



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CURSO DE FISIOTERAPIA

RAMON BAUER CARDOSO

**EFEITO DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO COM UMA
ENERGIA PADRONIZADA APLICADA EM DIFERENTES PERÍODOS APÓS
A LESÃO DO NERVO CIÁTICO EM CAMUNDONGOS**

Araranguá

2019

RAMON BAUER CARDOSO

**EFEITO DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO COM UMA
ENERGIA PADRONIZADA APLICADA EM DIFERENTES PERÍODOS APÓS
A LESÃO DO NERVO CIÁTICO EM CAMUNDONGOS**

Artigo apresentado ao Curso de Graduação em Fisioterapia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial da disciplina de Trabalho de conclusão de curso II.

Orientador: Prof. Dr^a. Rafael Inácio Barbosa.

Araranguá

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus familiares e namorada, por todo apoio e esforço realizado para tornar este sonho realidade.

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos primeiramente a Deus.

Sigo agradecendo imensamente meus pais Izabel Bauer e Ailton João Cardoso e meu irmão Jonatan Bauer Cardoso por todo amor, apoio e incentivo nesta caminhada acadêmica.

A minha namorada Amanda Pereira que esteve sempre do meu lado durante minha trajetória, me apoiando em muitos momentos difíceis e também servindo de inspiração para transpor as dificuldades.

Ao meu sogro Aldair Silveira que muitas vezes foi conselheiro e a minha sogra Luci Monica Ferreira Pereira que sempre incentivou a minha caminhada acadêmica.

Aos meus amigos, os quais mesmos de longe deram muita força.

A todos os professores que de alguma forma conseguiram passar seu conhecimento.

Gostaria de agradecer em especial meu orientador Professor Drº Rafael Inácio Barbosa, que compartilhou comigo seu conhecimento e seu tempo.

Resumo

Diferentes estudos avaliaram os efeitos dos agentes eletrofísicos na regeneração após lesão nervosa periférica. Dentre eles, a mais utilizada em pesquisa clínica e experimental é a terapia de fotobiomodulação (TFBM). Devido a grande variedade de parâmetros a definição de um melhor protocolo é necessária. O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito de uma energia padrão (16,8J) da TFBM, com o uso do laser de baixa intensidade (LBI), aplicada em diferentes períodos após uma lesão do nervo ciático em camundongos. Foram utilizados trinta camundongos machos (*Swiss*) divididos em: naive; sham; controle; LBI-01 (660 nm, 16,8 J de energia total emitida em 1 dia); LBI-04 (660 nm, 4,2 J por dia, 16,8 J de energia total emitida em 4 dias); LBI-28, (660 nm, 0,6 J por dia, 16,8 J de energia total emitida durante 28 dias). A lesão do nervo foi realizada com uma pinça regulável portátil. Os animais foram avaliados utilizando a hiperalgesia térmica, Índice Funcional do Ciático (IFC) e Índice estático do ciático (IEC). Os resultados obtidos foram avaliados com imagem JTM e KinoveaTM. Os dados foram obtidos na linha de base e após 7, 14, 21, e 28 dias após a cirurgia. Para o IFC e IEC, todos os grupos mostraram diferenças significativas em relação ao grupo de controle, e o grupo LBI-04 apresentou os melhores resultados dentre os que foram submetido as TFBM. Na avaliação da hiperalgesia térmica, houve diferença significativa apenas no 14º dia de avaliação no grupo LBI-04. A aplicação de 16,8 J foi eficaz na regeneração do nervo ciático, apresentando maior eficácia quando a energia foi aplicada em quatro dias (4,2 J / dia) no grupo LBI-04 e para hiperalgesia térmica, houve diferença significativa para o grupo LBI-04.

Palavras-chave: Laser de baixa intensidade. Parâmetros. Lesão por esmagamento. Regeneração nervosa. Nervo ciático.

INTRODUÇÃO

Atualmente as lesões do sistema nervoso periférico (SNP) apresentam uma incidência anual de 3% gerando um custo em torno de US\$ 150 bilhões nos Estados Unidos. Apesar das lesões do SNP não colocarem a vida do indivíduo em risco, ela afeta a sua qualidade de vida, pois o trauma resulta em deficiências motoras e sensitivas, devido ao fato que mesmo os axônios tendo capacidade de regeneração, essa se dá forma lenta e incompleta [1-3].

O modelo de lesão do nervo ciático vem sendo utilizado na pesquisa pré-clínica e se demonstra eficaz na avaliação da regeneração do SNP, com este modelo são reproduzidos diferentes tipos de lesão. Para se avaliar a regeneração do SNP, a lesão por esmagamento é a mais utilizada, pois mantém o suporte conectivo do tecido, gerando uma lesão dos axônios, permitindo a manutenção da conectividade da porção proximal e distal a lesão, a qual favorece a degeneração Walleriana [4,5].

A utilização de diferentes agentes eletrofísicos vem sendo estudada para o aprimoramento do processo regenerativo, dentre eles temos o uso do: ultrassom [6,7], estimulação elétrica [8], e o a terapia de fotobiomodulação (TFBM), com destaque para o uso do laser de baixa intensidade (LBI) [9-15]

O LBI vem sendo estudado nas lesões do SNP, pois apresenta efeitos na estimulação da microcirculação por paralisia do esfíncter pré-capilar, vasodilatação arteriolar e capilar, neoformação vascular, os quais favorecem o aumento do fluxo sanguíneo na área irradiada [11]. O LBI também é capaz de aumentar o metabolismo e proliferação celular, por meio de reversão da inibição mitocondrial, ocorrendo à estimulação da produção de adenosina trifosfato (ATP), desencadeada pela absorção dos fótons pelo citocromo-c oxidase na cadeia respiratória mitocondrial [16-19].

Adicionalmente apresenta propriedades analgésicas, que ocorrem através da modulação de mediadores químicos anti-inflamatórios e síntese de β -endorfina, o que tende para limitar a excitabilidade dos receptores nociceptivos e eliminar as substâncias halogênicas [20-22] assim os efeitos

advindos do LBI contribuem para a aceleração do processo de regeneração do SNP.

