



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS, TECNOLOGIA E SAÚDE DO CAMPUS
ARARANGUÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

LUANA GABRIEL DE SOUZA

**ANÁLISE COMPARATIVA DO EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO
ASSOCIADA À SINVASTATINA APÓS LESÃO POR ESMAGAMENTO
DO NERVO CIÁTICO EM CAMUNDONGOS**

ARARANGUÁ

2019

Luana Gabriel de Souza

**ANÁLISE COMPARATIVA DO EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA
À SINVASTATINA APÓS LESÃO POR ESMAGAMENTO DO NERVO CIÁTICO
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Inácio Barbosa

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Márcio Marcolino

Araranguá

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Souza, Luana Gabriel de
Análise comparativa do efeito da fotobiomodulação
associada à sinvastatina após lesão por esmagamento do nervo
ciático em camundongos / Luana Gabriel de Souza ;
orientadora, Rafael Inácio Barbosa, coorientador,
Alexandre Márcio Marcolino, 2019.
55 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Campus Araranguá, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Reabilitação, Araranguá, 2019.

Inclui referências.

1. Ciências da Reabilitação. 2. Laser de Baixa
Intensidade. 3. Sinvastatina. 4. Lesão por esmagamento. 5.
Nervo periférico. I. Barbosa, Rafael Inácio. II.
Marcolino, Alexandre Márcio. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Reabilitação. IV. Título.

Luana Gabriel de Souza

**Análise Comparativa do Efeito da Fotobiomodulação associada à Sinvastatina após
Lesão por Esmagamento do Nervo Ciático em Camundongos**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alessandro Haupenthal, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Laís Mara Siqueira das Neves, Dra.
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo

Prof.(a) Elaine Caldeira de Oliveira Guirro, Dra.
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências da Reabilitação.

Prof. Dra Janeisa Franck Virtuoso
Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr. Rafael Inácio Barbosa
Orientador(a)

Araranguá, 02 de Julho de 2019.

Dedico aos meus pais pela compreensão e incentivo. Ao meu amado noivo pela paciência sem medidas. E a Deus, pela força sem tamanhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, pelo auxílio em todas as situações e por possibilitar a realização de um sonho.

A meus pais, Edgar e Luciane, meu infinito agradecimento por acreditarem em mim e me incentivarem a ir mais longe. Obrigada pelo amor e atenção incondicional.

Ao meu irmão, João Pedro, por me proporcionar momentos de alegria em meio à aflição e desespero.

Ao meu querido noivo, João Vitor, pelo companheirismo, paciência, compreensão, apoio e amor.

A meu orientador, Prof. Dr. Rafael Inácio Barbosa, por toda paciência e compreensão, por seu vasto conhecimento e dedicação em ensinar com tanto zelo. Muito obrigada, com certeza a realização deste sonho não seria possível sem você. Também agradeço a meu coorientador Prof. Dr. Alexandre Márcio Marcolino pela amizade e encorajamento.

Agradeço a minha única e querida colega de Mestrado e amiga de vida, Ketlyn Germann Hendler, pela amizade, palavras de conforto e encorajamento em momentos difíceis.

E por fim, agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Federal de Santa Catarina pela dedicação e compromisso com o ensino.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. (Arthur Schopenhauer, 1818).

RESUMO

As lesões nervosas periféricas (LNP) levam ao comprometimento motor e sensorial do segmento, levando a consequências diretas sobre as atividades de vida diária do indivíduo. Estudos verificaram os efeitos da fotobiomodulação e dos agentes farmacológicos sobre a LNP, contudo, suas ações conjuntas objetivando a potencialização dos seus efeitos ainda não foram estudadas. O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos da Fotobiomodulação através do Laser de Baixa Intensidade (*low level laser therapy* – LLLT) associado ou não ao uso da sinvastatina na recuperação funcional do nervo ciático em camundongos submetidos à lesão por esmagamento. Foram utilizados 50 camundongos da linhagem Swiss, divididos aleatoriamente em 6 grupos: Naive; Sham; Controle; LLLT (660 nm, 10 J/cm²; 30mW; 0,6 J por dia ; 0.06 cm²; 16.8 J total e 20 s); Sinvastatina (20 mg/kg); LLLT/Sinv (associação dos dois protocolos). Foram utilizados como análises o Índice Funcional do Ciático (IFC), Índice Estático do Ciático (IEC), avaliação da hiperalgesia térmica ao calor, hiperalgesia mecânica e avaliação termográfica. As avaliações foram realizadas no pré-operatório e após 7, 14, 21 e 28 dias da lesão inicial. Todos os grupos, com exceção do sham e do naive, apresentaram os índices compatíveis com lesão nervosa periférica grave no 7º dia de avaliação. O grupo tratado com sinvastatina isoladamente apresentou diferença quando comparado ao grupo controle a partir do 14º dia para o IEC. O grupo LLLT apresentou melhores resultados na análise do IEC e IFC ($p < 0.05$) a partir do 21º dia de pós-operatório, este dado se manteve quando comparado ao grupo sinvastatina e ao grupo LLLT/Sinv. Os resultados das análises, hiperalgesia térmica, hiperalgesia mecânica e termográfica não foram significativos. A partir dos resultados obtidos com as análises, verifica-se que a fotobiomodulação foi mais efetivas que a ação isolada e conjunta com a sinvastatina para lesões do nervo ciático em camundongos.

Palavras-chave: Laser de Baixa Intensidade. Sinvastatina. Lesão por Esmagamento. Nervo Periférico. Regeneração. Agentes Eletrofísicos.

