizada seringas da marca BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina com a agulha Ultra-Fine® (regular), comprimento: 12,7 mm, calibre: 0,33 mm e bisel trifacetado.

Os animais foram tricotomizados, posicionados em decúbito lateral direito e limpos com uma solução de clorexidina 2% na face posterior da coxa. Foi realizada uma incisão cutânea retilínea paralela ao ísquio e o nervo ciático 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, 2011; Belchior, 2009). Este procedimento foi realizado pelo mesmo operador em todos os animais. Em seguida foi realizada a sutura das áreas incisadas utilizando-se fio de poliamida (Mononylon 6/0) e os animais foram mantidos em sala de observação em mantas aquecidas.

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

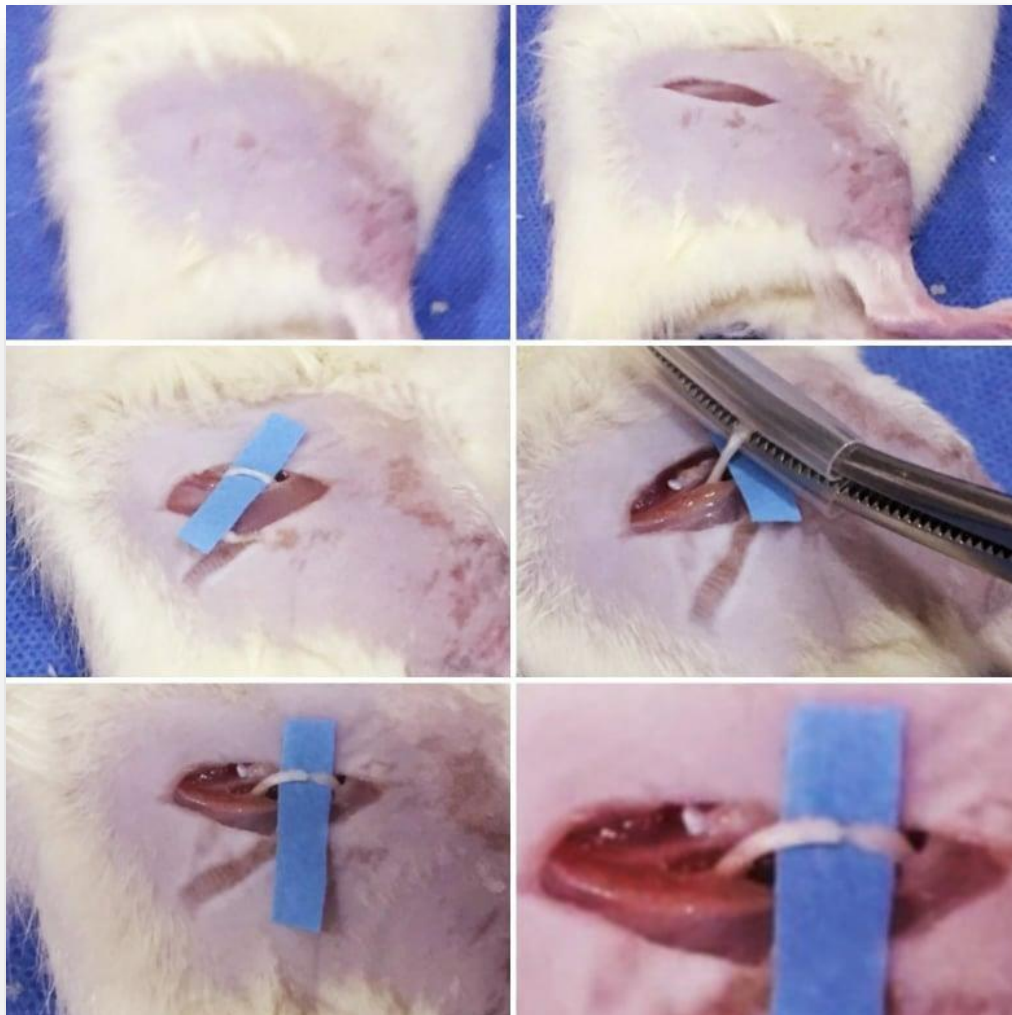


Figura 4: Demonstração do procedimento cirúrgico e procedimento de esmagamento do nervo ciático esquerdo.

3.5 Terapia de Fotobiomodulação com LED

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

Local de irradiação	Músculo	Nervo
Comprimento de onda	850 nm	850 nm
Área do feixe	1 cm ²	1 cm ²
Potência média	40 mW	40 mW
Densidade de potência	0,04 W/cm ²	0,04 W/cm ²
Densidade de energia	0,4 J/cm ²	0,4 J/cm ²
Energia por ponto	0,4 J	0,8 J
Total de pontos	8 pontos	4 pontos
Tempo por ponto	10s	20s
Tempo total	80s	80s
Energia total	3.2 J	3.2 J

Quadro 1: Parâmetros utilizados para o tratamento com LED



Figura 5: Locais de aplicação pontual de LED em diferentes grupos de estudo; “A” aplicação no grupo Lesão + LEDn; “B” aplicação no grupo Lesão + LEDnm.

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

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

Nos grupos que receberam o tratamento também no músculo, a irradiação foi realizada diretamente no músculo tibial anterior em 8 pontos (figura 5) (Rochkind, 2013).

3.6 Protocolo de exercício

Antes de iniciar o experimento, os ratos foram adaptados na esteira, sem inclinação, durante uma semana, respeitando os finais de semana, iniciando com 10min no primeiro dia, com aumento diário de cinco minutos até alcançar 30min, de acordo com Pilis et al. 1993 e Manchado et al. 2006 (Sobral, 2008). Essa adaptação permitiu ao animal se familiarizar ao protocolo de exercícios, reduzindo o estresse, sem promover adaptações físicas.

Como não existe na literatura um padrão para duração, frequência, número de séries e repetições do exercício, o presente estudo se baseou no teste de esforço máximo (TEM) para avaliar a velocidade máxima do exercício na esteira, garantindo assim a prescrição da intensidade do exercício realizado. O teste de esforço máximo consistiu na submissão a um período de corrida de aclimatação (10m/min durante 5min).

Após este período, os animais foram submetidos ao teste sem inclinação, a uma velocidade de 10m/min, um aumento de 1,2m/min a cada 2 minutos até a exaustão. A exaustão foi caracterizada quando os ratos se recusaram a correr. Ao final do teste foi utilizado no protocolo de exercício o valor de 65% da velocidade máxima atingida no teste de velocidade máxima na esteira. O protocolo de exercício consistiu em treinos diários iniciados após 24horas de pós-operatório sendo realizado 30min/dia, cinco dias por semana, com inclinação 0%, sendo os 2 primeiros minutos de aquecimento correndo 30% do valor máximo atingido no TEM, 26 minutos correndo a 65% do valor máximo atingido no TEM e 2 minutos finais de recuperação novamente a 30% do valor máximo atingido no TEM (Adaptado de Melo, 2003; Carvalho, 2005; Ilha, 2007; Possamai, 2010).

Para o treino de exercício, foi utilizada esteira ergométrica elétrica da Marca Inbramed, modelo SuperATL adaptada para o treino com ratos contendo raias e controle digital de velocidade como observado na figura 6.

Não foi utilizado nenhum estímulo elétrico, doloroso ou qualquer outro para induzir o animal a correr na esteira, porém foi criado ao final da raia um ambiente escuro para estimular o animal a correr em direção a esse local realizando como de costume sendo um instinto animal.



Figura 6: Animais acondicionados para o treino de exercício em esteira ergométrica elétrica da Marca Inbramed, modelo SuperATL adaptada para o treino com ratos contendo raias e controle digital de velocidade.

3.7 Análise funcional da marcha – IFC

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

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

Os animais aprenderam a caminhar na passarela antes do procedimento cirúrgico, o dispositivo foi confeccionado seguindo o método de De Medicaneli et al. (1982) fechada nas laterais, contendo uma casinhola no final (figura 7).

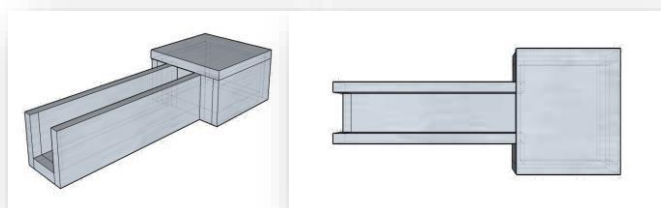


Figura 7: Vista isométrica e vista superior do modelo da passarela utilizado para o IFC (desenhado com o SketchUp make, versão 15.3.331, 2015, Trimble Navigation Limited).

As impressões das patas foram digitalizadas e analisadas os parâmetros sugeridos por Bain et al. (1989), conforme figura 3: 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*) como observado na figura 8.

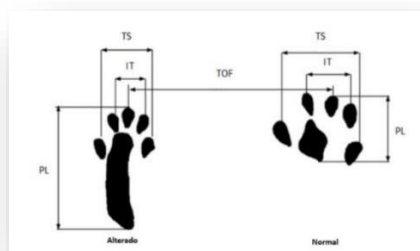


Figura 8: Representação dos parâmetros obtidos para cálculo do IFC, da esquerda para a direita estão representadas as patas do nervo lesionado e normal. Exemplo da imagem obtida após o teste.

O IFC foi calculado a partir da fórmula:

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

Sendo:

E: experimental
N: normal

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

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

3.8 Análise da hiperalgesia mecânica - Teste de Von Frey

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

Os animais foram acondicionados em uma caixa transparente sobre uma tela de arame (figura 9) para acesso à superfície plantar da pata dos mesmos sendo habituados por 20min antes da execução de cada teste e nos três dias que antecederam a primeira coleta sendo habituados por uma hora em ambiente sem nenhum tipo de interrupção sonora que puder interferir na realização do teste agitando os animais.

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

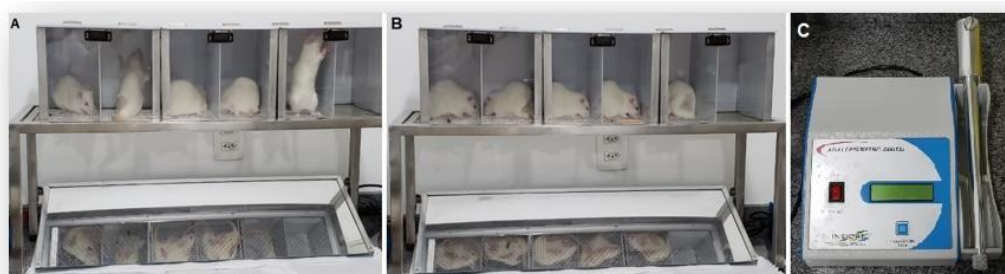


Figura 9: A- Animais acondicionados para a realização do teste de hiperalgesia mecânica (Teste de Von Frey) com agitação ainda nos momentos iniciais. B-. Animais acondicionados após 20min em ambiente sem ruídos e sem agitação para realização do teste. C- Analgesímetro digital Insight Ltda utilizado para realização do teste.

3.9 Eutanásia

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

Os músculos TA foram removidos e pesados para análise da massa muscular.

3.10 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).

3.11 Avaliação qualitativa e quantitativa dos aspectos morfológicos musculares

As amostras musculares também foram utilizadas para análise morfológica e para este procedimento sendo 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 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 foram submetidas às colorações histológicas de hematoxilina e eosina (HE) e avaliadas por microscopia de luz (microscópio Axioplan 2, Zeiss, Alemanha).