Apesar de diferentes estudos demonstrarem a eficácia do LBI na regeneração nervosa ainda há uma grande janela terapêutica, sendo utilizados diversos modelos que podem variar de acordo com o comprimento de onda, potência, energia total emitida, densidade, duração, aplicação pulsada ou contínua, diferentes pontos de aplicação, tipo de lesão e avaliação [23,24].

Deste modo, o objetivo deste estudo foi verificar a influência da mesma energia aplicada em diferentes períodos na regeneração do nervo ciático após um modelo de esmagamento do nervo.

MÉTODOS

Trinta camundongos adultos machos da linhagem *Swiss*, pesando 30-40 g foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Brasil. Todos os procedimentos utilizados foram realizados de acordo com os “Princípios de cuidados com animais de laboratório [25], e foi aprovado pelo Comité de Ética Animal da UFSC (CEUA-UFSC, número de protocolo PP00956).

Os camundongos foram mantidos em gaiolas, em grupos de dez a doze animais, em temperatura ambiente controlada (22 ± 2 ° C), com ciclo de luz dividido em 12 horas claro, 12 horas escuro, tendo acesso livre a água e comida. Os animais foram pesados e divididos em seis grupos de forma aleatória de acordo com os procedimentos a serem realizados a seguir:

1. Grupo naive (n = 3): não submetidos ao procedimento cirúrgico;
2. Grupo Sham (n = 3): submetidos ao procedimento cirúrgico sem esmagamento do nervo ciático e simulação de irradiação com LBI;
3. Grupo controle (n = 6): submetido ao procedimento cirúrgico associado ao esmagamento do nervo ciático e não irradiado com LBI;
4. Grupo LBI-01 (n = 6): lesão do nervo ciático e irradiação com LBI, energia total 16,8 J emitida durante 1 dia;

5. Grupo LBI-04 (n = 6): lesão do nervo ciático e irradiação com LBI energia total 16,8 J emitida durante 4 dias;
6. Grupo LBI-28 (n = 6): lesão do nervo ciático e irradiação com LBI energia total 16,8 J emitida durante 28 dias;

A seguir na figura 1 temos um fluxograma que demonstra um resumo dos procedimentos realizados neste trabalho.

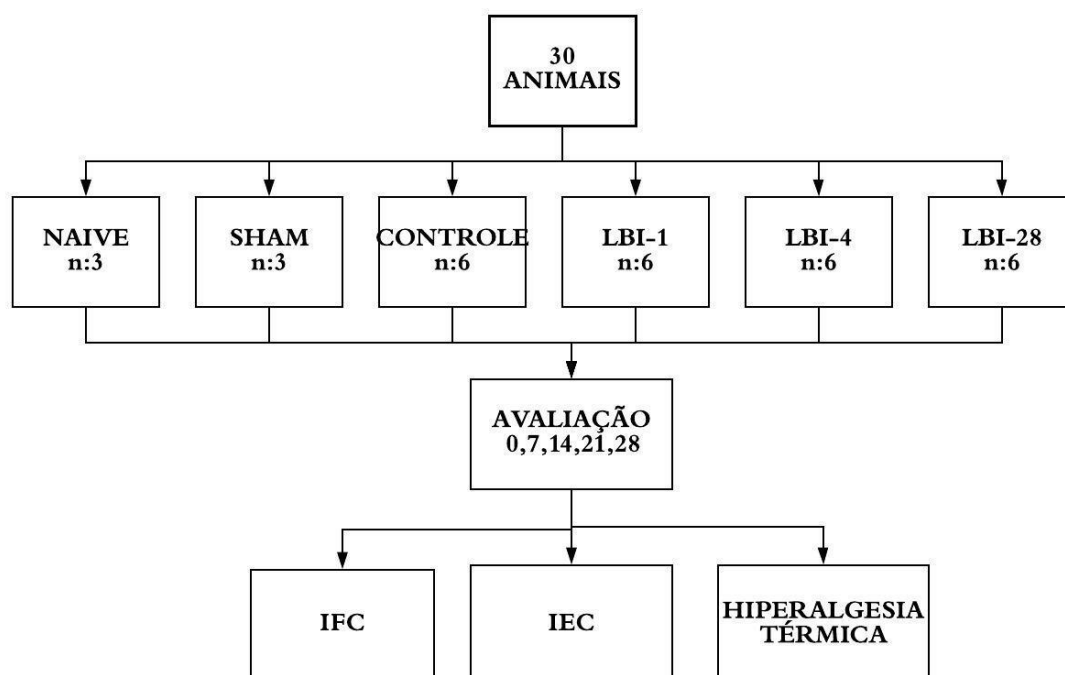


Figura 1. Fluxograma dos procedimentos realizados.

Procedimento de Lesão do Nervo Ciático

Os animais foram anestesiados com uma mistura de 10% de cetamina (Syntec do Brasil Ltda, Rhobifarma TM, Hortolândia, São Paulo, Brasil - 0,1 ml / 100 g de peso corporal) e 2% xilazina (Syntec do Brasil Ltda, Rhobifarma TM, Hortolândia, São Paulo, Brasil - 0,07 ml / 100 g de peso corporal) administrado intraperitonealmente. Para cálculo anestésico os animais foram pesados antes da aplicação.

Em seguida realizou-se a tricotomia (razon descartável, KolplastLtd TM, Itupeva, São Paulo, Brasil) da perna traseira direita de cada animal e a incisão (número bisturi 15, Embramed Indústria e Comércio de Produtos Hospitalares

TM, São Paulo - SP) na face lateral do membro. Para realização da axoniotimese foi utilizado um dispositivo de esmagamento calibrado com peso de 5000g e área de 0,5 cm², o qual torna o processo de esmagamento prático e confiável [26]. O ponto de esmagamento foi definido 5 mm acima dos três ramos principais (sural, fíbular e tibial) e o dispositivo mantido por 10 minutos no ponto de esmagamento. Ao final o nervo foi realocado em seu leito original e foi realizada sutura de músculos e pele (Tecnew TM, Quintino, Rio de Janeiro, Brasil) (Fig. 2).