ABSTRACT

Peripheral nerve lesions (PNL) lead to motor and sensory impairment of the segment, leading to direct consequences on the activities of daily living of the individual. Studies have verified the effects of photobiomodulation and pharmacological agents on PNL; however, their joint actions aimed at enhancing its effects have not yet been studied. The objective of this study was to verify the effects of photobiomodulation using low level laser therapy (LLLT) associated or not with the use of simvastatin in the functional recovery of the sciatic nerve in mice submitted to crushing injury. Fifty Swiss mice were used, randomly divided into 6 groups: Naive; Sham; Control; LLLT (660 nm, 10 J/cm²; 30mW; 0.6 J per day; 0.06 cm²; 16.8 J total and 20 s); Simvastatin (20 mg/kg); LLLT/Sinv (association of the two protocols). The Sciatic Functional Index (SFI), Sciatic Static Index (SSI), evaluation of thermal hyperalgesia to heat, mechanical hyperalgesia and thermographic evaluation were used as analyses. The evaluations were performed preoperatively and 7, 14, 21 and 28 days after the initial lesion. All groups, with the exception of sham and naive, presented indices compatible with severe peripheral nerve injury on the 7th day of evaluation. The group treated with simvastatin alone showed a difference when compared to the control group from the 14th day for the SSI. The LLLT group presented better results in the analysis of SSI and SFI ($p < 0.05$) from the 21st postoperative day, this data was maintained when compared to the simvastatin group and the LLLT/Sinv group. The results of the analyses, thermal hyperalgesia, mechanical hyperalgesia and thermography were not significant. From the results obtained with the analyses, it can be seen that photobiomodulation was more effective than the action alone and in conjunction with simvastatin for sciatic nerve lesions in mice.

Keywords: Low Level Laser Therapy. Simvastatin. Crush Injury. Peripheral Nerve. Regeneration. Electropysical Agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fases da degeneração Walleriana.....	5
Figura 2 – Procedimento de esmagamento do nervo ciático utilizando a pinça	15
Figura 3 – Imagem ilustrativa da aplicação da fotobiomodulação sobre a lesão	15
Figura 4 – Representação dos parâmetros utilizados para calcular o IFC e o IEC.....	17
Figura 5 – Imagem do animal através do IFC	17
Figura 6 – Imagem do animal através do IEC	18
Figura 7 – Imagem ilustrativa do animal durante a análise da hiperalgesia térmica.....	19
Figura 8 – Imagem ilustrativa do animal recebendo o estímulo tátil através dos filamentos de Von Frey.....	20
Figura 9 – Imagem obtida através da utilização da termografia.....	21
Figura 10 – Dados obtidos através da análise do IEC	22
Figura 11– Dados obtidos através da análise do IFC	23
Figura 12 – Dados obtidos através da análise da hiperalgesia térmica	25
Figura 13 – Dados obtidos através da análise da hiperalgesia mecânica	26
Figura 14 – Dados obtidos através da análise termográfica	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP – monofosfato cíclico de adenosina

AsGaAlnP: Arseneto de Gálio Alumínio Índio Fosforo.

ATP: Adenosina Trifosfato

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

cm: centímetros

Col.I – colágeno tipo I

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Dex – dexametasona

DNA – ácido desoxirribonucleico

DP – desvio padrão

E: Energia emitida

EP – erro padrão

FADH₂ – flavina adenina dinucleotídeo

FGF – fator de crescimento de fibroblastos

g: gramas

He-Ne – Hélio neônio

HMG – CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

IEC: Índice Estático do Ciático

IFC: Índice Funcional do Ciático

iNOS – óxido nítrico sintase

IT – abertura dos dedos intermediários

J/cm²: Joules por centímetro quadrado

J: Joules

kg: quilogramas

LAIF: Laboratório de Autoimunidade e Imunofarmacologia

LARAL: Laboratório de Avaliação e Reabilitação do Aparelho Locomotor

LBI: Laser de Baixa Intensidade

LED – diodos emissores de luz

LLLT: Low Level Laser Therapy

LNP: Lesões Nervosas Periféricas

mg: miligramas

MPO – Mieloperoxidase

mW: milliWatts

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NGF – fator de crescimento do nervo

nm: nanômetros

°C: graus Celsius

PL – comprimento da pata

PNL – Peripheral Nerve Lesions

PPG-CR – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação

Rhoa/Rock – Rho cinase

RNA – ácido ribonucleico

s: segundos

SFI: Sciatic Functional Index

SINV: Sinvastatina

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

SSI: Sciatic Static Index

TS – abertura total dos dedos

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO	3
1.1.1 Objetivo Geral.....	3
1.1.2 Objetivos Específicos	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA	4
2.2 FOTOBIMODULAÇÃO NAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS.....	5
2.3 AÇÃO DAS ESTATINAS NAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 AMOSTRAGEM.....	11
3.2 CÁLCULO AMOSTRAL	11
3.3 LOCAL DO ESTUDO.....	12
3.4 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	12
3.5 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO	13
3.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	13
3.6.1 Modelo de lesão do nervo ciático	13
3.6.2 Fotobimodulação na lesão do nervo ciático	14
3.6.3 Sinvastatina na lesão do nervo ciático.....	15
3.7 PROCEDIMENTO DE COLETA DE DADOS	16
3.7.1 Índice Funcional Do Ciático.....	16
3.7.2 Índice Estático Do Ciático	17
3.7.3 Hiperalgisia Térmica Ao Calor	18
3.7.4 Hiperalgisia Mecânica	19
3.7.5 Termografia.....	20
3.8 EUTANÁSIA	21
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	21
4 RESULTADOS	22
4.1 ÍNDICE ESTÁTICO E ÍNDICE FUNCIONAL DO CIÁTICO	22
4.2 HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR.....	24
4.3 HIPERALGESIA MECÂNICA	25
4.4 TERMOGRAFIA	26
5 DISCUSSÃO.....	28

6	CONCLUSÃO.....	33
7	REFERÊNCIAS.....	34
8	ANEXO A- CEUA.....	39

1. INTRODUÇÃO

A lesão nervosa periférica é um problema comum com um quadro clínico grave e sem características letais (MOATTARI et al., 2017), contudo, leva a perda funcional completa ou ao comprometimento permanente do seguimento afetado impondo um ônus econômico tanto nos pacientes como na sociedade (MOATTARI et al., 2018).