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

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

3.12 Análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas

As amostras musculares foram coradas com Picrosirius Red (Sigma, St. Louis, MO, EUA), seguindo o método descrito anteriormente (Junqueira et al. 1982) e examinada com auxílio de microscópio de luz polarizada Pol-Interferencial Photomicroscope (Modelo 61282, Carl Zeiss, Alemanha), a análise foi realizada com auxílio do software Image J (National Institute of Health - NIH, EUA), na qual a área relativa ocupada pelas fibras colágenas foi calculada (em porcentagem) em relação à área total do corte.

3.13 Análise estatística

Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism, versão 8.00 (GraphPad Software San Diego, California, USA). A distribuição de normalidade foi avaliada pelo teste Komolgorov-Smirnov. Os dados foram expressos em média e desvio padrão, sendo submetidos ao teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os níveis de confiança foram ajustados para 95% ($p \leq 0,05$).

4. Resultados

4.1 Análise funcional da marcha

O grupo controle apresentou um IFC dentro do padrão de normalidade com resultados mais próximos de zero, enquanto todos os grupos lesionados (Lesão, Lesão+LEDn+Exercício, Lesão+LEDnm+Exercício e Lesão+Exercício) apresentaram resultados estatisticamente relevantes quando comparados com o grupo Controle demonstrando uma piora na funcionalidade (IFC) após 7 e 14 dias de lesão (Fig. 10).

Com relação ao IFC foi observado no 7º dia que o grupo Lesão+LEDn+Exercício apresentou resultado estatisticamente relevante com um melhor desempenho quando comparado ao grupo Lesão+Exercício.

Já em 14 dias o grupo Lesão+LEDn+Exercício apresentou resultado estatisticamente relevante quando comparado ao grupo Lesão e quando comparado os grupos lesionados e tratados, o grupo Lesão+LEDn+Exercício apresentou resultado estatisticamente relevante com melhor desempenho em relação ao grupo Lesão+Exercício. No mesmo período, entre os grupos irradiados, o grupo Lesão+LEDnm+Exercício apresentou resultado estatisticamente relevante quando comparado ao grupo Lesão+LEDn+Exercício (Fig.10).

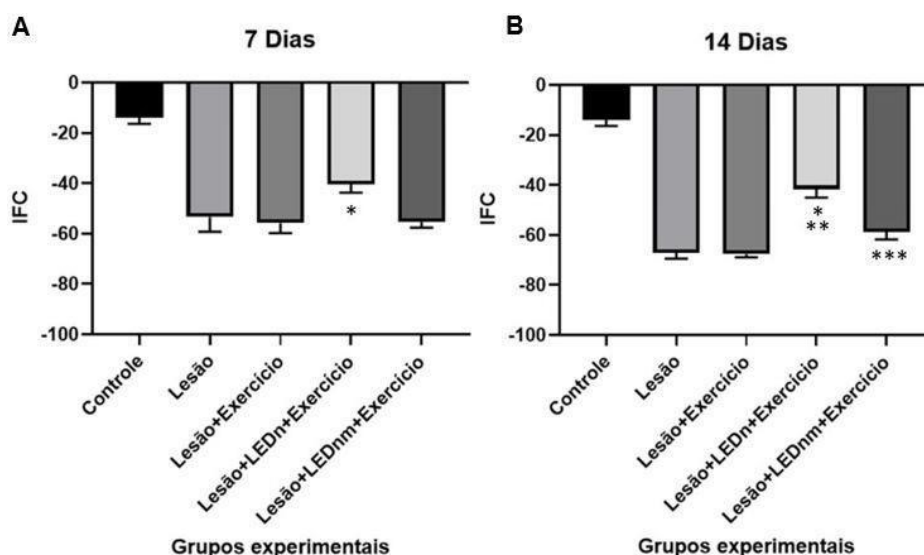


Figura 10: Efeitos do exercício e da fotobiomodulação sobre a funcionalidade após lesão nervosa periférica por esmagamento do nervo ciático no período experimental de 7 dias (A) e 14 dias (B); Em (A) * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão+Exercício. Em (B) * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão; ** $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão+Exercício; *** $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão+LEDn+Exercício (média e erro padrão – one-way ANOVA/Tukey).

Conforme demonstrado na figura 11, pode ser observado o esquema de passarela onde foram coletados os dados para análise do IFC e a plataforma com animal desempenhando a marcha para coleta do IFC. Já na figura 12, pode ser observada uma vista da descarga evidenciando deformidade no membro lesionado após coleta do IFC.

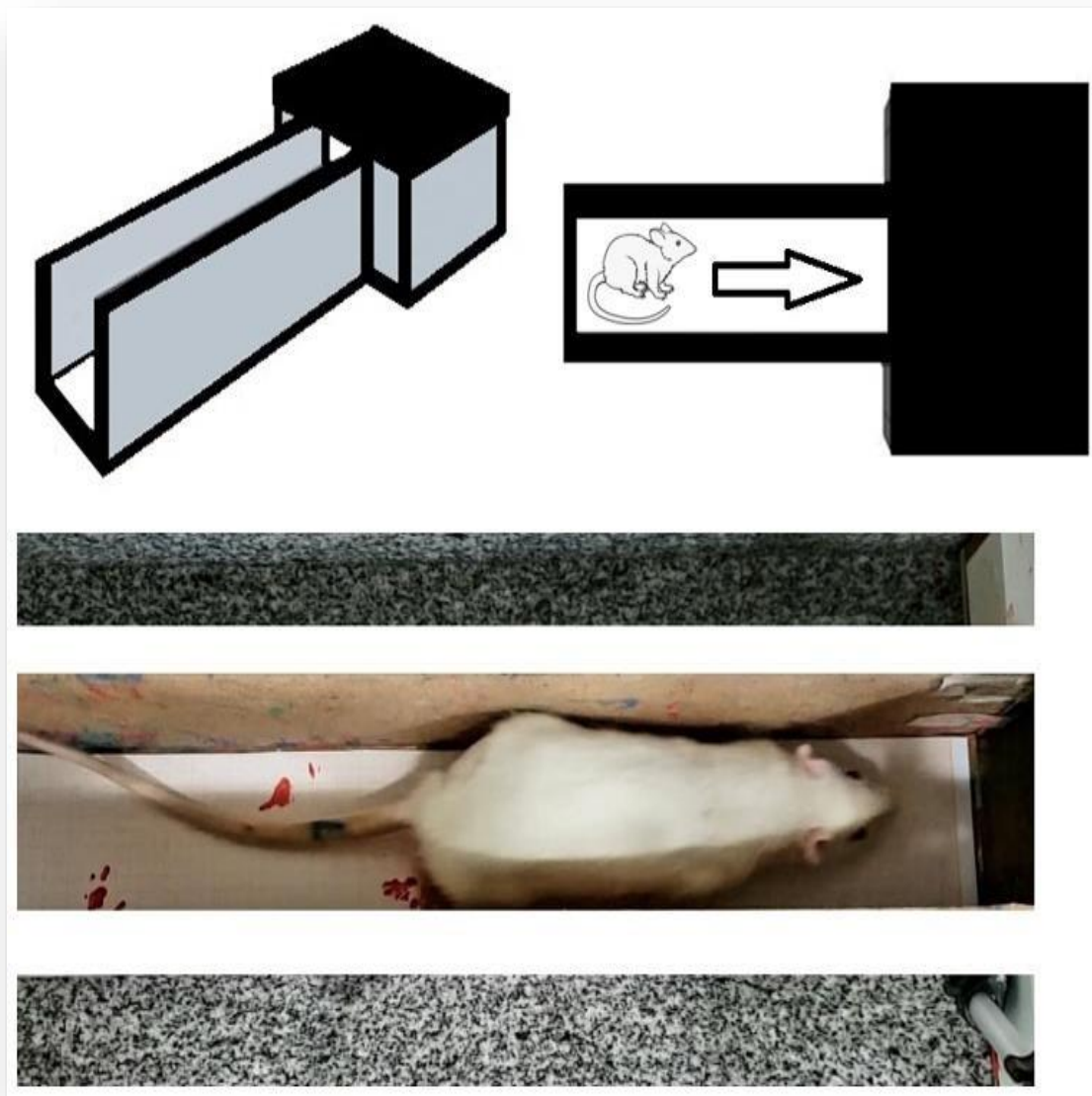


Figura 11: Imagem superior com esquema de passarela onde foi coletado o IFC. Imagem inferior com vista superior da plataforma com animal desempenhando a marcha para coleta do IFC.

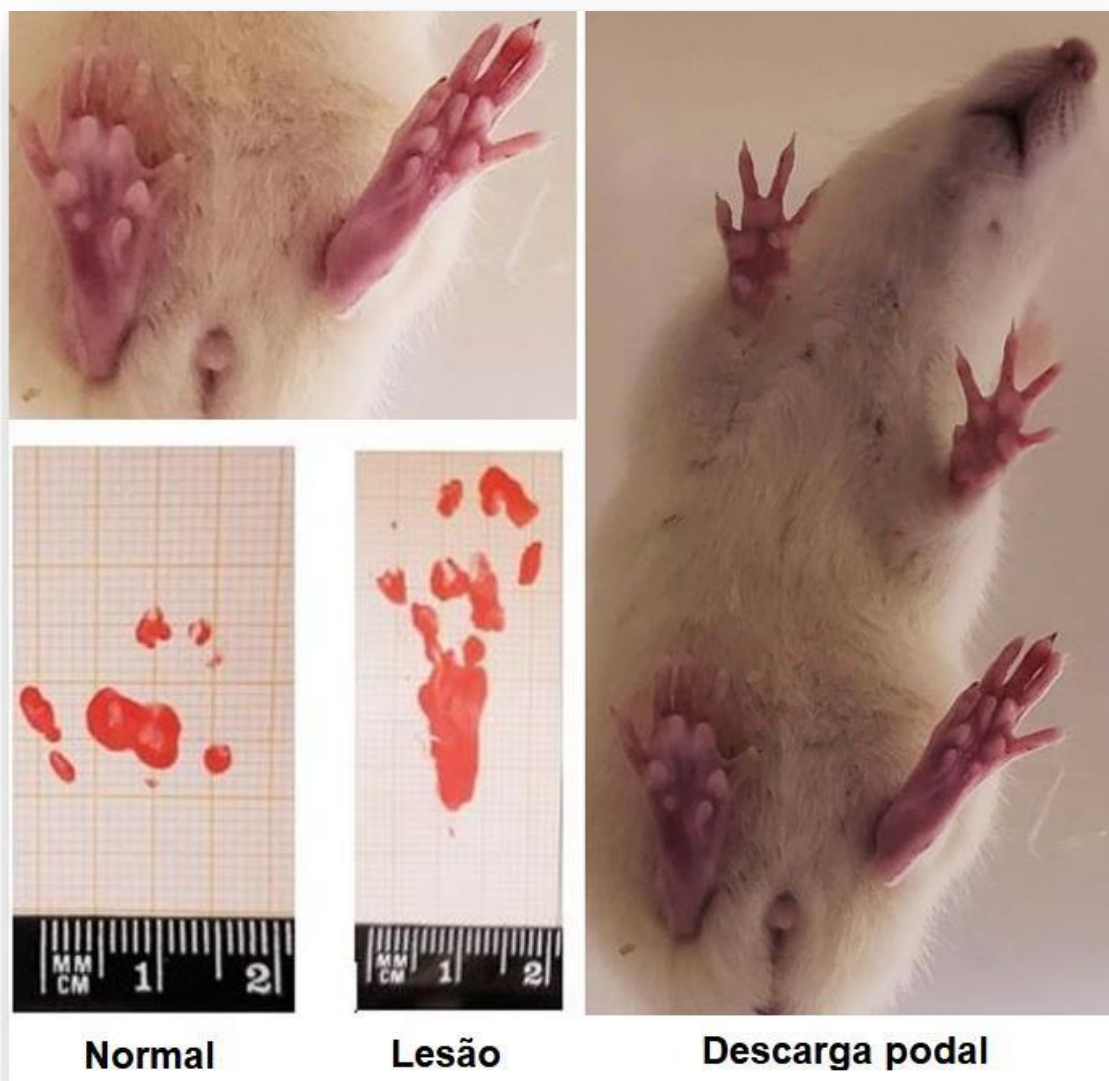


Figura 12: Vista da descarga evidenciando deformidade no membro lesionado e imagem capturada após coleta do IFC.