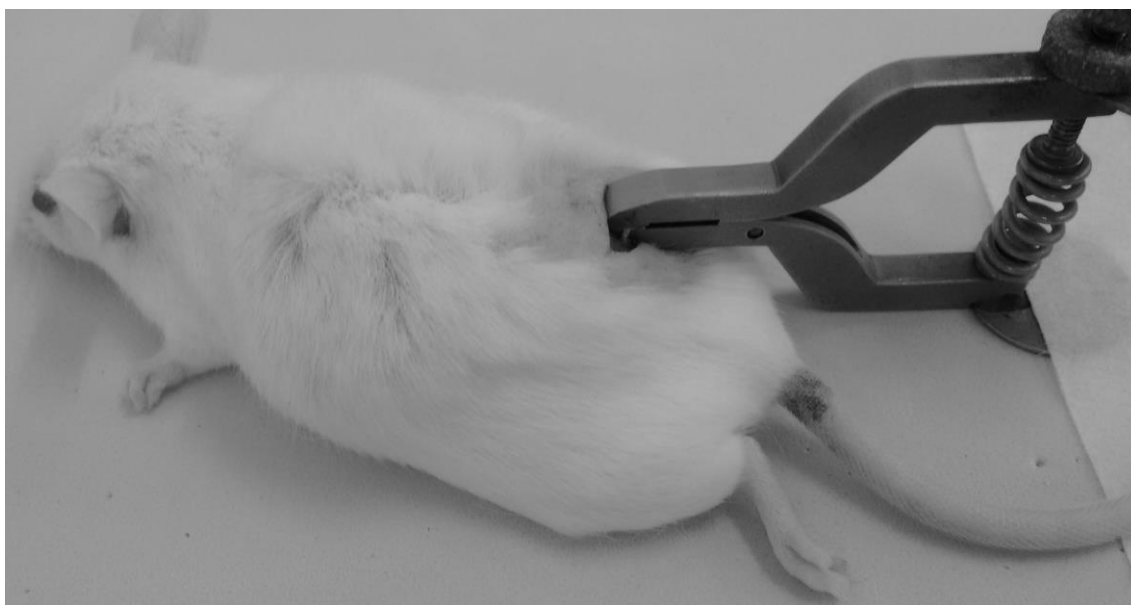


Figura 2. Procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo ciático e pinça de esmagamento fabricado na oficina de precisão da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Terapia de Fotobiomodulação

A TFBM foi realizada por meio do LBI aplicado em um ponto pré-determinado. Os animais foram fisicamente contidos de forma manual e o LBI foi posicionado a um ângulo de 90° com o tecido cutâneo usando a técnica pontual com contato [27].

Foi utilizado diodo de Arseneto de Gálio-Alumínio-Índio-Fósforo (AsGaAlInP) da marca (Ibramed Equipamentos MédicosTM, Laserpulse, Amparo, São Paulo, Brasil), os parâmetros utilizados do LBI e dose estão representados na tabela 1:

Tabela 1:–Parâmetros da TFBM utilizados no estudo.

Parâmetros	LBI-1	LBI-4	LBI-28
Comprimento de Onda	660 nm	660 nm	660 nm
Potência	30 mW	30 mW	30 mW
Área do Feixe	0,06 cm ²	0,06 cm ²	0,06 cm ²
Feixe	Contínuo	Contínuo	Contínuo
Dias de aplicação	1	4	28
Energia total emitida por dia	16,8 J	4,2J	0,6J
Energia total emitida	16,8 J	16,8 J	16,8 J

AVALIAÇÃO

Índice Funcional Ciático (IFC) e Índice Estático Ciático (IEC)

A avaliação funcional da marcha proporciona a oportunidade para avaliar os aspectos específicos da regeneração do nervo ciático de uma forma não invasiva [29-32]. Os resultados variam de 0 a -100, que é um indicador da função nervosa, em que 100 representa a disfunção nervosa completa e 0 representa a ausência de disfunção, onde os resultados são confiáveis quando comparados as análises histológicas do nervo.

O IFC consiste na obtenção de uma imagem da pegada do animal, capturada por uma câmera, onde para a obtenção da pegada foi utilizado uma passarela de acrílico onde o animal percorre de um lado ao outro. Os parâmetros analisados foram o comprimento da pegada, abertura total dos dedos e abertura dos dedos intermediários [32, 33].

O IEC foi utilizado para realizar a avaliação funcional estática. Estudos demonstram a eficácia do IEC na avaliação da regeneração nervosa em

roedores, pois, segundo os autores a avaliação estática reduz os desvios ocasionados pela velocidade do animal no IFC [34]. Os resultados no estudo de Smitet al, [30] também sugerem mais precisão dos dados obtidos no IEC do que no IFC.

Para aquisição das pegadas foi utilizada uma câmera de 13 megapixels (Sony TM, Minato, Tóquio, Japão), fixada sob uma passarela de acrílico transparente de 43 cm de comprimento, 5,5 cm de altura e 8,7 cm de largura, com uma caixa de madeira no final. Os vídeos foram digitalizados pelo programa Kinovea TM Footprint Imagem (IFC). As imagens foram analisadas usando o programa Image J. TM para transformar os pixels em milímetros e calcular os parâmetros pré-determinados para a avaliação da IFC e IEC. As pegadas foram obtidas no pré-operatório e aos 7, 14, 21, e 28 dias a partir da lesão inicial [31].

Hiperalgisia Térmica

Para avaliar a hiperalgisia térmica foi utilizado o aparelho Hargreaves® (Ugobasile, Comerio, Itália). Este emite uma luz infravermelha, que foi irradiada diretamente sobre a região plantar da pata traseira direita do animal. Os animais foram alojados na sala de ensaio uma hora antes do teste. A latência de retirada da pata após a aplicação do estímulo térmico foi medido automaticamente por meio de um sensor, o tempo de 20 segundo foi determinado cut-off, a fim de evitar possível dano de tecidos na pata dos animais [27,28].