A lesão nervosa desencadeia uma série de eventos naturais dentro dos neurônios e das células de Schwann, permitindo assim, a eficácia da regeneração axonal, a remielinização e o reparo do nervo acometido (DUN; PARKINSON, 2018). Embora, os axônios do sistema nervoso periférico possuam uma elevada capacidade regenerativa, a recuperação funcional completa é raramente alcançada (GALLAHER; STEWARD, 2018).

A taxa de lesão do nervo periférico, em países desenvolvidos, é avaliada em torno de 13 a 23 pessoas a cada 100.000, por ano (MOATTARI et al., 2018). A elevada incidência de acometimento dos nervos periféricos e a escassez de uma recuperação funcional consistente alarmam sobre a necessidade de inserção de novas intervenções destinadas a melhorar estes danos, além da definição mais aprimorada das intervenções já existentes e intervenções mais acessíveis financeiramente ao indivíduo acometido (GALLAHER; STEWARD, 2018).

Novas abordagens terapêuticas são estudadas para o tratamento das lesões nervosas, e a fotobiomodulação ganhou destaque na literatura devido aos seus efeitos biomoduladores, analgésicos e anti-inflamatórios em vários tecidos (ANDRAUS et al., 2017; HOLANDA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018; SONG et al., 2017).

Os efeitos advindos da fotobiomodulação são relacionados à absorção de fótons por fotorreceptores, alterando a síntese de adenosina trifosfato na cadeia mitocondrial através da aceleração das cadeias de transporte de elétron e na modulação das reações celulares, provocando melhora na funcionalidade pós-lesão, aumento da espessura da bainha de mielina, diminuição do processo inflamatório, remodelamento da matriz extracelular e consequente regeneração nervosa (ANDREO et al., 2017; BARBOSA et al., 2010a; BARBOSA et al., 2010b; BUCHAIM et al., 2016; FALLAH et al., 2016; OKMEN et al., 2017; SONG et al., 2017; TOMAZONI et al., 2017; ZIAGO et al., 2017).

Estudos envolvendo a utilização de agentes farmacológicos na regeneração

nervosa também estão sendo desenvolvidos, dentre eles, as estatinas ou inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A - HMG-CoA redutase da via do mevalonato (VIEIRA et al., 2017). As estatinas são fármacos que possuem custos mais acessíveis quando comparados a outros agentes farmacológicos e atuam na fase limitante de biossíntese do colesterol através da inibição da HMG-CoA redutase, diminuindo os níveis de colesterol no sangue (VIEIRA et al., 2017). Entretanto, seus efeitos não devem ser restritos apenas a sua ação hipolipemiante, pois as estatinas apresentam efeitos pleiotrópicos ou independentes de colesterol, como efeitos antiinflamatórios, imunomoduladores, neuroprotetores, antioxidantes, antinociceptivos, dentre outros (BOLAND et al., 2018; JEONG et al., 2018; KRYSIAK; KOWALCZE; RYU et al., 2018; VIEIRA et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

A partir do apresentado e dos efeitos referentes às duas terapêuticas aqui mencionadas, surge a seguinte pergunta problema: A associação da fotobiomodulação por laser de baixa intensidade com a sinvastatina promove melhora no quadro funcional com consequente redução do tempo de regeneração em lesões do nervo ciático em camundongos?

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos associativos de um protocolo de fotobiomodulação com a sinvastatina na regeneração do nervo ciático em camundongos após o esmagamento.

1.1.2 Objetivos Específicos

Verificar se os efeitos advindos da fotobiomodulação são mais efetivos que os da sinvastatina na regeneração nervosa e vice-versa;

Verificar se os efeitos conjuntos da fotobiomodulação com a sinvastatina são efetivos para lesão nervosa periférica;

Verificar em qual fase da lesão as terapêuticas obtiveram melhores resultados;

Avaliar a regeneração funcional do nervo ciático e em qual fase da lesão ocorreu a melhor resposta regenerativa;

Avaliar se a lesão nervosa ocasiona alterações de sensibilidade como hiperalgesia térmica ao calor;

Verificar se a lesão nervosa ocasiona alterações térmicas no segmento afetado;

Verificar se a lesão nervosa gera redução/aumento da sensibilidade tátil da pata do animal quando estimuladas;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

As lesões nervosas periféricas resultam em incapacidades graves que podem exercer efeito sobre a qualidade de vida e aumentar significativamente os custos sociais e pessoais (ZHU et al., 2019). Ao contrário do sistema nervoso central (SNC), o SNP possui a capacidade de se regenerar espontaneamente após a lesão nervosa, ativando a capacidade intrínseca de crescimento dos neurônios, porém, esta capacidade é limitada e a regeneração neural espontânea é lenta (ENDO et al., 2019; ZHU et al., 2019). Sendo assim, as lesões do nervo periférico geralmente levam à morte de neurônios e células da medula espinhal, regeneração insuficiente do axônio, má orientação dos axônios e reinervação muscular comprometida, acarretando resultados funcionais insatisfatórios devido a capacidade intrínseca de crescimento do neurônio estar comprometida e a regeneração axonal ocorrer de forma limitada. (LI et al., 2019; ZHU et al., 2019).