4.2 Análise da massa muscular e grau de atrofia

Os animais do grupo Controle apresentaram valores próximos a 1, como esperado, demonstrando uma similaridade entre as massas musculares dos músculos tibial anterior esquerdo e direito.

No período de 7 dias, os grupos Lesão, Lesão+LEDn+Exercício, Lesão+LEDnm+Exercício e Lesão+Exercício demonstraram uma diminuição da relação de massa muscular indicando aumento de atrofia quando comparado ao grupo Controle sendo que o mesmo ocorreu em 14 dias. Ainda em 7 Dias, não ocorreu resultado estatisticamente relevante entre os grupos lesionados (Fig. 13A).

Em 14 dias, o grupo Lesão+LEDn+Exercício apresentou resultado estatisticamente relevante quando comparado ao grupo Lesão e o grupo Lesão+LEDnm+Exercício apresentou resultado estatisticamente relevante quando comparado ao grupo Lesão+LEDn+Exercício demonstrando um melhor resultado entre os grupos irradiados (Fig. 13B).

Como demonstrado na Figura 14, pode-se observar a macroscopia da atrofia muscular e características do músculo tibial anterior direito (sem lesão) e esquerdo (lesionado) no período de 14 dias.

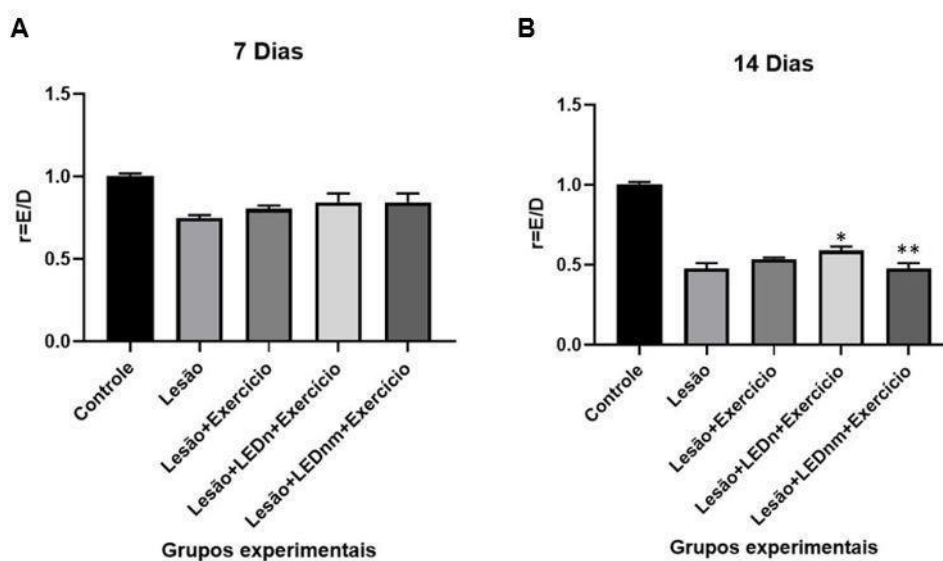


Figura 13: Efeitos do exercício e da fotobiomodulação sobre a atrofia muscular após lesão nervosa periférica por esmagamento do nervo ciático em no período experimental de 7 dias (A) e 14 dias (B); Em (A) não ocorreu resultado estatisticamente relevante entre os grupos lesionados. Em (B) * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão; ** $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão+LEDn+Exercício (média e erro padrão – one-way ANOVA/Tukey).

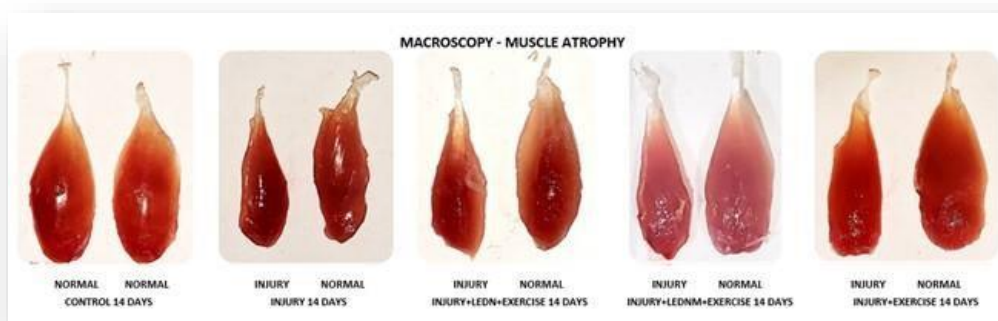


Figura 14: Macroscopia do tamanho (atrofia) e características do músculo tibial anterior direito (sem lesão) e esquerdo (lesionado) no período de 14 dias.

4.3 Análise von Frey

Em relação a hiperalgesia, no período de 7 e 14 dias os grupos Lesão, Lesão+LEDn+Exercício, Lesão+LEDnm+Exercício e Lesão+Exercício demonstraram uma diminuição na nocicepção em relação ao grupo Controle (Fig. 15A e 15B),

Já em 14 dias, os grupos Lesão+LEDn+Exercício e Lesão+LEDnm+Exercício apresentaram resultado estatisticamente relevante quando comparados ao grupo Lesão. Foi demonstrado também que no mesmo período os grupos Lesão+LEDn+Exercício e Lesão+LEDnm+Exercício apresentaram resultado estatisticamente relevante quando comparados ao grupo Lesão+Exercício (Fig. 15B).

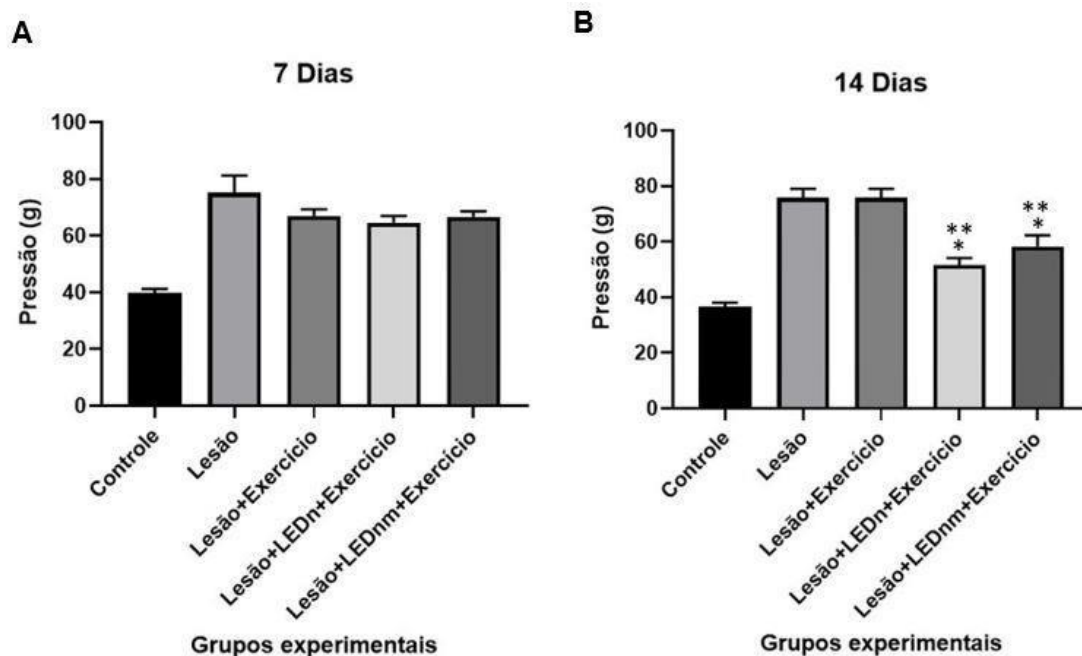


Figura 15: Efeitos do exercício e da fotobiomodulação sobre a hiperalgesia após lesão nervosa periférica por esmagamento do nervo ciático no período experimental de 7 dias (A) e 14 dias (B); Em (A) não ocorreu resultado estatisticamente relevante entre os grupos lesionados. Em (B) * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão; ** $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão+Exercício (média e erro padrão – one-way ANOVA/Tukey).

4.4 Avaliação qualitativa e quantitativa dos aspectos morfológicos musculares

O grupo Controle apresentou núcleos periféricos com as fibras musculares poligonais organizadas por endomísio e perimísio como esperado (Fig. 17A). No período após 7 dias, os grupos lesionados apresentaram diminuição no diâmetro e área de secção transversa (AST), além do aumento no espaço intersticial (Fig. 17B). O grupo Lesão apresentou uma atrofia progressiva (nos períodos de 7 e 14 dias).

Em 7 dias, o grupo Lesão+Exercício e Lesão+LEDnm+Exercício apresentaram resultado estatisticamente relevante demonstrando menor redução da AST quando comparado com o grupo Lesão. No mesmo período, o grupo Lesão+LEDn+Exercício apresentou resultado estatisticamente relevante quando comparado com o grupo Lesão+Exercício e o grupo Lesão+LEDnm+Exercício apresentou resultado estatisticamente relevante quando comparado com o grupo Lesão+LEDn+Exercício demonstrando um melhor resultado entre os grupos irradiados (Fig.16A).

Em 14 dias, os grupos Lesão+LEDn+Exercício e Lesão+LEDnm+Exercício apresentaram resultado estatisticamente relevante com aumento no diâmetro e na AST em comparação com o grupo Lesão. No mesmo período, os grupos Lesão+LEDn+Exercício e Lesão+LEDnm+Exercício apresentaram resultado estatisticamente relevante em comparação com o grupo Lesão+Exercício. Já entre os grupos irradiados o grupo Lesão+LEDnm+Exercício apresentou resultado estatisticamente relevante quando comparado ao grupo Lesão+LEDn+Exercício (Fig. 16B).