Três medições do tempo de resposta foram realizadas, sendo registrados em intervalos de 20 minutos a fim de determinar o limiar da linha de base, todos os grupos foram avaliados antes do procedimento cirúrgico. A avaliação da hiperalgisia térmica foi realizada nos dias 0, 14, 21, e 28 pós-cirurgia.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e foi analisada pelo teste de ANOVA two-way, seguido do pós-teste de Tukey. Os valores de $p < 0,05$

foram considerados para mostrar diferenças significativas entre as médias. Utilizou-se o software GraphPadPrism® 8.0 (San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

Os resultados são mostrados nas figuras 3 a 6. Primeiramente é importante ressaltar que os animais não apresentaram complicações pós-operatórias, como autotomia e deiscência e o sucesso do modelo de cirurgia foi evidente devido à evolução dos grupos operados no 7º dia, apresentando diferença quando comparado à linha de base na avaliação intragrupo e no mesmo período de avaliação intergrupos tanto para IEC e IFC.

Na Figura 3 demonstramos os resultados referentes ao IEC e IFC. Em todas análises realizadas podemos observar que os grupos submetidos à lesão do nervo ciático demonstraram diferença significativa entre a linha base e o dia 7, o qual caracteriza a eficácia do procedimento de esmagamento do nervo. Podemos também observar que nas análises intragrupo os grupos LBI-01, LBI-04, LBI-28 obtiveram diferença significativa entre os dias 7 e 28. Em relação ao IEC os grupos LBI-04 e LBI-28 mostraram melhora significativa a partir do dia 14 e também para o IFC o grupo LBI-28 apresentou melhora significativa a partir do dia 14. Quando comparamos os resultados a linha de base, podemos observar que no dia 21 os grupos LBI-04 e LBI-28 não apresentavam diferença significativa.

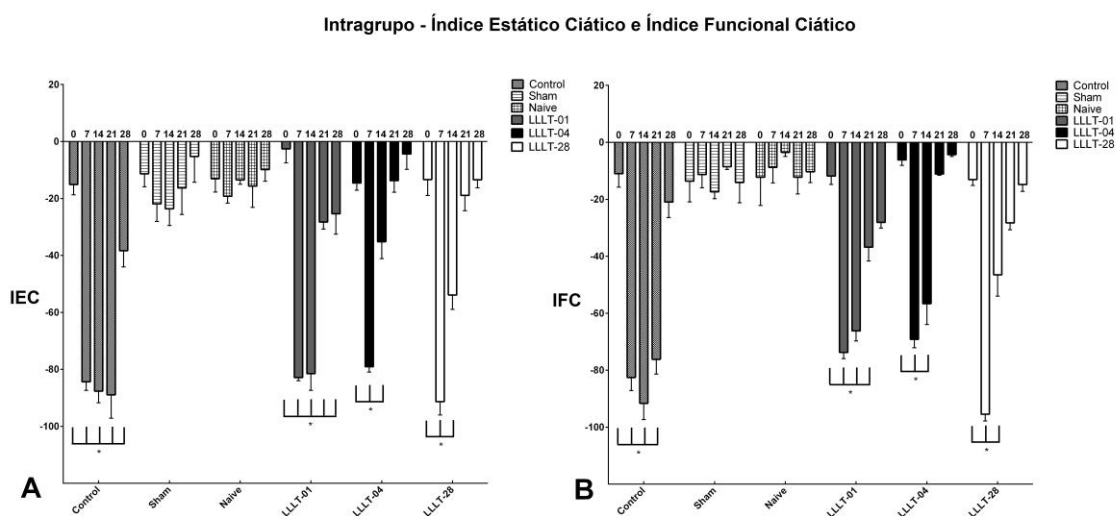


Figura 3 A) Os resultados da análise intragrupo do Índice ciático estática (IEC). B) Índice Funcional do Ciático (IFC). * Representa diferença estatística quando comparado com a linha de base ($p < 0,05$)

Na Figura 4 temos a comparação intergrupo do IEC. Podemos observar que o grupo LBI-01 demonstrou potencial regenerativo a partir do dia 21, porém quando comparado aos outros grupos o resultado demonstra-se insatisfatório. Já os grupos LBI-04 e LBI-28 os efeitos surgiram a partir do dia 14, com pico de regeneração no dia 21 demonstrando efeito positivo, porém o grupo LBI-04 foi o grupo que demonstrou recuperação inicial mais evidente, com redução significativa desde o dia 7 e no dia 14 mostrou resultados mais próximos a zero quando comparado aos outros grupos, indicando a regeneração do nervo pelo IEC.