Após a lesão traumática, ocorre um processo denominado de degeneração Walleriana, na qual os axônios do SNP podem regredir e então remielinizar os neurônios lesados distalmente a lesão (PELLEGATTA; TAVEGGIA, 2019; ROBERTS et al., 2017; STASSART et al., 2018; ZHU et al., 2019). Durante a fase inicial da degeneração, as células de Schwann, responsáveis pela produção de mielina, entram em modo de reparo, sendo que, decorrente da lesão às células de Schwann desnervadas perdem sua bainha de mielina e passam a regular negativamente a expressão de genes associados à mielina (Egr2/Krox20, MBP, MPZ, MAG e periaxina) e regular positivamente moléculas específicas de sua fase imatura (L1, NCAM, p75NTR e GFAP). Em seu modo de reparo as células de Schwann passam a regular os fatores neurotróficos e possibilitar o crescimento dos axônios, além de, remover restos de mielina no tubo neuronal lesado, características estas necessária para a regeneração nervosa (PELLEGATTA; TAVEGGIA, 2019; ROBERTS et al., 2017; STASSART et al., 2018).

Com o avançar da lesão, ocorre infiltração de macrófagos para o local apoiando na remoção de detritos, na produção de fatores de crescimento, regeneração de axônios e migração das células de Schwann, as quais assumem uma morfologia alongada e se alinham para facilitar a regeneração. Além disso, a comunicação axonioglia também é fundamental para que ocorra o reparo do nervo lesado, permitindo que ocorra

rediferenciação das células de Schwann e remielinização dos axônios recém gerados, reestabelecendo a condução do impulso nervoso. Contudo, os axônios remielinizados apresentam características diferentes quando comparados a nervos não lesados, possuindo internódios mais curtos e bainhas de mielina mais finas, gerando limitações na propagação do potencial de ação e na condução dos impulsos nervosos (PELLEGATTA; TAVEGGIA, 2019; ROBERTS et al., 2017; STASSART et al., 2018).

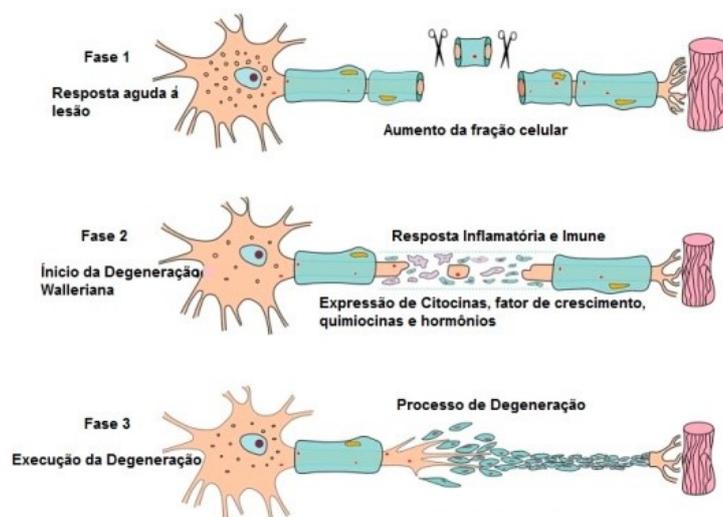


Figura 1 – Fases da degeneração Walleriana. Fonte: Modificado de Yi et al. (2017).

2.2 FOTOBIMODULAÇÃO NAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS

O uso da fotobiomodulação como forma de tratamento tem sido relatado desde o final dos anos 60, logo após a descoberta do primeiro equipamento de lasers por rubi em 1960, e He-Ne em 1961. Desde então, o número de relatos encontrados sobre seus efeitos tem aumentado gradativamente, e no final da década de 1970 houve relatos sobre os efeitos da fotobiomodulação sobre a regeneração de nervos periféricos lesados (BAREZ et al., 2017).

A fotobiomodulação ocorre devido a uma reação fotoquímica induzida na célula, atingindo moléculas chamadas cromóforos que ocasionam um aumento na excitabilidade dos elétrons fazendo com que eles saltem para gradientes de maior energia (ANDREO et al., 2018; HASHMI et al., 2010). Estes elétrons de alta energia são transmitidos por transportadores de elétrons, como a nicotinamida adenina

dinucleotídeo (NADH) e a forma reduzida de flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂), através de uma série de complexos transmembrana, incluindo a citocromo c oxidase, para o receptor final de elétrons, onde produzira um gradiente de prótons, que será usado para produzir ATP (DIAS et al., 2019; HASHMI et al., 2010). A utilização da fotobiomodulação é capaz de regular positivamente a respiração celular, ocasionando aumento nos produtos mitocondriais, como ATP, NADH, proteína, ácido ribonucleico (RNA) e aumento no consumo de oxigênio (PEDRAM et al., 2018).

A nível celular a fotobiomodulação ocasiona fotodissociação de óxido nítrico da citocromo c oxidase prevenindo o deslocamento de oxigênio da citocromo-c oxidase e, portanto, promovendo a respiração celular sem impedimentos, contribuindo assim para efeitos positivos como: aumento nos níveis de energia celular e aumento na produção da molécula de AMP cíclico, que está envolvida em muitas vias de sinalização. Além disso, também age aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio que ativam determinados fatores de transcrição como, fator nuclear κ B [NF- κ B] e proteína ativadora 1, levando a regulação de vários genes protetores e estimuladores (ANDREO et al., 2018; HASHMI et al., 2010; PEDRAM et al., 2018).

A fotobiomodulação promove a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e RNA, aumenta a produção de proteínas, modula a atividade enzimática, afeta o pH intracelular e extracelular e acelera o metabolismo celular, além de estimular a expressão de múltiplos genes relacionados a expressão celular, migração e produção de citocinas e fatores de crescimento (ANDREO et al., 2018; DIAS et al., 2019; PEDRAM et al., 2018).