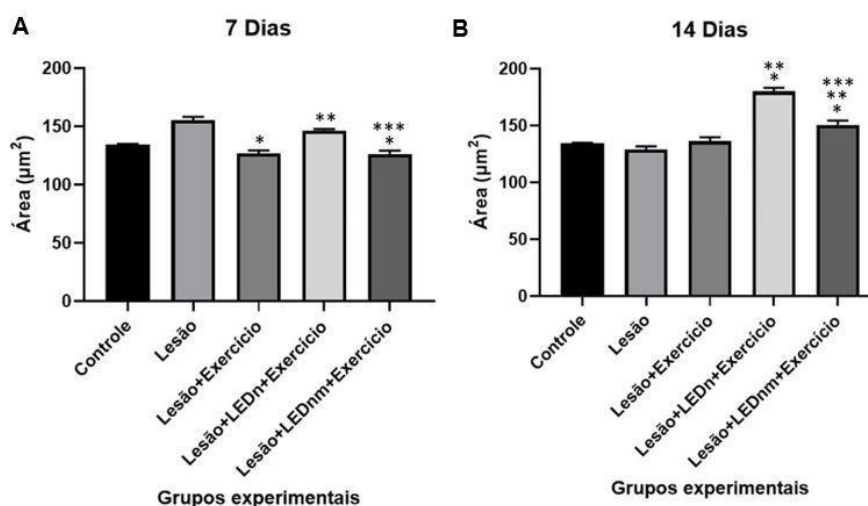


Figura 16: Efeitos do exercício e da fotobiomodulação sobre o diâmetro das fibras musculares após lesão nervosa periférica por esmagamento do nervo ciático no período experimental de 7 dias (A) e 14 dias (B); Em (A) * $p < 0.05$ comparado com o grupo Lesão; ** $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão+Exercício; *** $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão+LEDn+Exercício. Em (B) * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão; ** $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão+Exercício (média e erro padrão – one-way ANOVA/Tukey).

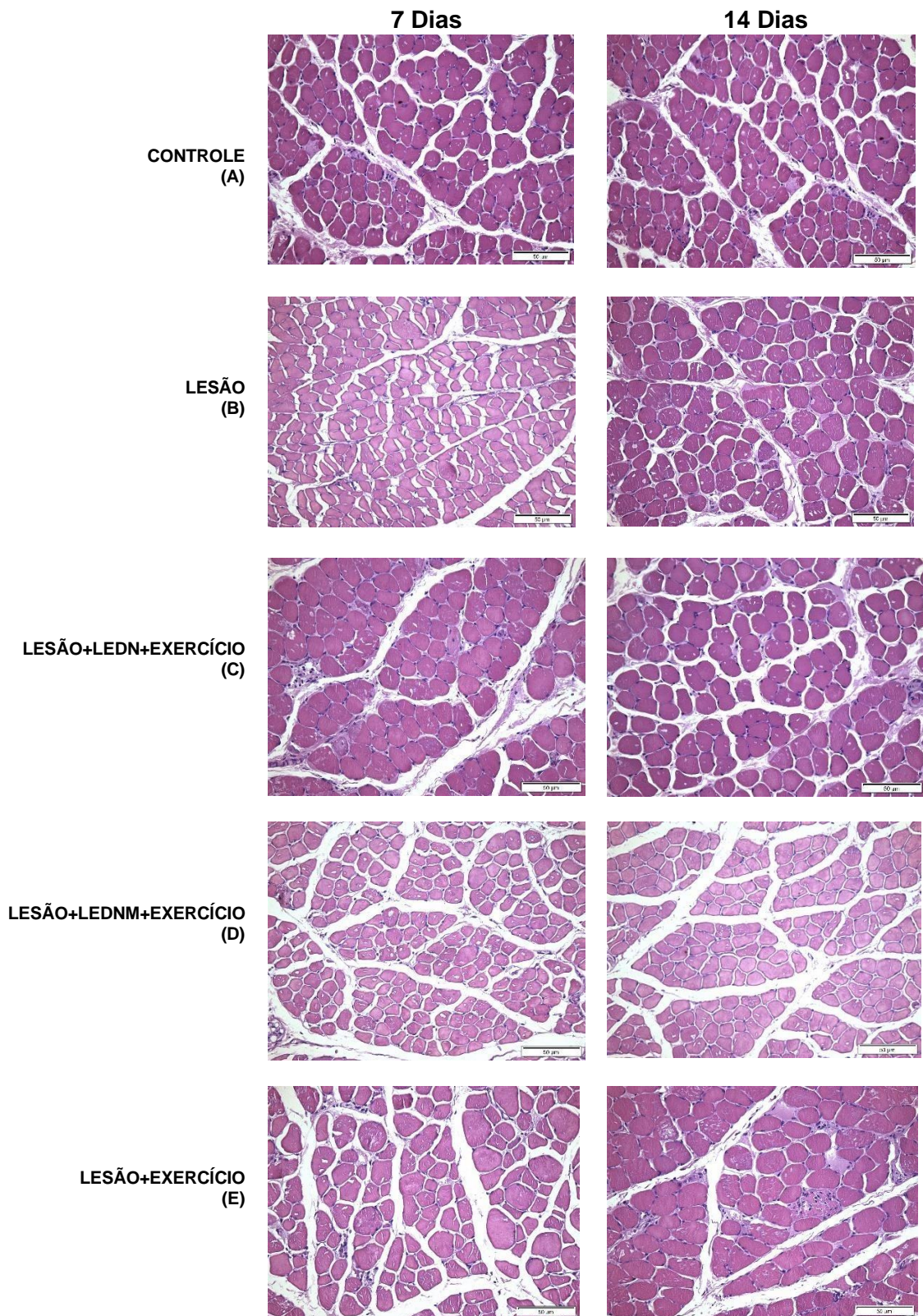


Figura 17: Fotomicrografias dos músculos em cortes transversais corados com hematoxilina e eosina (400X); (A) Controle; (B) Lesão, (C) Lesão+LEDn+Exercício, (D) Lesão+LEDnm+Exercício e (E) Lesão+Exercício nos devidos tempos experimentais.

4.5 Análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas

Os cortes corados com Picrosirius Red exibiram distribuição uniforme de colágeno no grupo Controle (Fig. 19).

Em 7 dias, os grupos Lesão+LEDnm+Exercício e Lesão+Exercício exibiram melhor organização e distribuição de colágeno quando comparados ao grupo Lesão (Fig. 19).

Em 7 dias, os grupos Lesão+Exercício, Lesão+LEDn+Exercício e Lesão+LEDnm+Exercício apresentaram resultado estatisticamente relevante quando comparado com o grupo Lesão (Fig. 18A).

Em 14 dias, os grupos Lesão+LEDn+Exercício, Lesão+LEDnm+Exercício e Lesão+Exercício exibiram melhor organização e distribuição de colágeno quando comparados ao grupo Lesão (Fig. 18B e 19). Ainda em 14 dias, os grupos Lesão+LEDn+Exercício, Lesão+LEDnm+Exercício apresentaram resultado estatisticamente relevante quando comparado com o grupo Lesão+Exercício (Fig. 18B e 19).

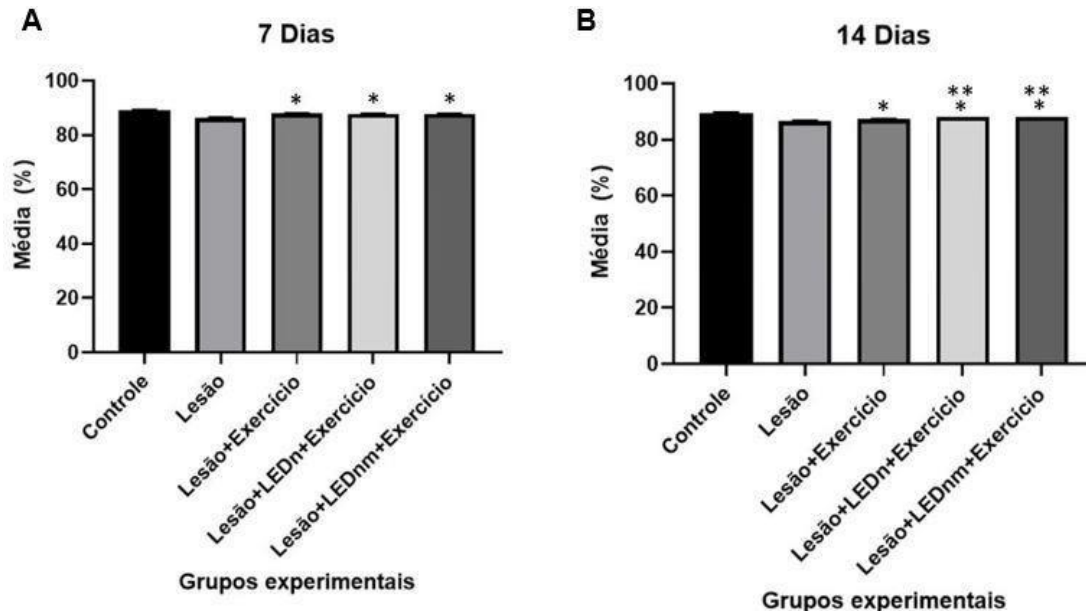


Figura 18: Efeitos do exercício e da fotobiomodulação sobre a média de colágeno quantificada como porcentagem após lesão nervosa periférica por esmagamento do nervo ciático no período experimental de 7 dias (A) e 14 dias (B); Em (A) * $p < 0.05$ comparado com o grupo Lesão. Em (B) * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão; ** $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Lesão+Exercício (média e erro padrão – one-way ANOVA/Tukey).

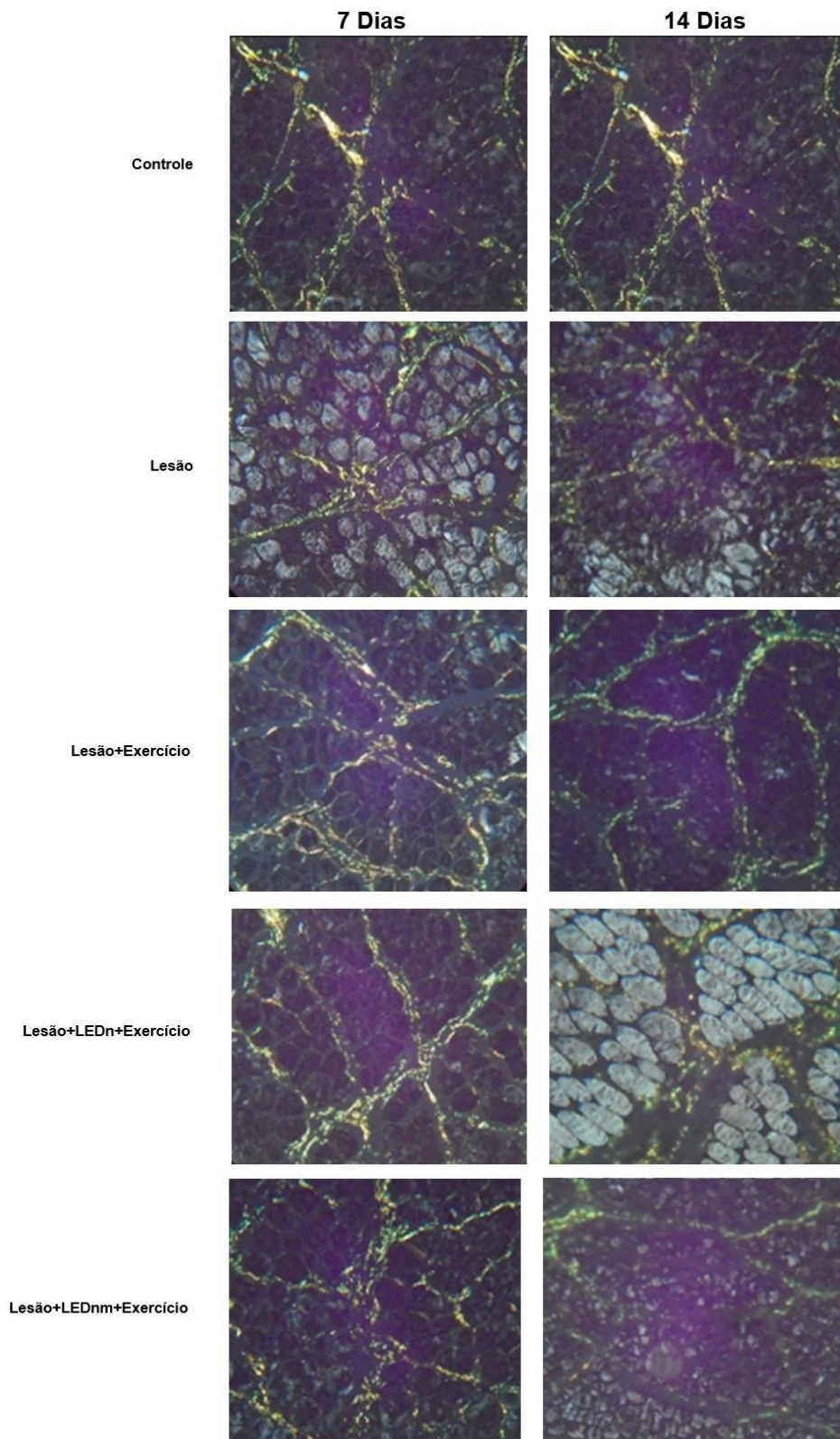


Figura 19: Cortes histológicos dos músculos TA corados com Picosirius Red com luz polarizada (ampliação original, 400) nos determinados grupos e tempos experimentais Controle; Lesão; Lesão+LEDn+Exercício; Lesão+LEDnm+Exercício e Lesão+Exercício.