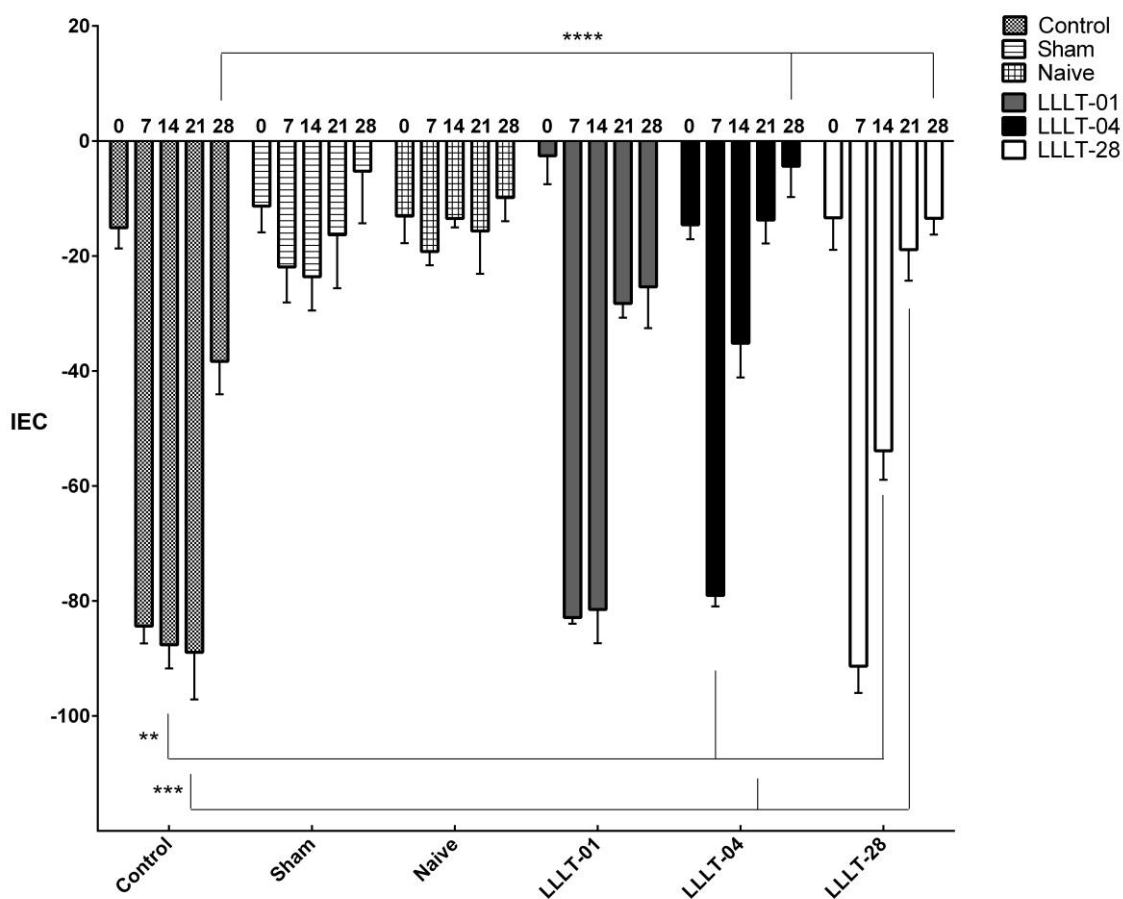


Figura 4: Os resultados obtidos a partir de avaliação intergrupos de índice estático ciático (IEC). ** representa a diferença no dia 14; *** representa a diferença no dia 21 e **** representa a diferença no dia 28, ($p < 0,05$)

Na Figura 5 podemos observar os valores obtidos no IFC, os grupos LBI-04 e LBI-28 apresentaram uma melhora significativa a partir do dia 14, apresentando melhor resultado funcional quando comparado com outros grupos. Porém apenas o grupo LBI-04 apresentou um resultado significativo no dia 28 quando comparado ao grupo controle.

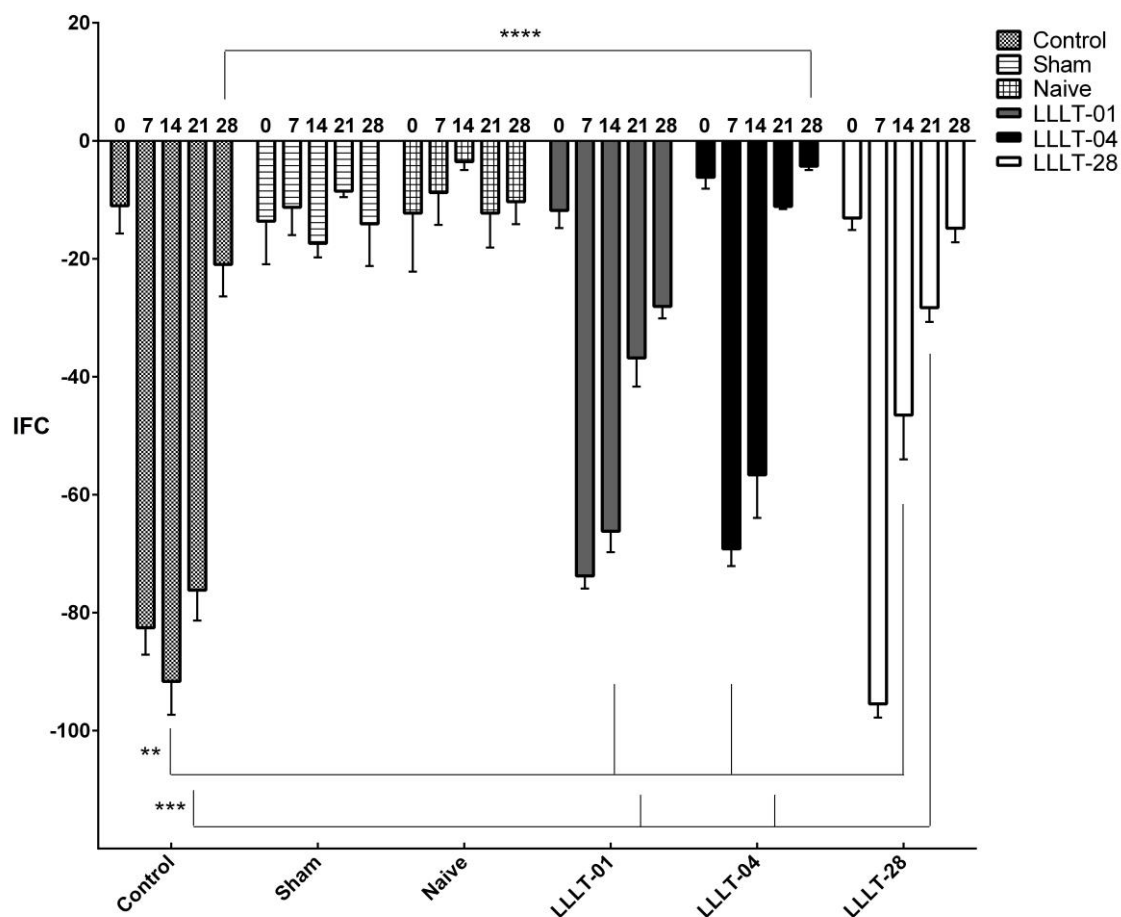


Figura 5: Os resultados obtidos a partir de avaliação intergrupos do Índice Funcional do Ciático (IFC). ** Representa a diferença no dia 14; *** Representa a diferença no dia 21 e **** Representa a diferença no dia 28, ($p < 0,05$).