Adicionalmente, promove angiogênese através da liberação de fatores angiogênicos, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), colágeno tipo I (Col-I), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e óxido nítrico sintase (iNOS) que desempenham papéis fundamentais para a regeneração nervosa (BAREZ et al., 2017; DIAS et al., 2019). Além de que, pode regular a síntese do fator de crescimento do nervo (NGF), que é essencial para o desenvolvimento e manutenção de neurônios simpáticos e sensoriais, promovendo a proliferação, sobrevivência, proteção e diferenciação de neurônios e oligodendrócitos. Quando a fibra nervosa é lesada, os neurônios estão sujeitos a apoptose, um processo bioquímico que altera a morfologia celular e leva a morte neuronal, e o NGF, que modula o reparo de axônios lesados e regula as proteínas que estruturam a mielina, o protege desta ação favorecendo o crescimento das células de Schwann e a regeneração nervosa (AL-SHAMMARI;

SYHOOD; AL-KHAFAJI, 2019; BAREZ et al., 2017; DIAS et al., 2019).

Ziago et al. (2017) investigaram os efeitos morfológicos e morfométricos de três densidades de energia (4, 10 e 50 J/cm²) na regeneração nervosa na lesão por esmagamento do nervo ciático. Foi utilizado um equipamento com 780 nm, 40 mW, 0,04 cm². Trinta ratos *Wistar* foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de seis animais cada (C: grupo lesado; L0: com lesão e sem irradiação; L4: lesão com laser de 4 J/cm²; L10: lesão com laser de 10 J/cm²; L50: lesão com laser de 50 J/cm²). Quinze dias após a cirurgia, os animais foram eutanasiados e o nervo ciático coletado para análises, onde os autores constataram que o laser de baixa intensidade induziu melhora no estado da lesão em todas as densidades utilizadas. No entanto, a densidade de energia de 10 J/cm² foi mais eficaz para melhorar a regeneração do nervo ciático após o esmagamento, obtendo resultados positivos com a aplicação.

De Souza et al. (2018) investigaram os efeitos associativos da fotobiomodulação (laser de baixa intensidade, 660 nm, 10 J/cm², 0,6 J, 16,8 J de energia total emitida, 20 s) com a dexametasona (injeção local de 2 mg/kg) na lesão por esmagamento do nervo ciático em camundongos. Vinte e seis camundongos da linhagem *Swiss* foram utilizados e divididos aleatoriamente em seis grupos (Naive; Sham; Controle; Grupo LBI; Grupo LBI e Dexametasona; Grupo Dexametasona) e os dados foram analisados através do índice estático e índice funcional do ciático. Os animais foram eutanasiados após 28 dias e os resultados obtidos com as análises foram de que a aplicação de laser e dexametasona foram eficazes na regeneração nervosa e os efeitos foram mais satisfatórios quando a fotobiomodulação foi associada a dexametasona.

Barez et al. (2017), verificaram os efeitos da fotobiomodulação (laser de baixa intensidade, 780 nm, 2 J, 100 mW, 40 segundos) na regeneração do nervo ciático em ratos *Wistar*. Doze ratos foram utilizados e divididos aleatoriamente em dois grupos (grupo controle e grupo experimental), ambos os grupos foram submetidos ao procedimento cirúrgico e apenas o grupo experimental foi tratado com laser. Os autores obtiveram como resultados, através da análise histopatológica, que o grupo experimental apresentou aceleração significativa na revascularização e angiogênese, redução da hemorragia, aumento do suprimento sanguíneo, redução da degeneração Walleriana com aumento da densidade axonal quando comparado ao grupo controle.

Segundo uma revisão sistemática de Andreo et al. (2017), a fotobiomodulação é uma modalidade fototerapêutica viável para o tratamento de lesões nervosas periféricas,

demonstrando melhora nos índices funcionais, aspectos morfológicos e expressão de citocinas e fatores de crescimento. Além disso, os autores verificaram que a maioria dos estudos incluídos utilizaram uma potência de 50 mW e energia total de 15 J. Contudo, concluem que ainda é necessária uma padronização dos parâmetros utilizados para lesões do sistema nervoso periférico.

2.3 AÇÃO DAS ESTATINAS NAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS

As estatinas são empregadas clinicamente devido a sua capacidade de reduzir os níveis de colesterol através da inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) da via do mevalonato. São normalmente utilizadas como hipolipemiantes, porém, elas apresentam efeitos pleiotrópicos, incluindo efeitos anti-inflamatórios, imunomodulares, neuroprotetores e antitrombogênicos (CORSO et al., 2017; VIEIRA et al., 2017). Estas substâncias são análogos derivados de fungos (sinvastatina, lovastatina, pravastatina) ou compostos totalmente sintéticos, fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina, rosuvastatina (MIRANDA et al., 2018).

Durante o complexo processo fisiopatológico de reconstrução, a regeneração nervosa assim como a funcionalidade advinda do local lesionado fica críticas, dessa forma, a resposta inflamatória decorrente do sistema imunológico é essencial para estimular o crescimento do axônio e das células de Schwann, desde que ocorra de forma precoce. Com a ativação da fase inflamatória, ocorre recrutamento de macrófagos para o local da lesão, os quais irão limpar a região acometida, eliminando os detritos de mielina e axônios, proporcionando um local adequado para o novo crescimento axonal (BOLAND et al., 2018; JEONG et al., 2018; KRYSIAK; KOWALCZE; MIRANDA et al., 2018; NAMAZI et al., 2019; RYU et al., 2018; VIEIRA et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

Os efeitos positivos da fase inflamatória se restringem ao estágio inicial da lesão e quando prolongados se torna prejudicial. Este efeito negativo é advindo da regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias que agem cessando a resposta imunológica dos macrófagos no local da lesão. Assim sendo, os efeitos pleiotrópicos da sinvastatina contribuem com este efeito de forma positiva, reduzindo a infiltração de células inflamatórias reguladas negativamente através da inibição da via da mieloperoxidase (MPO), (BOLAND et al., 2018; JEONG et al., 2018; KRYSIAK; KOWALCZE;

MIRANDA et al., 2018; NAMAZI et al., 2019; RYU et al., 2018; VIEIRA et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

A sinvastatina atua como fator neurotrófico diminuindo a perda neuronal após lesão, ocasionando melhora na regeneração neuronal e do dano devido ao estresse oxidativo. Ela participa da regulação molecular e ativa células de Schwann, as estimulando a secretar NGFs, aumentando assim, a neogênese e conseqüentemente, favorecendo a regeneração nervosa (NAMAZI et al., 2019).