5. Discussão

A busca por estratégias que possibilitem acelerar o processo de regeneração, têm sido um dos principais objetivos de estudo na área da reabilitação pós LNP. Neste contexto, muitos modelos experimentais têm sido utilizados para adquirir conhecimentos sobre a regeneração nervosa e muscular e desenvolver estratégias para promover a recuperação de forma mais rápida e mais eficiente no que se refere a funcionalidade (Rodriguez et al. 2004).

Neste contexto, a FBM já demonstrou resultados positivos quando utilizado após LNP do nervo ciático no que se refere a recuperação funcional e nocicepção como demonstrado no estudo de Andreo et al. (2020). Em adição, estes autores ainda descrevem os efeitos positivos da FBM com laser de baixa potência (780 nm, 0,04 cm², 1 W cm⁻², 3.2J) no reestabelecimento da arquitetura do tecido muscular (redução da atrofia muscular) e na expressão gênica dos receptores de calcineurina, miogenina e subunidades de receptores de acetilcolina, que estariam relacionados a uma recuperação nervosa e muscular mais efetiva sendo os melhores resultados encontrados mais evidentes 2 semanas após a LNP e é indicado a FBM para a área sobre o nervo lesado e o músculo afetado. Estes resultados estão em concordância com os achados do presente estudo, que objetivou analisar os efeitos da associação da FBM com LED e exercício, sendo esta última terapêutica muito utilizada na área da reabilitação após LNPs. Os presentes achados evidenciaram efeitos positivos mais pronunciados no que se refere a redução de atrofia, melhora funcional e nocicepção no grupo experimental que associou a FBM aplicada em região do nervo associado ao exercício em relação aos demais grupos que só utilizaram somente o exercício ou a FBM na região do nervo e músculo afetado pela lesão.

Os efeitos positivos da FBM no reparo do tecido muscular esquelético após diversos tipos de LNP estão bem descritos na literatura, no entanto, há efeitos variados de acordo com os diferentes parâmetros de irradiação e protocolos de tratamento, como por exemplo, aumento de funcionalidade (Hsieh et al. 2012), melhora na amplitude de movimento, atenuação da disestesia (Masoumpoor et al. 2014) e modulação da concentração de citocinas inflamatórias (Chen et al. 2014), funcionalidade, redução da atrofia muscular e da hiperalgesia (Andreo et al. 2020).

Jang et al. (2015) utilizaram protocolos de exercícios com velocidades próximas a 17m/min após LNP por esmagamento do nervo ciático em um estudo sendo o exercício realizado a 5m/min durante 20 min durante a primeira semana e a 15m/min durante 60 min da segunda à quarta semana e observaram aumento significativo da

recuperação funcional. Contudo nossos resultados evidenciaram que a melhora funcional não foi verificada no grupo submetido somente a exercício e sim, somente quando associada a FBM. Um fator que poderia ter influenciado tal resultado seria o início precoce do exercício após 24h da LNP, o número de sessões diárias em 5 dias consecutivos e a intensidade do protocolo de exercício.

Devido à controvérsia sobre o melhor momento para iniciar o exercício físico, bem como sua influência sobre a regeneração nervosa periférica, Sobral et al. (2008) avaliaram a influência do exercício físico em esteira, aplicado nas fases imediata e tardia da regeneração do nervo isquiático de ratos, após axoniotmese. Seus resultados evidenciaram que o protocolo de exercício em esteira aplicado nas fases imediata e tardia, não influenciou o brotamento axonal, no grau de maturação das fibras regeneradas porém, no 7º e 14º dias PO, os valores refletiram expressiva perda funcional, enquanto o 21º e o 28º dias diferem do 7º e do 14º dia demonstrando recuperação funcional. Desta forma, seus benefícios ao músculo poderiam sustentar sua aplicabilidade, especialmente no sentido de retardar atrofia, o que poderia refletir diretamente em recuperação funcional mais efetiva após a regeneração nervosa dependendo assim do protocolo de exercício aplicado sendo esse fator determinante para os resultados obtidos.

Os resultados encontrados podem ser decorrentes dos protocolos escolhidos; no estudo de Jang et al. (2015) a velocidade foi um pouco menor, enquanto no estudo de Seo et al. (2006) o tempo diário de exercício de 60 min foi dividido em duas sessões por dia. A intensidade do exercício foi determinada pela duração do exercício, inclinação e velocidade (Marqueste et al. 2004). Porém, o treinamento intervalado e o protocolo contínuo, com suas diferentes adaptações fisiológicas (Araujo et al. 2015), podem ter efeitos diferenciais nos resultados.

Seo et al. (2006) também demonstraram os efeitos positivos do exercício em esteira após LNP do nervo ciático quando realizado durante os 14 dias iniciais após a lesão, sendo verificada a melhora a regeneração do nervo ciático e a recuperação funcional (avaliada pelo IFC) realizando como treino na esteira uma corrida de 18 metros por minuto durante 30min sendo realizado duas vezes ao dia. Seus resultados diferem do presente estudo podendo ser um dos motivos a intensidade do protocolo de exercício aplicada no presente estudo.

O exercício intervalado de alta intensidade em esteira foi suficiente para promover o crescimento axonal semelhante ao promovido por 60 minutos em esteira a 10 m/min após a transecção do nervo fibular em camundongos (Sabatier et al. 2008). Assim, é importante considerar as variáveis que determinam a intensidade da reabilitação do exercício em esteira após lesão nervosa e analisar qual tipo de protocolo

é mais adequado para cada situação. Nossos resultados como mostrado anteriormente não evidenciaram melhora funcional avaliada pelo IFC com o protocolo de exercício empregado, alguns fatores como tempo de corrida na esteira e início precoce após 24h da LNP podem ter influenciado os resultados encontrados no presente estudo.

Ferreira et al. (2019) avaliaram os efeitos de duas intensidades de exercício em esteira nos tecidos nervoso e muscular e na recuperação funcional após lesão por esmagamento de nervo em ratos Wistar sendo que o exercício contínuo a 10 m/min acentuou a regeneração nervosa, acelerando a recuperação funcional e prevenindo a atrofia muscular em desacordo com os achados do presente estudo em relação a recuperação funcional porém, Ferreira et al (2019) utilizaram um protocolo de exercício que diferem em intensidade e início do protocolo do presente estudo tendo em seu protocolo início 7 dias após a LNP, podendo ser essa a justificativa dos achados contrários ao presente estudo. Assim, o protocolo de esteira usado no presente estudo mostrou ser ineficaz no que diz respeito a recuperação funcional quando realizado de forma isolada obtendo apenas resultados relevantes apenas quando associado a FBM aplicado a região do nervo lesionado.

Em nossos resultados ficou claro o papel da FBM sobre a melhora funcional uma vez que aplicado sobre a região nervosa associada ou não a região muscular corroborando esse resultado está de acordo o estudo de Soldera et al (2017) onde demonstrou que a FBM utilizando LED pós LNP aumentou a funcionalidade da marcha avaliada pelo IFC após 1 e 2 semanas, especialmente quando utilizada na região nervosa associada ou não à região muscular, induzindo um aumento da massa muscular em relação aos animais que não receberam tratamento no mesmo período, proporcionando também um aumento no limiar algíco sendo necessário um estímulo nociceptivo de maior intensidade para gerar um estímulo doloroso indicando uma melhor recuperação pós lesão. A dor neuropática é uma consequência frequente e adversa pós trauma. Foi demonstrado que o exercício em esteira reduz a alodínia e hiperalgesia, porém, o impacto do exercício em esteira sobre o desenvolvimento da alodínia depende do momento e da duração do protocolo de exercícios (Cobianchi et al. 2010).

Mecanismos relacionados corrida em esteira e diminuição da dor neuropática provavelmente envolvem citocinas alteradas e a liberação de mediadores pró-inflamatórios, dentro da medula espinhal (Bobinski et al. 2011), e modulação do padrão espacial e temporal da expressão de neurotrofinas no SNC e no SNP.

6. Considerações finais

Partindo dessas premissas, podemos concluir que o método mais adequado para este modelo experimental nestas condições foi o método de irradiação na região nervosa combinada ou não, sendo administrado tanto na área de lesão nervosa quanto no músculo afetado associados ao exercício.

O grupo lesionado e tratado apenas com exercício apresentou bons resultados quanto a melhora da hiperalgesia e aumento no diâmetro das fibras, porém quando associado ao LED principalmente quando aplicado em região nervosa demonstra uma potencialização na recuperação pós LNP apresentando bons resultados nas demais avaliações.

As análises funcionais realizadas permitiram concluir que os efeitos funcionais variam de acordo com o local de irradiação, sendo os motores, sensitivos e de massa muscular potencializados quando administrados combinado ou isoladamente na área de lesão nervosa associados ao exercício.

Nas análises morfológicas foi possível verificar que independentemente do local de irradiação há uma resposta muscular no sentido de reestabelecer os padrões normais, como uma diminuição no espaço intersticial e reorganização tecidual.

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 no nervo ciático irradiados pós LNP associados ao exercício.

O levantamento dos parâmetros de irradiação é importante para a padronização de um protocolo com objetivo de evidenciar os efeitos da fotobiomodulação utilizando LED na regeneração pós LNP, bem como protocolos de exercício e com isso, investigar maiores efeitos a respeito.

7. Conclusão

Com base nos resultados, é possível concluir que o uso da fotobiomodulação quando aplicada na região nervosa associada ao exercício físico em esteira de início precoce pode contribuir para uma melhora funcional da marcha, reduzir a atrofia muscular e atuar positivamente na nocicepção.

8. Referências Bibliográficas

Abe N, & Cavalli V. Sinalização de lesão nervosa. *Current Opinion in Neurobiology*, 18 (3) 2008, 276-283. doi: 10.1016/j.conb.2008.06.005.

Agonollitto PM, Chu MWK, Simão MN, Nogueira-Barbosa MH. Sciatic neuropathy: findings on magnetic resonance neurography. *Radiol Bras*. 2017 June; 50(3): 190-196.

Akgul T, Gulsoy M, & Gulcur HO. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. *Lasers in Medical Science*, 2013 29(1), 351–357. doi:10.1007/s10103-013-1355-9.