Avaliação através da hiperalgesia térmica ao calor (Figura 6) mostraram diferenças significativas apenas no grupo LBI-04 no 14º dia da avaliação.

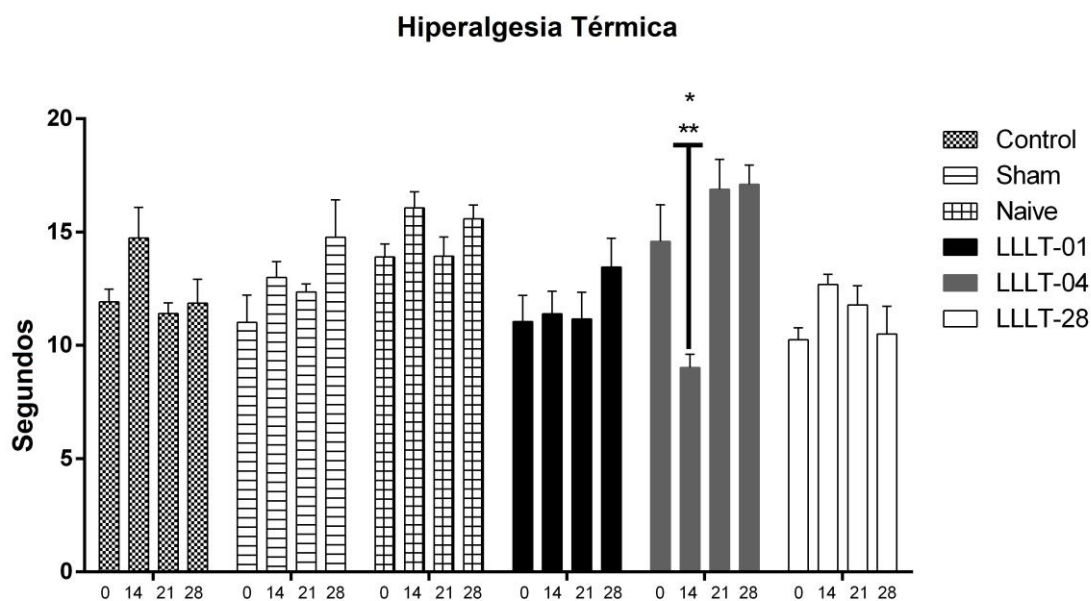


Figura 6: Hiperalgisia térmica através do aparelho de Hargreaves (em segundos). *Representa diferença intergrupos e ** representa diferença no dia 14, ($p < 0,05$)

DISCUSSÃO

A lesão nervosa periférica pode ser classificada em três tipos: neuropraxia, axoniotmese e neurotmeze. O modelo de lesão por esmagamento ocasiona uma axoniotmese [35] preservando a estrutura de sustentação neural (endoneuro, prineuro, células de Schwann), ocorrendo à degeneração do axônio distal a lesão, denominada degeneração Walleriana [36]. Pode-se observar que no pós-operatório os animais apresentaram dificuldade para deambular, principalmente nos sete primeiros dias, onde mantiveram a pata em padrão flexor, adução dos dedos, incapacidade de transferir carga de uma pata para outra, com padrão compatível com a disfunção do nervo ciático [33]. Estudos mostram que o IFC tem uma correlação clara com a avaliação morfológica e morfométrica do nervo e é um método quantitativo, confiável e reproduzível para avaliar o processo de regeneração nervosa periférica, fornecendo um valor numérico à função e permitindo a análise estatística dos resultados [37-40].

Em estudos de recuperação funcional dos nervos periféricos são utilizados diferentes parâmetros da TFBM, onde podemos ter variação de densidade de energia, potência, comprimento de onda e modo de pulso, sendo possível diversas combinações distintas, porém os estudos vêm tentando definir uma janela terapêutica e protocolos mais eficazes [20,41].

Barbosa et, al. [42] utilizaram o LBI 660 nm ($10\text{J}/\text{cm}^2$, 30 mW e $0,06\text{ cm}^2$), os resultados sugerem que o grupo o LBI no 14º dia apresentou melhora na recuperação funcional quando comparado ao grupo controle. No presente estudo, os achados demonstraram que os melhores resultados foram obtidos no grupo cuja aplicação foi realizada em quatro dias, sugerindo que o aumento da energia aplicada na fase inicial da lesão pode indicar uma nova perspectiva de tratamento. Barbosa et. al. [26] em outro estudo, também comparou o efeito de diferentes comprimentos de onda (660 nm e 830 nm) , e também encontrou resultados que demonstram que o LBI 660 nm apresenta efeitos significativos a partir do 14º dia, corroborando com nossos achados.

Além disso, De Almeida et al. [43] realizaram a avaliação de alterações bioquímicas induzidas pelo LBI após axoniotimose, neste estudo foi utilizado LBI 660 nm e 808nm durante 21 dias, fornecendo uma energia total de 12 J/dia, pode-se observar que no grupo LBI houve aumento de lipídios (esfingofosfolipídios) e proteínas (colágeno), que são constituintes da bainha de mielina, e também que o LBI 660 nm mostrou-se mais eficaz que o LBI 880 nm em relação a proliferação celular e reparo do SNP. Em nosso estudo podemos observar que os grupos LBI-04 e LBI-28 não apresentaram diferenças, quando comparado com a linha de base, a partir do dia 21 de tratamento, e que o LBI-14 demonstrou resultados mais próximos de zero quando comparado aos outros grupos, sugerindo que em 21 dias o protocolo foi eficaz no tratamento da lesão nervosa, em ambos os grupos e que no grupo LBI-4 temos um efeito mais rápido quando comparado aos outros grupos .

A avaliação através da hiperalgesia térmica ao calor com Hargreaves mostrou diferença apenas para o grupo LBIT-04 no 14º dia. Os resultados mostraram que os grupos submetidos à intervenção apresentaram melhora na regeneração nervosa, principalmente quando a irradiação LBI ocorreu em

quatro dias. Porém resultados de Mashhoudi [44] demonstrou que a utilização do LBI 780 nm pode acelerar a processo de regeneração.