Um estudo realizado por Corso et al. (2017) verificou que durante a degeneração Walleriana induzida pela lesão nervosa, ocorre aumento da atividade da MPO no nervo ciático, a mesma é fundamental na síntese de espécies reativas de oxigênio que são danosas ao nervo. O tratamento com sinvastatina inibiu a atividade da MPO, ocasionando aumento da espessura da bainha de mielina e do número de fibras, redução da perda neuronal e destruição axonal (CORSO et al., 2017). Além disso, a MPO é encontrada nos grânulos das células inflamatórias neutrofílicas e usada como marcador indireto do tecido neutrofílico (CORSO et al., 2017). Com a administração de sinvastatina, a inibição da MPO ocasiona redução de infiltração de neutrófilos no local da lesão, com conseqüente efeito anti-inflamatório, sendo benéfica para a regeneração nervosa (CORSO et al., 2017).

Namazi et al. (2019) verificaram os efeitos da sinvastatina (8 mg/kg) e da L-carnitina (100mg/kg) sobre a regeneração do nervo ciático de ratas *Wistar* e verificaram seus efeitos durante sete e trinta dias. Foram utilizadas 70 ratas divididas aleatoriamente em sete grupos: controle; sinvastatina 1 semana; L-carnitina 1 semana; placebo 1 semana; sinvastatina 1 mês, L-carnitina 1 mês e placebo 1 mês. Como resultados, obtiveram que ambas as terapias quando comparadas aos grupos controle e placebo, tiveram resultados satisfatórios na regeneração do nervo ciático, porém, a terapia de longo prazo foi mais efetiva quando comparada a terapia de curto prazo e concluíram que tanto a sinvastatina quanto a L-carnitina aprimoram o processo de regeneração nervosa.

Xavier et al. (2012) verificaram os efeitos da sinvastatina (20 mg/Kg) aplicada a lesão por esmagamento do nervo ciático em ratos *Wistar*. Foram utilizados quarenta animais divididos aleatoriamente em quatro grupos e as análises foram realizadas através do índice funcional do ciático, análise histopatológica e exames sanguíneos. Depois das análises serem verificadas, os autores obtiveram como resultados que o

grupo lesão tratado com sinvastatina apresentou aumento nos escores do índice, diminuição de edema, diminuição da infiltração de células mononucleares durante a degeneração Walleriana e regeneração nervosa e aumento de neutrófilos circulantes. Os autores concluíram que a sinvastatina acelera o processo de recuperação morfológica e funcional do sistema nervoso periférico.

No estudo de Guo et al. (2018) utilizaram condutos de quitosana preenchidos com sinvastatina (0; 0,5 e 1,0 mg) no tratamento do nervo ciático de ratos lesados. Os autores usaram a quitosana revestida de sinvastatina, como enxerto no local da lesão, conectando o nervo. Após as análises pré-estabelecidas, verificou-se, após 10 semanas de implante, aumento no índice funcional do ciático, aumento no potencial de ação muscular, velocidade de condução nervosa, espessura da bainha de mielina, aumento no diâmetro do axônio, aumento dos níveis de fator de crescimento endotelial vascular e fator neurotrófico, concluindo que a quitosana preenchida com sinvastatina melhora a regeneração nervosa periférica e a recuperação funcional em ratos lesados. Com base nestes achados, pode-se verificar que a sinvastatina através de seus efeitos pleiotrópicos é eficaz na regeneração nervosa periférica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

Foram utilizados 50 camundongos da linhagem *Swiss*, adultos, machos, aproximadamente três meses de idade, com peso médio de 40 gramas, oriundos do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) campus Florianópolis e alocados no Biotério Setorial da UFSC campus Araranguá. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, recebendo água filtrada e ração *ad libitum*.

3.2 CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo estatístico para definir o tamanho da amostra baseou-se no teste de estimativas mostrado na fórmula descrita abaixo.

$$n = \left\{ \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta}) * s}{\sigma} \right\}^2$$

O teste baseia-se no cálculo do intervalo de confiança da diferença entre as médias ou entre proporções (σ), do desvio padrão (s) do parâmetro alfa (Erro do Tipo I: probabilidade aceitável de encontrar uma diferença inexistente) e do parâmetro beta (Erro do tipo II: risco aceitável de perder uma diferença existente). Assim, partimos dos seguintes pressupostos para o cálculo do número de animais:

1. O valor de alfa será fixado em 0,05. Assim o valor de z_{α} , baseado na tabela de z para distribuição bi-caudal é de 1,96;
2. O valor de beta será fixado em 0,10. Assim o valor de z_{β} , baseado na tabela de valores de z para distribuição unicaudal é de 1,28;
3. O valor da diferença entre as médias dos grupos será de 40% (baseado em dados experimentais do nosso grupo de pesquisa). Experimentos biológicos têm

embutido um erro da ordem de 10 a 15% (resultantes de variações individuais, erro no procedimento cirúrgico, erros de dosagem, dentre outros), diferenças entre dois grupos que sejam menores que 20% do valor da média de cada grupo podem aumentar a probabilidade de cometer erros tipo I ou tipo II;

4. O valor do desvio padrão será em média de 35% do valor das médias (baseado em dados experimentais do nosso grupo de pesquisa).