Anders JJ, Arany PR, Baxter GD, & Lanzafame RJ. Light-Emitting Diode Therapy and Low-Level Light Therapy Are Photobiomodulation Therapy. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*. 2019, doi:10.1089/photob.2018.4600.

Anders JJ, Moges H, Wu X, Erbele ID, Alberico SL, Saidu EK, Pryor BA... In vitro and in vivo optimization of infrared laser treatment for injured peripheral nerves. *Lasers in Surgery and Medicine*, 46(1), 34–45. 2013. doi:10.1002/lsm.22212.

Andrade IRS, Nakachima LR, Fernandes M, Fernandes CH, Santos JBG, Valente SG. Assessment of the Effects of Swimming as a Postoperative Rehabilitation on Nerve Regeneration of Wistar Rats Submitted to Grafting of Autologous Nerves after Injury to the Sciatic Nerve. *Rev Bras Ortop* 2020;55(3):323–32. Doi 10.1055/s-0039-1692711.

Andreo L, Ribeiro B, Alves A, Martinelli A, Soldera CB, Horliana A, Mesquita-Ferrari R (2020). Effects of photobiomodulation with low-level laser therapy on muscle repair following a peripheral nerve injury in Wistar rats. *Photochemistry and Photobiology*. doi:10.1111/php.13255.

Andreo L, Soldera CB, Guimarães Ribeiro B, de Matos PRV, Sousa PB, de Alcântara Araújo Amorim WW, Mesquita-Ferrari RA. (2018). Effects of Photobiomodulation on Functionality in Wistar Rats with Sciatic Nerve Injury. *Photochemistry and Photobiology*. doi:10.1111/php.13048.

Andreo L, Soldera CB, Ribeiro BG, Matos PRV, Bussadori SK, Fernandes KP, Mesquita-Ferrari RA. Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury. *Lasers in medical science*, 2017, Dec;32(9):2155-2165, doi: 10.1007/s10103-017-2359-7.

Araujo G, Gobatto CA, Reis IG, Pereira MM. Interval Versus Continuous Training With Identical Workload: Physiological and Aerobic Capacity Adaptations. October 2014 *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 64(2), doi: 10.33549/physiolres.932693.

Armada-da-Silva PAS (2013). [International Review of Neurobiology] *Tissue Engineering of the Peripheral Nerve - Biomaterials and physical therapy* Volume 109. Role of Physical Exercise for Improving Posttraumatic Nerve Regeneration., 125– 149. doi:10.1016/b978-0-12-420045-6.00006-7.

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.

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.

Bobinski F, Martins DF, Bratti T, Mazzardo-Martins L, Winkelmann-Duarte EC, Guglielmo LGA, & Santos, ARS. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. *Neuroscience*, 2011, 194, 337– 48. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.07.075.

Boeltz T, Ireland M, Mathis K, Nicolini J, Poplavski K, Rose SJ, Wilson E, English AW. Effects of treadmill training on functional recovery following peripheral nerve injury in rats. *J Neurophysiol* 2013;109:2645-2657.

Bonetti LV, Malysz T, Ilha J, Barbosa S, Achaval M, & Faccioni-Heuser MC (2017). The Effects of Two Different Exercise Programs on the Ultrastructural Features of the Sciatic Nerve and Soleus Muscle After Sciatic Crush. *The Anatomical Record*, 300(9), 1654– 1661. doi:10.1002/ar.23611.

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.

Carvalho JF, Masuda MO, & Pompeu FAMS. Método para diagnóstico e controle do treinamento aeróbio em ratos baseado no limiar de lactato. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2005, 140 (4), 409-413.

Casalechi HL, Nicolau RA, Casalechi VL, Silveira L, De Paula AMB, Pacheco MTT. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers in Medicine Science*. 2009. 24:659-65. PMID:18795398.

Cavalcante EVV et al. Efeito da eletroestimulação no músculo desnervado de animais: revisão sistemática. *Fisioter. mov.*, Curitiba, v. 25, n. 3, p. 669-678, Sept. 2012.

Chen YW, Tzeng JI, Lin MF, Hung CH, & Wang JJ. (2014). Forced Treadmill Running Suppresses Postincisional Pain and Inhibits Upregulation of Substance P and Cytokines in Rat Dorsal Root Ganglion. *The Journal of Pain*, 15(8), 827– 834. doi:10.1016/j.jpain.2014.04.010.

Cobianchi S, Marinelli S, Florenzano F, Pavone F, & Luvisetto S. Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 2010, 168(1), 273–287.

Cobianchi S, Arbat-Plana A, Lopez-Alvarez VM, Navarro X. Neuroprotective Effects of Exercise Treatments After Injury: The Dual Role of Neurotrophic Factors. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(4):495-518. doi: 10.2174/1570159X14666160330105132.

Coradini JG, Kunz RI, Kakihata CM, Errero TK, Bonfleur ML, Ribeiro Lde F, Brancalhão RM, Bertolini GR. Swimming does not alter nociception threshold in obese rats submitted to median nerve compression. *Neurol Res* 2015;37:1118-1124.

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

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

Dedkov EI, Kostrominova TY, Borisov AB, & Carlson BM. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of the satellite cell population. *The Anatomical Record*, 2001, 263(2), 139–154. doi:10.1002/ar.1087.

Dubový P, Brázda V, Klusáková I, Hradilová-Svíženská I. 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* 2013,10:55.

English AW, Wilhelm JC, & Ward PJ. Exercise, Neurotrophins, and Axon Regeneration in the PNS. *Physiology*, 2014, 29(6), 437–445. doi:10.1152/physiol.00028.2014.

Ferreira MC, Oliveira MX, Souza JI, Souza RA, Machado TPG, Santos AP. Effects of two intensities of treadmill exercise on neuromuscular recovery after median nerve crush injury in Wistar rats. *J J Exerc Rehabil.* 2019;15(3):392-400. Published online 2019 June 26, DOI: <https://doi.org/10.12965/jer.19.328126.063>.

Foley TE, Greenwood BN; Day HEW, Kock LG, Britton SL, Fleshner M. Elevated central monoamine receptor mRNA in rats bred for high endurance capacity: Implications for central fatigue. *Behavioural Brain Research*, 2006; v. 174, p. 132-142.

Garland Jr T, Schutz H, Chappell MA, Keeney BK, Meek TH, Copes LE, Acosta W, Drenowatz C, Maciel RC, Van Dijk G, Kotz CM, Eisenmann JC. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. *The Journal of Experimental Biology*, v. 214, p. 206-229, 2011.

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

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.

González-Forero D, & Moreno-López, B. Retrograde response in axotomized motoneurons: Nitric oxide as a key player in triggering reversion toward a dedifferentiated phenotype. *Neuroscience*, 283, 2014, 138–165. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.08.021.

Gordon T, & English AW. Strategies to promote peripheral nerve regeneration: electrical stimulation and/or exercise. *European Journal of Neuroscience*, 2015, 43(3), 336– 350. doi:10.1111/ejn.13005.

Guedert GD, Avaliação das repercussões do exercício físico sobre a regeneração nervosa de ratos Wistar submetidos a axonotmese do nervo isquiático. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, 119p, 2014.

Gutman E, Jakoubek B. Effect of increased motor activity on regeneration of the peripheral nerve in young rats. *Physiol. Bohemoslov.*, 12: 463-468, 1963.

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

Heiskanen V, & Hamblin MR. Fotobiomodulação: lasers vs. diodos emissores de luz? *Photochemical & Photobiological Sciences*, 17 (8), (2018). 1003–1017.

Howlett RA, Gonzalez NC, Wagner HE, Fu Z, Britton SL, Kock LG, Wagner PD. Selected contribution: skeletal muscle capillarity and enzyme activity in rats selectively bred for running endurance. *Journal of Applied Physiology*, 2003; v. 94 n.4, p. 1682-1688.

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.

Ilha J, Araujo RT, Malysz T, Hermel EES, Rigon P, Xavier LL, & Achaval M. Endurance and Resistance Exercise Training Programs Elicit Specific Effects on Sciatic Nerve

Regeneration After Experimental Traumatic Lesion in Rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 2007, 22(4), 355–366.

Jang SH, & Lee JH. (2015). Effects of physical exercise on the functional recovery of rat hindlimbs with impairments of the sciatic nerve as assessed by 2D video analysis. *Journal of Physical Therapy Science*, 27(3), 935–938. doi:10.1589/jpts.27.935.

Jessen KR, & Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Reviews Neuroscience*, 2005, 6(9), 671–682.

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.

Koerber HR, Mirnics K, Lawson JJ Synaptic plasticity in the adult spinal dorsal horn: the appearance of new functional connections following peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* v.200, p.468-479, 2006.

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

Lago N, & Navarro X. (2006). Correlação entre a reinervação do alvo e a distribuição dos axônios motores no nervo ciático de rato ferido. *Journal of Neurotrauma*, 23 (2), 227–240.

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

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

Lerman I, Harrison BC, Freeman K, Hewett TE, Allen DL, Jeffrey R, Leinwand LA. Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. *Journal of Applied Physiology*, 2002 v. 92, p. 2245-2255.

Li NY, Onor GI, Lemme NJ, Gil JA. Epidemiology of Peripheral Nerve Injuries in Sports, Exercise, and Recreation in the United States, 2009 – 2018. *Phys Sportsmed*, 23 de novembro de 2020; 1-8, doi: 10.1080 / 00913847.2020.1850

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

Manchado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, & Mello MAR. The maximal lactate steady state is ergometer-dependent in experimental model using rats. *Revista Brasileira de Medicina Do Esporte*, 2006, 12(5), 259–262.

Marqueste T, Alliez JR, Alluin O, Jammes Y, & Decherchi P. (2004). Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. *Journal of Applied Physiology*, 96(5), 1988–1995. doi:10.1152/jappphysiol.00775.2003.

Martins RS, Siqueira MG, Silva CF, Plese JPP. Mecanismos básicos da regeneração de nervos. *Arq Bras Neurocir* 24(1): 20-25, março de 2005.

Masoumpoor 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 in Medical Science*, 29(5), 1593–1598. doi:10.1007/s10103-014-1552-1

Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, & Fazan VPS. (2006). Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. *Acta Ortopédica Brasileira*, 14(4), 220-225. Doi:10.1590/S1413-78522006000400009.

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

Melo RM, Martinho E., & Michelini, LC. Efeito de redução de pressão induzido por treinamento em SHR: amplos efeitos no perfil circulatório de músculos exercitados e não exercitados. *Hipertensão*, 2003, 42 (4), 851–857

Melo SF, Lunz W, Fontes EP, Dias CM, Carneiro Jr MA, Moura AG, Moura AG, Del Carlo RJ, Natali AJ. Níveis distintos de Hsp72 no miocárdio de ratas em resposta aos exercícios voluntário e forçado. *Arq Bras Cardiol* 2009, v. 93, n. 5, p. 456-462.

Minamoto VB. Effect of denervation on skeletal muscle: a review. *Fisioterapia em Movimento*, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 63-69, jul./set. 2007

Moges H, Wu X, McCoy J, Vasconcelos OM, Bryant H, Grunberg NE, & Anders JJ. (2011). Effect of 810 nm light on nerve regeneration after autograft repair of severely injured rat median nerve. *Lasers in Surgery and Medicine*, 43(9), 901– 906. doi:10.1002/lsm.21117

Mohammed IFR, & Kaka LN (2007). Promotion of Regenerative Processes in Injured Peripheral Nerve Induced by Low-Level Laser Therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, 25(2), 107–111. doi:10.1089/pho.2006.1090

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

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

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

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.