Nas pesquisas que relacionaram o uso de TFBM e a lesão do nervo, há uma grande janela terapêutica dos parâmetros utilizados. Assim, novos estudos são necessários para verificar o uso de TFBM em uma reabilitação precoce. A aplicação de uma alta energia (J) nos primeiros dias após a lesão traumática parece ser uma nova perspectiva para o tratamento. Adicionalmente, novos estudos pré-clínicos e clínicos são necessários para verificar a restauração funcional, melhorando o processo de recuperação funcional/sensorial, além da velocidade na regeneração axonal.

CONCLUSÃO

A TFBM foi eficaz na regeneração nervosa e na reabilitação funcional precoce de nervo ciático de camundongos. A aplicação de 16,8 J de LBI foi eficaz na regeneração dos nervos de acordo com os resultados e foram mais eficazes quando a energia foi aplicada durante quatro dias (4,2 J / dia).

Referências

1. Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. (2003). The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. The American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation. DOI: <https://doi:10.1097/PHM.0b013e31815e6370>
2. Simon NG, Spinner RJ, Kline DG, Kliot M. (2016). Advances in the neurological and neurosurgical management of peripheral nerve trauma. J NeurolNeurosurg Psychiatry. DOI:<http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2014-310175>
3. Stratton JA, Kumar R, Sinha S, Shah P, Stykel M, Shapira Y, Midha R, Biernaskie J. (2017). Purification and characterization of Schwann cells from adult human skin and nerve. Eneuro. DOI:<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0307-16.2017>

4. Geuna S. (2015). The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *Journal of Neuroscience Methods*. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.01.021
5. Grinsell D, Keating C. (2014). Peripheral nerve reconstruction after injury: A review of clinical and experimental therapies. *BioMed Research International*. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/698256>.
6. Xia B, Chen G, Zou Y, Yang L, Pan J, Lv Y. (2019) Low-intensity pulsed ultrasound combination within duced pluripotent cells-derived neural crests tem cell sandgrowth differentiation factor 5 promotes sciatic nerve regeneration and functional recovery. *J Tissue EngRegen* DOI: <https://doi.org/10.1002/term.2823>
7. Xue-JunNi, Xiao-Dong Wang, Ya-Hong Zhao, Hua-Lin Sun, Yu-Ming Hu, Jian Yao, Yi Wang. (2016). The Effect of Low-Intensity Ultrasound on Brain-Derived Neurotropic Factor Expression in a Rat Sciatic Nerve Crushed Injury Model, *Ultrasound in Medicine &Biology*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2016.09.017>
8. Willand, M. P., Nguyen, M.-A., Borschel, G. H., & Gordon, T. (2016) Electrical Stimulation to Promote Peripheral Nerve Regeneration. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, DOI: <https://doi.org/10.1177/1545968315604399>
9. De Souza LG, Marcolino AM, Kuriki HU, Gonçalves ECD, Fonseca MCR, and Barbosa RI. (2018). Comparative effect of photobiomodulation associated with dexamethasone after sciatic nerve injury model. *Lasers In Medical Science*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-018-2494-9>.
10. Barbosa RI, Marcolino AM, Guirro RRJ, Mazzer N, Barbieri CH, Fonseca MCR. (2010) Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers MedSci*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-009-0750-8>
11. Barbosa RI, Marcolino AM, Guirro RRJ, Mazzer N, Barbieri CH, Fonseca MCR. (2010). Efeito do laser de baixa intensidade (660 nm) na regeneração do

- nervo isquiático lesado em ratos. *Fisioter. Pesqui.* [online]. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1809-29502010000400002>.
12. Ziago EK, Fazan VP, Iyomasa MM, Sousa LG, Yamauchi PY, da Silva EA, Borie E, Fuentes R, Dias FJ. (2017). Analysis of the variation in low-level laser energy density on the crushed sciatic nerves of rats: a morphological, quantitative, and morphometric study. *Lasers MedSci.* DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2126-1>
 13. Buchaim DV, Rodrigues Ade C, Buchaim RL, Barraviera B, Junior RS, Junior GM, Bueno CR, Roque DD, Dias DV, Dare LR, Andreo JC. (2016). The new heterologous fibrin sealant in combination with low-level laser therapy (LLLT) in the repair of the buccal branch of the facial nerve. *Lasers MedSci.* DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-016-1939-2>
 14. Fallah A, Mirzaei A, Gutknecht N. (2017). Clinical effectiveness of low-level laser treatment on peripheral somatosensory neuropathy. *Lasers MedSci.* DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2137-y>
 15. MashhoudiBarez M, Tajziehchi M, Heidari MH, Bushehri A, Moayer F, Mansouri N, SafaviNaini N, Movafagh A. (2017). Stimulation Effect of Low Level Laser Therapy on Sciatic Nerve Regeneration in Rat. *J Lasers MedSci.* DOI: [doi:10.15171/jlms.2017.s7](https://doi.org/10.15171/jlms.2017.s7)
 16. Albuquerque-Pontes GM, Vieira RP, Tomazoni SS, Caires CO, Nemeth V, Vanin AA, Santos LA, Pinto HD, Marcos RL, Bjordal JM, de Carvalho Pde T, Leal-Junior EC. (2015). Effect of pre-irradiation with different doses, wavelengths, and application intervals of low-level laser therapy on cytochrome c oxidase activity in intact skeletal muscle of rats. *Lasers MedSci*; DOI: [10.1007/s10103-014-1616-2](https://doi.org/10.1007/s10103-014-1616-2)
 17. Gupta A, Keshri GK, Yadav A, Gola S, Chauhan S, Salhan AK, Bala Singh S. Superpulsed. (2014). (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT)

- attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. *J Biophotonics*; DOI: 10.1002/jbio.201400058
18. Karu T, Pyatibrat L V, Afanasyeva N. (2004). A Novel Mitochondria¹ Signaling Pathway Activated by Visible-to-near Infrared Radiation. *Photochem Photobiol*. DOI: 10.1562/2004-03-25-RA-123
19. Karu T. (2010). Critical Review Multiple Roles of Cytochrome c Oxidase in Mammalian Cells Under Action of Red and IR-A Radiation. *IUBMB Life*. DOI: 10.1002/iub.359
20. De Andrade ALM, Bossini PS, do Canto de Souza ALM, Sanchez AD, Parizotto NA. (2017). Effect of photobiomodulation therapy (808 nm) in the control of neuropathic pain in mice. *Lasers MedSci*. DOI:<https://doi.org/10.1007/s10103-017-2186-x>
21. Rocha IR, Ciena AP, Rosa AS, Martins DO, Chacur M. (2017). Photobiostimulation reverses allodynia and peripheral nerve damage in streptozotocin-induced type 1 diabetes. *Lasers MedSci*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2140-3>.
22. Lee JH, Chiang MH, Chen PH, Ho ML, Lee HE, Wang YH. (2017). Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy on human periodontal ligament cells: in vitro study. *Lasers MedSci*; DOI: 10.1007/s10103-017-2376-6
23. Andreo L, Soldera CB, Ribeiro BG, de Matos PRV, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA. (2017). Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury *Lasers Med Sci*. DOI: 10.1007/s10103-017-2359-7
24. Al-Shammari, A. M., Syhood, Y., & Al-Khafaji, A. S. (2019). Use of low-power He-Ne laser therapy to accelerate regeneration processes of injured sciatic nerve in rabbit. *The Egyptian Journal of Neurology*, DOI:10.1186/s41983-018-0047-6

25. Axel V, Wolff DVM; Smith PD. (1994). Office of Laboratory Animal Welfare: Compliance at the Institutional and Programmatic Level. 1994. Available in: <<https://grants.nih.gov/grants/olaw/references/laba94.htm>>.
26. Barbosa RI, Marcolino AM, Guirro RRJ, Mazzer N, Barbieri CH, Fonseca MCR. (2010). Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers MedSci*. DOI:<https://doi.org/10.1007/s10103-009-0750-8>
27. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. DOI:[http://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90026-7](http://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90026-7)
28. FERNANDES, E. S., et al. (2016). Environmental cold exposure increases blood flow and affects pain sensitivity in the knee joints of CFA-induced arthritic mice in a TRPA1-dependent manner. *Arthritis Res Ther*. DOI: 10.1186/s13075-015-0905-x
29. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. (1982). An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(82\)90234-5](https://doi.org/10.1016/0014-4886(82)90234-5)
30. Smit X, Van Neck JW, Ebeli MJ, Hovius SE. (2004). Static footprint analysis: a time-saving functional evaluation of nerve repair in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. DOI:<https://doi.org/10.1080/02844310410034277>
31. Bervar M. (2000). Video analysis of standing: an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neurosci Methods*. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00281-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00281-8)
32. Monte-Raso VV, Moro CA, Mazzer N, Fonseca MCR, Fazan VPS, Barbieri G, Barbieri CH. (2009). A new adjustable pinch designed for producing crush nerve

injuries in the sciatic nerve of rats. ActaOrtop Bras.
DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-78522009000400009>

33. BAPTISTA, A. F. et al. (2006). A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse-Adaptation of the sciatic static index, *Journal of Neuroscience Methods*, 2007, 259-264, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.11.016>
34. Takhtfooladi M, Jahanbakhsh F, Takhtfooladi H, Yousefi K, Allahverdi A. (2015). Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm²) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers MedSci*. DOI:<https://doi.org/10.1007/s10103-015-1709-6>
35. Seddon HJ. (1947). The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. *Brit J Surg*.
36. Wong KM, Babetto E, Beirowski B. (2017). Axon degeneration: make the Schwann cell great again. *Neural Regen Res*. DOI: 10.4103/1673-5374.205000
37. Marques CO. (2017). Efeitos da vibração de corpo inteiro sobre a morfofuncionalidade do nervo isquiático em um modelo experimental de lesão por esmagamento. DOI:<http://hdl.handle.net/10183/180196>
38. Wang T, Ito A, Aoyama T, Nakahara R, Nakahata A, Ji X, et al. (2018). Functional evaluation outcomes correlate with histomorphometric changes in the rat sciatic nerve crush injury model: A comparison between sciatic functional index and kinematic analysis. *PLoS ONE*. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208985>
39. Hou-ChuanLai, Chueng-He Lu, Chih-Shung Wong, Bo-FengLin, Shun-Ming Chan, Chan-Yang Kuo, Zhi-Fu Wu, (2018). Baicalein attenuates neuropathic pain and improves sciatic nerve function recovery in rats with partial sciatic nerve transection, *Journal of the Chinese Medical Association*, DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jcma.2018.03.014>.

40. Stefano G, (2015). The sciatic nerve injury model in pre-clinical research, *Journal of Neuroscience Methods*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.01.021>
41. Andreo, L., Soldera, C. A., Guimarães Ribeiro, B., de Matos, P. R. V., Sousa, P. B., de Alcântara Araújo Amorim, W. W., Mesquita-Ferrari, R. A. (2018). Effects of Photobiomodulation on Functionality in Wistar Rats with Sciatic Nerve Injury. *Photochemistry and Photobiology*. DOI:10.1111/php.13048 0.1007/s12593-013-0096-0
42. BARBOSA, Rafael Inácio et al. (2010). Efeito do laser de baixa intensidade (660 nm) na regeneração do nervo isquiático lesado em ratos. *Fisioter. Pesqui.* [online]. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S1809-29502010000400002>
43. De Almeida Melo Maciel Mangueira, M., Maciel Mangueira, N., Pereira Gama Filho, O, Moysés de Oliveira, M., Albuquerque Heluy, R., Silveira, L., & Caparelli Moniz de Aragão Dáquer, E. (2018). Biochemical changes in injured sciatic nerve of rats after low-level laser therapy (660 nm and 808 nm) evaluated by Raman spectroscopy. *Lasers in Medical Science*. DOI:10.1007/s10103-018-2627-1
44. Mashhoudi Barez M, Tajziehchi M, Heidari MH, et al. (2017). Stimulation Effect of Low Level Laser Therapy on Sciatic Nerve Regeneration in Rat. *J Lasers Med Sci*. DOI: 10.15171/jlms.2017.s7