Assim, aplicando os valores a fórmula acima temos:

$$n = \{[(1,96 + 1,28) * 35]/40\}^2 = 8 \text{ animais}$$

Definimos oito animais por grupo experimental nas metodologias citadas anteriormente. Entretanto, em função da incidência média dos modelos experimentais utilizados ($\pm 80\%$), foi necessário uso de 10 animais em cada um dos grupos experimentais submetidos a intervenção e controle. Para os grupos sham e naive foram utilizados 5 animais, devido a recomendação da Comissão de ética e experimentação animal (CEUA/UFSC – protocolo 8142240317 – Anexo A) .

3.3 LOCAL DO ESTUDO

Os experimentos foram realizados na ala cirúrgica e comportamental do Biotério Setorial da UFSC Araranguá e no Laboratório de Autoimunidade e Imunofarmacologia (LAIF), durante a fase clara do ciclo (7-19 horas).

3.4 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

- Naive – (5 animais): Os animais deste grupo não foram submetidos ao procedimento cirúrgico e a nenhum tipo de tratamento;
- Sham – (5 animais): Os animais deste grupo foram expostos a incisão cirúrgica sem realização do esmagamento do nervo ciático e sem nenhum tipo de tratamento;
- Controle – (10 animais): Os animais deste grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico com esmagamento do nervo ciático, sem a utilização da fotobiomodulação ou da sinvastatina.
- LLLT – (10 animais): Os animais deste grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico com esmagamento do nervo ciático, associados à fotobiomodulação com

660 nm, 10 J/cm²; Potência de 30 mW; Fluência de 10 J/cm²; Energia Emitida (E) = 0,6 J; Área do feixe 0.06 cm²; Energia total emitida= 16.8 J, tempo de exposição de 20 s e tempo de exposição total = 560 s);

- Sinvastatina - (10 animais): Os animais deste grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico com esmagamento do nervo ciático, associados a administração por gavagem de sinvastatina (20 mg/kg);
- LLLT/Sinv - (10 animais): Os animais deste grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico com esmagamento do nervo ciático, associados ao mesmo protocolo de fotobiomodulação e da sinvastatina.

3.5 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

A condução do experimento foi realizada de forma independente a fim de evitar vieses durante as coletas e avaliações. Sendo assim, os animais foram randomizados em bloco para minimizar o viés.

Todos os animais foram manuseados e expostos aos tratamentos (real ou placebo) para garantir o desenvolvimento do mesmo padrão comportamental no decorrer do experimento. Desta forma, os animais não pertencentes ao grupo fotobiomodulação, foram submetidos ao manuseio e aplicação do aparelho desligado durante 20 segundos e os animais não pertencentes aos grupos tratados com sinvastatina, receberam por via gavagem, uma solução de salina nas mesmas concentrações que os grupos tratados com sinvastatina.

Todos os equipamentos foram previamente testados e calibrados conforme a orientação do fabricante.

3.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.6.1 Modelo de lesão do nervo ciático

Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina a 10% (Syntec do Brasil Ltda, Rhobifarma TM, Hortolândia, São Paulo, Brasil - 0,1 mL / 100 g de peso

corporal) e xilazina a 2% (Syntec do Brasil Ltda, Rhobifarma TM, Hortolândia, São Paulo, Brasil - 0,07 mL / 100 g peso corporal), sendo administradas por via intraperitoneal. Após a anestesia, foi verificado se os reflexos de retirada da pata e da cauda estavam ausentes e só então os animais foram submetidos à tricotomia da coxa traseira direita, de forma manual, e realizada a incisão na face lateral do membro (bisturi número 15, Embramed Indústria e Comércio de Produtos Hospitalares TM, São Paulo – SP). Após a incisão, os músculos glúteo máximo e bíceps femoral foram afastados e o nervo ciático foi exposto e submetido ao esmagamento acima da divisão dos três ramos principais (fibular, tibial e sural) , utilizando um dispositivo portátil de pinça regulável e previamente calibrada, com carga aplicada de 5000 g e área de esmagamento de 0,5 cm, durante 10 minutos (figura 2) . Após a lesão, o nervo foi reposicionado em seu leito seguido da sutura dos músculos e da pele (Tecnew TM, Quintino, Rio de Janeiro, Brasil).

Ao fim do procedimento cirúrgico, o animal foi alocado em frente ao aquecedor portátil para evitar hipotermia. Após os efeitos da anestesia cessarem, os animais foram devolvidos para o biotério e foram observados diariamente durante o período de 28 dias.



Figura 2 - Procedimento de esmagamento do nervo ciático com a pinça regulável e o animal anestesiado. Fonte: Arquivo pessoal.

3.6.2 Fotobiomodulação na lesão do nervo ciático

A fotobiomodulação foi realizada através do Laser de Baixa Intensidade (Ibramed Equipamentos Médicos[®], Amparo, Brasil), utilizando o laser de diodo Alumínio Gálio Índio Fosforo com comprimento de onda de 660 nm, 10 J/cm²,

potência de 30 mW e área do feixe de 0,06 cm², com feixe contínuo, 1 ponto de aplicação, energia 0,6 J por dia e energia total emitida de 16,8 J (BARBOSA et al., 2010a; BARBOSA et al., 2010b; DE SOUZA et al., 2018) durante 28 dias, sendo aplicado acima da incisão cirúrgica. A caneta foi posicionada em uma angulação de 90° em relação ao tecido cutâneo, sendo utilizada a técnica pontual com contato, imediatamente após a operação e nos 27 dias consecutivos nos grupo LLLT e LLLT/Sinv (Figura 3).

Para a aplicação da fotobiomodulação, foi utilizada a técnica de pega manual pelo dorso do animal para todos os animais e para os sete primeiros dias de pós-operatório a pega manual foi realizada com menor intensidade a fim de evitar deiscência da ferida operatória.



Figura 3 – Imagem ilustrativa da aplicação da fotobiomodulação sobre a lesão. Fonte: Arquivo pessoal.