Papageorgiou P, Katsambas A, Chu A. Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of acne vulgaris From British Journal of Dermatology Volume 142 Issue 5 Page 973 - May 2000.

Peretti AL, Antunes JS, Lovison K, Karvat J, Higuchi G, Brancalhão RMC, Bertolini GRF, Ribeiro LFC. Ação do exercício de subida em escada com sobrecarga na morfologia do músculo tibial anterior de ratos Wistars após axonotmese. *Conscientiae Saúde* 2017 v. 16, n. 1.

Pigatto GR, Agne FE, Bauermann LF, Ferreira J, Santos GT, Freitas RB, Rosa F. Study of infrared light emitting diodes infrared on neuropathic pain in rats. *Fisioterapia Brasil - Volume 14 - Número 4 - julho/agosto de 2013*.

Pilis W, Zarzeczny R, Langfort J, Kaciuba-Uścielko H, Nazar K, Wojtyna J. Anaerobic threshold in rats. *Comp Biochem Phsiol.* 1993;106(2):285-9.

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

Possamai F, Siepmo CM, André ES. Investigação dos efeitos do exercício terapêutico sobre a regeneração nervosa periférica. *ACTA FISIATR.* 2010; 17(4): 142 – 147.

Radanovic M. *Neurologia básica para profissionais da área da saúde.* São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

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

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

Rochkind, Shimon (2016). Photobiomodulation Triple Treatment in Peripheral Nerve Injury: Nerve and Muscle Response. *Photomedicine and Laser Surgery,* 34(12), 638–645. doi:10.1089/pho.2016.4095

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

Rosso M, Buchaim D, Kawano N, Furlanette G, Pomini K, & Buchaim R.. Terapia de fotobiomodulação (TFBM) na regeneração de nervos periféricos: uma revisão sistemática. *Bioengineering*, 2018, 5 (2), 44.

Sabatier MJ, Redmon N, Schwartz G, & English AW. (2008). Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. *Experimental Neurology*, 211(2), 489–493. doi:10.1016/j.expneurol.2008.02.013

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

Santos AP, Suaid CA, Xavier M, & Yamane F. (2011). Functional and morphometric differences between the early and delayed use of phototherapy in crushed median nerves of rats. *Lasers in Medical Science*, 27(2), 479–486. doi:10.1007/s10103-011-0972-4

Sarikcioglu L, & Oguz N. (2001). Exercise Training and Axonal Regeneration After Sciatic Nerve Injury. *International Journal of Neuroscience*, 109(3-4), 173– 177. doi:10.3109/00207450108986533

Seddon HS (1975) *Surgical disorders of the peripheral nerves*, 2nd edn. Churchill Livingstone, Edinburgh

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.

Seo TB, Han IS, Yoon JH, Hong, KE, Yoon SJ, & Namgung U. (2006). Involvement of Cdc2 in Axonal Regeneration Enhanced by Exercise Training in Rats. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 38(7), 1267–1276, doi:10.1249/01.mss.0000227311.00976.68.

Serafim KGG, Ramos SP, de Lima FM, Carandina M, Ferrari O, Dias IFL, ... Siqueira CPCM. (2011). Effects of 940 nm light-emitting diode (led) on sciatic nerve regeneration in rats. *Lasers in Medical Science*, 27(1), 113–119. doi:10.1007/s10103-011-0923-0

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, doi:10.1002/jbm.a.34581.

Silva JMN, Carvalho JPC, Moura Júnior MJ. Morphometric study of low power LED therapy tendonitis in rats. *Fisioterapia e Pesquisa*, São Paulo, 2011, v.18, n.4, p. 365-70, out/dez.

Silva CK, Camargo EA. Mecanismos envolvidos na regeneração de lesões nervosas periféricas. *Revista Saúde e Pesquisa*, 2010, v. 3, n. 1, p. 93-98, jan./abr.

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, doi.org/10.1590/S1413-35552012005000035.

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

Soares D, Lima NR, Coimbra C, & Marubayashi U. Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2003; 74(2), 357–362, doi:10.1016/s0091-3057(02)01003-1.

Soares D, Lima NR, Coimbra C, & Marubayashi U. (2003). Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 74(2), 357–362. doi:10.1016/s0091-3057(02)01003-1

Sobral LL, Oliveira LS, Takeda SYM, Somazz MC, Montebelo MIL, Teodori RM. Exercício imediato versus tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após

axoniotmese: análise histomorfométrica e funcional. *Rev. bras. fisioter.* 2008 Aug; 12(4): 311-316, doi.org/10.1590/S1413-35552008000400010.

Soldera CB. Efeitos da fotobiomodulação utilizando LED sobre os aspectos morfológicos musculares e reparo do tecido nervoso pós lesão de nervo ciático de ratos wistar. 2017. 50 f. Dissertação(Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação) - Universidade Nove de Julho, São Paulo.

Souza FI, Zumiotti AV, Silva CF. Neuregulinas 1-alfa e 1-beta na regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortop Bras.* 2010;18(5):250-4, doi.org/10.1590/S1413-78522010000500003.

Suaid CA, Santos AP, Yamane FO, Fazan VPS, & Barreira AA. Aspects of the macro and microscopic anatomy of the sciatic nerve in Wistar rats. *Int. J. Morphol.*, 34(3):877-884, 2016, doi: 10.4067/S0717-95022016000300010.

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, doi:10.1016/s0304-3959(00)00240-2.

Tam SL, Archibald V, Jassar B, Tyreman N, & Gordon T. Increased Neuromuscular Activity Reduces Sprouting in Partially Denervated Muscles. *The Journal of Neuroscience*, 21(2), 2001, 654–667. doi:10.1523/jneurosci.21-02-00654.2001

Taylor CA, Braza D, Rice JB, & Dillingham T. A incidência de lesão do nervo periférico em trauma de extremidade. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 2008; 87 (5), 381–385, doi: 10.1097/PHM.0b013e31815e6370.

Trelles MA, Allones I, Mayo E. Combined visible light and infrared lightemitting diode (LED) therapy enhances wound healing after laser ablative resurfacing of photodamaged facial skin. *Medical Laser Application.* 2006; 21:165–75(a), doi.org/10.1016/j.mla.2006.06.001.

Udina E, Cobianchi S, Allodi I, & Navarro X. (2011). Effects of activity-dependent strategies on regeneration and plasticity after peripheral nerve injuries. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 193(4), 347–353, doi:10.1016/j.aanat.2011.02.012.

Vale OC. Fisiopatologia das doenças dos nervos periféricos. RECCSS, 1988

Van Meeteren NLU, Brakkee JH, Hamers FPT, Helden PJM, & Gispen WH. (1997). Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 78(1), 70–77. doi:10.1016/s0003-9993(97)90013-7

Whelan HT, Buchmann EV, Dhokalia A, Kane MP, Whelan NT, Wong-Riley MT, Eells JT, Gould LJ, Hammamieh R, Das R, Jett M. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. *Journal of Clinical Laser medicine & Surgery*. 2003; 21(2):67-74, doi:10.1089/104454703765035484.

Whelan HT, Smits RL, Buchmann EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA, Cevenini V, Stinson H, Ignatius R, Martin T, Cwiklinski J, Philippi AF, Graf WR, Hodgson B, Gould LJ, Kane M, Chen G, Caviness J. Effect of Nasa Light-Emitting Diode Irradiation on Wound Healing. *Journal of Clinical Laser medicine & Surgery*. 2001, 19(6):305-14, doi.org/10.1089/104454701753342758.

Yeh NG, Wu CH, Cheng TC. Light-emitting diodes – Their potential in biomedical applications. *Renew Sustain Energy Rev*. 2010, 14:2161-66, doi:10.1016/j.rser.2010.02.015.

9. Anexos

ANEXO 1

Comprovante de submissão de artigo na revista ACTA FISIATRICA

The screenshot shows the 'Acta Fisiátrica' journal submission portal. The top navigation bar includes the journal name and a 'Tasks' section with a '0' notification. The main content area is titled 'Submissions' and features two tabs: 'My Queue' (with a '1' notification) and 'Archives'. Below the 'My Assigned' section, there is a search bar and a list of articles. The first article listed is '178200 Soldera et al.' with the title 'Effects of photobiomodulation therapy using LED on functioning after a crush injury of the sciatic nerve in Wistar rats'.

Acta Fisiátrica Tasks 0

Submissions

My Queue 1 Archives

My Assigned Search

178200 **Soldera et al.**
Effects of photobiomodulation therapy using LED on functioning after a crush injury of the sciatic nerve in Wistar rats

ANEXO 2

**Effects of Photobiomodulation with Low-level Laser Therapy on Muscle Repair Following a Peripheral Nerve Injury in Wistar Rats**

Lucas Andreo¹, Beatriz G. Ribeiro², Agnelo N. Alves¹, Andreia S.A. Martinelli², Carla B. Soldera², Anna Carolina R.T. Horliana¹, Sandra Kalil Bussadori^{1,2}, Kristianne P.S. Fernandes¹, Raquel A. Mesquita-Ferrari^{1,2*}



1 Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, University Nove de Julho (UNINOVE), Sao Paulo, SP, Brazil

2 Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, University Nove de Julho (UNINOVE), Sao Paulo, SP, Brazil

Received 10 December 2019, accepted 11 February 2020,

DOI: 10.1111/php.13255

Effects of Photobiomodulation with Low-level Laser Therapy on Muscle Repair Following a Peripheral Nerve Injury in Wistar Rats

Lucas Andreo¹ , Beatriz G. Ribeiro², Agnelo N. Alves¹, Andréia S.A. Martinelli², Carla B. Soldara², Anna Carolina R.T. Horliana¹, Sandra Kalil Bussadori^{1,2}, Kristianne P.S. Fernandes¹ and Raquel A. Mesquita-Ferrari^{1,2*} 

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

²Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, University Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil

Received 10 December 2019, accepted 11 February 2020, DOI: 10.1111/php.13255

ABSTRACT

Peripheral nerve injury (PNI) can lead to sensory and/or motor impairment. As a treatment photobiomodulation (PBM) has demonstrated positive effects in terms of the maintenance of muscle activation and trophism. Wistar rats were divided into five groups: control, injury, injury + PBMn (irradiation over injured nerve), injury + PBMm (irradiation over affected muscle) and injury + PBMnm (irradiation over nerve and muscle). The left sciatic nerve was submitted to a crushing injury. Treatment was administered with low-level laser (780 nm, 0.04 cm², 1 W cm⁻², 3.2 J) over the injured nerve and/or the tibialis anterior muscle. The effects of PBM were favorable on muscle morphology and gene expression of calcineurin, myogenin and acetylcholine receptors. PBM led to an acceleration on muscle repair process, and effects were more evident in 2 weeks after PNI. Thus, PBM is indicated for the area over both the injured nerve and the affected muscle.

INTRODUCTION

Peripheral nerve injury (PNI) can exert a negative impact on quality of life due to the possibility of sensory and/or motor impairment. About one to two percent of patients seen in the emergency room have this type of injury (1,2).

A repair process initiates after a PNI, involving neuronal growth, reinnervation and functional recovery (3). For an injury accompanied by Wallerian degeneration, such as crushing injuries, the muscles that had been innervated by the injured nerve undergo progressive deterioration (4), with the insufficient replacement of tissue and degenerative loss (5).

The major change stemming from a PNI is muscle atrophy, with an increase in the concentration of calcineurin, which is a protein activated by the increase of the concentration of calcium. The activation of calcineurin alters the phenotypic pattern of the muscle to slow-twitch fibers (6). There is also a change in myostatin concentration, which plays an inhibitory role in muscle growth. Complete denervation in rats leads to an initial increase

in the gene expression and protein concentration of myostatin in skeletal muscle; this concentration decreases after 2 weeks to a lower concentration than normal (7). Myostatin inhibits the activation and differentiation of satellite cells into myoblasts and myoblasts into myotubes through the downregulation of regulatory myogenic factors (RMFs), such as MyoD and myogenin (8).

Changes occur in the gene expression of RMFs in muscle tissue after denervation, increasing in the acute period followed by a progressive reduction. Specifically, in the tissue of the tibialis anterior (TA) muscle following transection of the sciatic nerve in Wistar rats, the peak increase in MyoD and Myf5 gene expression occurs after 1 month and returns to normal 7 months following complete denervation. However, the peak gene expression of RMF4 and myogenin occurs after 9 days and returns to normal after 2 months (9,10).

RMFs regulate the differential expression of the genes of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits (11). These subunits are present at high concentrations on the tops of the secondary folds of the neuromuscular junction (NMJ) (12) and have two forms of presentation: the immature extrajunctional form found in embryonic or denervated fibers and the mature junctional form. The subunits in the immature form are $\alpha 1$ (2), $\beta 1$, δ and γ , and the subunits in the mature form are $\alpha 1$ (2), $\beta 1$, δ and ϵ .

After denervation, an initial increase occurs in the immature form, followed by a return to normal during the repair process, with the replacement of the ϵ -nAChR subunits with γ -nAChR subunits. Specifically in the TA muscle denervated by sciatic nerve transection in Wistar rats, an increase in the gene expression of the γ and ϵ subunits occurs, with a peak at 9 days, followed by a progressive decrease in γ -nAChR gene expression and a progressive increase in the expression of ϵ -nAChR (9,10).

These changes in nAChR affect the stability of the NMJ and regeneration following denervation (10). A change occurs in the number and density of regenerative axons in the NMJ, with progressive degeneration of the axonal sheath of the intramuscular nerve, making axonal infiltration difficult in muscle fibers and leading to a reduction in the number of motor units, with a consequent decrease in NMJ receptors (10).

Low-level laser therapy (LLLT) has been shown to be a viable noninvasive treatment modality for PNI. Photobiomodulation (PBM) stimulates tissue repair, analgesia and reduction of the inflammatory process (13). The photobiomodulatory effect

*Corresponding author email: raquelmesquita@gmail.com (Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari)

Anexo 3

**Effects of Photobiomodulation on Functionality in Wistar Rats with Sciatic Nerve Injury**

Lucas Andreo¹, Carla B. Soldera², Beatriz Guimaraes Ribeiro ², Patrick Raoul Vicente de Matos³, Paola Bindaes Sousa³, Wesley Wallace de Alcantara Araujo Amorim³, Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana¹, Sandra Kalil Bussadori^{1,2}, Kristianne Porta Santos Fernandes¹, Raquel Agnelli MesquitaFerrari^{*1,2}

1- Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, University Nove de Julho (UNINOVE), Sao Paulo, SP, Brazil



2- Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, UNINOVE, Sao Paulo, SP, Brazil

3- Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Sao Paulo, SP, Brazil

Received 7 May 2018, accepted 30 October 2018,

DOI: 10.1111/php.13048

Effects of Photobiomodulation on Functionality in Wistar Rats with Sciatic Nerve Injury

Lucas Andreo¹ , Carla A. Soldera², Beatriz Guimarães Ribeiro², Patrick Raoul Vicente de Matos³, Paola Bindaes Sousa³, Wesley Wallace de Alcântara Araújo Amorim³, Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana¹, Sandra Kalil Bussadori^{1,2}, Kristianne Porta Santos Fernandes¹ and Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari^{1,2} 

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

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

³Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, SP, Brazil

Received 7 May 2018, accepted 30 October 2018, DOI: 10.1111/php.13048

ABSTRACT

A peripheral nerve injury (PNI) can result in motor or sensory disorders. Low-level laser therapy (LLLT) has demonstrated positive results as a treatment option for PNI. Wistar rats were divided into five groups: Control, Injury, Injury + LLLTn (nerve), Injury + LLLTm (muscle) and Injury + LLLTn + m (nerve and muscle irradiation). The groups were analyzed after one, two, three and four weeks. PNI was achieved by crushing the sciatic nerve. Laser treatment (780 nm, 3.2 J) was realized over the nerve and/or tibialis anterior muscle. In gait analyses, the groups irradiated over the nerve demonstrated an improvement after two weeks. In the analysis of mechanical sensitivity, the Injury + LLLTn demonstrated a reduction after one week in comparison with Injury group; the Injury + LLLTn + m and Injury + LLLTm demonstrated an increase after two weeks in comparison with Injury group; and the irradiated groups demonstrated a reduction in nociception after four weeks in comparison with Injury group. In the analysis of muscle atrophy, the Injury + LLLTn demonstrated more muscle mass after two weeks. LLLT improves functional aspects related to gait, mechanical sensitivity and muscle mass, with better results regarding motor aspects and muscle mass when administered over the injured nerve and better results regarding sensory aspects when administered over the muscle.

Abbreviations: PNI, peripheral nerve injury; LLLT, low-level laser therapy; SFI, sciatic functional index; TFI, tibial functional index; PFI, peroneal functional index.

INTRODUCTION

While a peripheral nerve injury (PNI) does not place the life of an affected individual at risk, it can exert a negative impact on quality of life due to the possibility of incomplete regeneration, resulting in motor and sensory disorders. Approximately, 1.2%

of the population treated at emergency rooms presents this type of injury (1,2).

After a PNI, the repair process begins, which entails neuronal growth, re-innervation and functional recovery (3). In an injury accompanied by Wallerian degeneration, as occurs in crush injuries, the muscles innervated by the affected fiber undergo progressive deterioration (4), with the insufficient replacement of the degenerated tissue (5). The main consequences of this type of injury are muscle atrophy, a reduction in the cross-sectional area of muscle fibers (6) and a reduction in nicotinic acetylcholine receptors of the motor endplate (4,7) resulting from motor fiber impairment, which can lead to a functional disorder (7).

As a noninvasive treatment modality for PNI, low-level laser therapy (LLLT) has demonstrated positive results due to its photobiomodulating effects, which can either inhibit or stimulate tissue metabolism. Its mechanism of action consists of the absorption of light (photon) by photoreceptors, modulating cell reactions and the synthesis of adenosine triphosphate in the mitochondria through the acceleration of the electron transport chain (8,9). In experimental models of axonotmesis involving the crushing of nerves, Belchior *et al.* (10), Takhfooladi *et al.* (11), Barbosa *et al.* (12), Sousa *et al.* (13) and Wang *et al.* (14) found that LLLT led to improvements in function. However, these researchers only evaluated the effects of treatment over either the injured nerve or the affected muscle, and no studies have investigated the effects of combining both irradiation sites.

Therefore, this present study fills a gap in the knowledge regarding the combined effects of LLLT administered to both the injured nerve and the affected muscle, as the literature has demonstrated the positive effects of this treatment modality on each type of tissue separately.

MATERIALS AND METHODS

Setting. The present study was conducted at the research laboratory of the postgraduate courses in rehabilitation sciences and biophotonics applied to the health sciences of University Nove de Julho (UNINOVE), Vergueiro Unit, located in the city of São Paulo, Brazil, and received approval from the UNINOVE animal research ethics committee (certificate number: 2/2016).

*Corresponding author's email: raquel.mesquita@gmail.com (Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari)

© 2018 The American Society of Photobiology

ANEXO 4



6º Fórum Internacional de Biofotônica (FIB)/ - 6th Biophotonics International Forum (BIF) 2020.

47

Functional motor assessment through the sciatic functional index in Wistar rats after peripheral nerve injury treated with photobiomodulation therapy and exercise.

Soldera CB ⁽¹⁾, Andreo L ⁽¹⁾, Ribeiro BG ⁽²⁾, Horliana ACRT ⁽¹⁾, Bussadori SK ^(1,2), Deana AM ⁽¹⁾, Fernandes KPS⁽¹⁾, Mesquita-Ferrari RA ^(1,2)

(1) Universidade Nove de Julho-UNINOVE, Biophotonics Applied to Health Sciences. (2) Universidade Nove de Julho-UNINOVE, Rehabilitation Sciences.

Introduction: Studies demonstrate that photobiomodulation therapy (PBMT) has been used as a tool for modulating the peripheral nerve injury (PNI) repair process and can be associated with the exercise promoting an increase in neuromuscular transmission. Objective: The aim of the present study was to assess the effects of photobiomodulation with LED therapy (LEDT) associated with exercise on the functional motor recovering following peripheral nerve injury in Wistar rats. Methods: 45 Wistar rats were randomly divided into five 5: Control; Injury; Injury+LEDN+Exercise (LED over nerve); Injury+LEDNM+Exercise (LED over nerve and muscle); Injury+Exercise and were analyzed 7 and 14 days after injury. The LEDT was performed in the nerve region – LEDN 4 points, 20s/point, energy density of 0.8 J/cm² and in the muscle region – LEDM 8 points, 10s/point, energy density of 0.4 J/cm². The exercise started 24h after the injury, and it was performed 30 min/day, 5 days a week, without inclination. Functional gait analysis for all groups was performed using the Sciatic Functional Index (SFI). Results: After 7 days all injured groups with or without any intervention (LED or exercise) showed worse functional motor capacity (higher SFI score) in comparison to the control group. However, the Injury+LEDN+Exercise group showed a better result (lower SFI scores) when compared to the Injury+LEDNM+Exercise and Injury+Exercise groups. After 14 days, there was also a worse motor capacity in all groups of injured groups including those who performed LEDT and exercises in relation to the control group. Furthermore the Injury+LEDN+Exercise group showed the best result in comparison to the other injured groups at the same period and in comparison only to the injury group, the Injury+LEDN+Exercise group showed the best result for the motor assessment. Conclusion: Considering the results it is possible to conclude that in both experimental periods of 7 and 14 days, the Injury+LEDN+Exercise group showed a better result presenting a reduction in SFI score in comparison to the other injured groups including those who performed LEDT and exercises but still presenting a smaller motor function when compared to the control group. In view of the results, it can also be concluded that PBMT using LED can contribute to a functional improvement when applied to the nervous region associated with exercise.

Key words: Photobiomodulation, LED, Exercise, Peripheral nerve injury.

Estudo experimental em animais (Experimental study in animals)

ANEXO 5

Aprovação CEUA



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da fotobiomodulação associado ao exercício físico na funcionalidade em ratos Wistar com Lesão do Nervo Ciático por esmagamento", protocolada sob o CEUA nº 1210020919 (ID 000172), sob a responsabilidade de **Carla Bernardo Soldera** - 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 25/09/2019.

We certify that the proposal "Effects of exercise-associated photobiomodulation on functionality of Wistar rats with sciatic nerve injury by crush ", utilizing 45 Heterogenics rats (45 females), protocol number CEUA 1210020919 (ID 000172), under the responsibility of **Carla Bernardo Soldera** - 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 09/25/2019.

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

Vigência da Proposta: de [10/2019](#) a [10/2020](#)

Área: [Biotônica Aplicada Às Ciências da Saúde](#)

Origem: [Biotério - Unidade Vergueiro](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [1 a 3 meses](#)

N: [45](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [200 a 250 g](#)

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

São Paulo, 28 de outubro de 2019

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