3.6.3 Sinvastatina na lesão do nervo ciático

Para a aplicação da sinvastatina, foi seguido o protocolo realizado por Xavier et al., (2012), com aplicação de sinvastatina uma vez ao dia, 20mg/kg durante 5 dias consecutivos imediatamente após o procedimento cirúrgico. Neste estudo, a sinvastatina foi diluída em 20 mL de solução salina e administrada via oral através da técnica de gavagem.

Os animais submetidos ao tratamento por sinvastatina foram manuseados através da técnica de pega manual durante cinco dias consecutivos, recebendo por via gavagem

a dose previamente determinada. Para os animais não submetidos ao tratamento com sinvastatina, os mesmos receberam a mesma concentração de solução salina via gavagem.

3.7 PROCEDIMENTO DE COLETA DE DADOS

3.7.1 Índice Funcional Do Ciático

A avaliação da regeneração nervosa em animais é um fator desafiador. Geralmente, a recuperação das lesões é estudada através de técnicas de histologia e morfometria. Contudo, esses métodos não permitem um entendimento funcional do seguimento avaliado, como na lesão do nervo ciático. Os índices possuem uma correlação direta com as análises histológicas, sendo um método confiável para verificação funcional da regeneração nervosa (BARBOSA et al., 2010a; BARBOSA et al., 2010b; DE SOUZA et al., 2018; MARCOLINO et al., 2009; MARCOLINO et al., 2013; REIS et al., 2008; ; SONG et al., 2017; TAKHTFOOLADI et al., 2015 ; WANG et al., 2014;; ZIAGO et al., 2017).

Para a avaliação funcional foi utilizado o Índice Funcional do Ciático (Sciatic Functional Index – SFI), proposto por Medinaceli, Freed e Wyatt em 1982 (MEDINACELI, FREED e WYATT, 1982), que utiliza de um método de análise funcional da marcha que verifica o grau de lesão e recuperação funcional do nervo ciático.

O IFC consiste em obter imagens da pegada do animal, através da utilização de uma passarela onde as pegadas serão transferidas para um pedaço de papel ou capturadas por câmera e então analisadas, utilizando como parâmetro o comprimento da pegada, o espalhar dos dedos e o espalhar intermediário dos dedos (MARCOLINO et al., 2013; REIS et al., 2008) (Figura 4 e Figura 5). Os resultados variam de zero a -100, que é um indicador de função nervosa, onde zero é ausência de disfunção e -100 significa disfunção completa, sendo os resultados confiáveis quando comparados a análises histológicas do nervo.

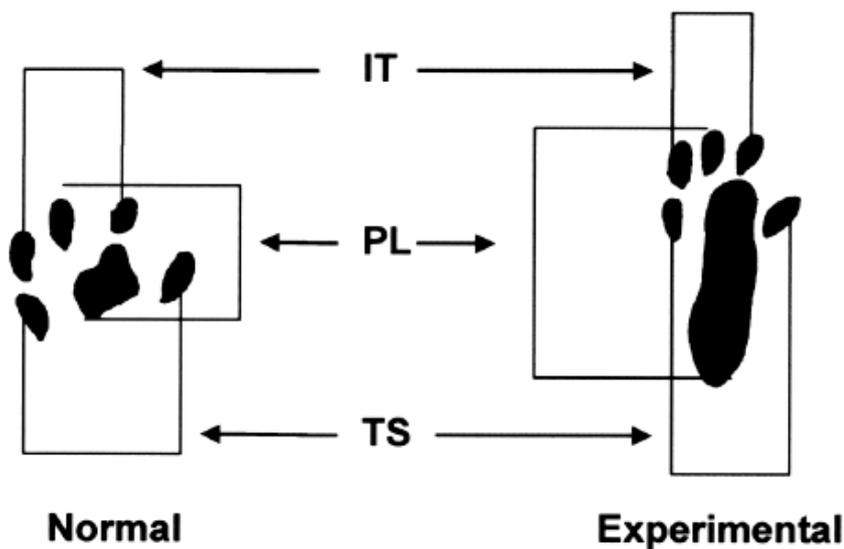


Figura 4 - Representação dos parâmetros utilizados para calcular o IFC e IEC; IT: abertura dos dedos intermediários; PL: comprimento da pegada; TS: abertura total dos dedos. Fonte: DE SOUZA et al., 2018.



Figura 5 – Imagem do animal através do Índice Funcional do Ciático após conversão para o programa Image J. Fonte: Arquivo pessoal.

3.7.2 Índice Estático Do Ciático

Para avaliação estática foi utilizado o Índice Estático do Ciático (Static Sciatic Index – SSI) no qual estudos vêm demonstrando sua eficácia na avaliação da marcha em ratos, sendo que, Takhtfooladi et al. (2015), utilizou o IEC para avaliar as pegadas do animal quando o mesmo está em posição estática, verificando que minimiza os vieses decorrentes da velocidade da marcha no momento da avaliação, além de sugerir ser mais preciso que o IFC através da análise dos resultados obtidos no estudo de Smit et al.

(2004) (Figura 6).

As impressões foram registradas por uma câmera de 8 megapixels, fixada sob uma passarela de acrílico transparente com 43 cm de comprimento, 5,5 cm de altura e 8,7 cm de largura, tendo ao final uma casinhola de madeira. Os vídeos das pegadas foram digitalizados pelo programa *Kinovea*TM para obtenção das imagens das pegadas (IFC). As imagens foram analisadas por meio do programa *Image J*TM, para transformar os pixels em milímetros e realizar o cálculo dos parâmetros predeterminados na avaliação do índice funcional do ciático e índice estático do ciático. As impressões das pegadas foram obtidas no pré-operatório e após 7º, 14º, 21º e 28º dias da lesão inicial e avaliadas pelas fórmulas do IFC e IEC propostas por Bain, Mackinnon e Hunter (1989) e Bervar et al. (2000), respectivamente.

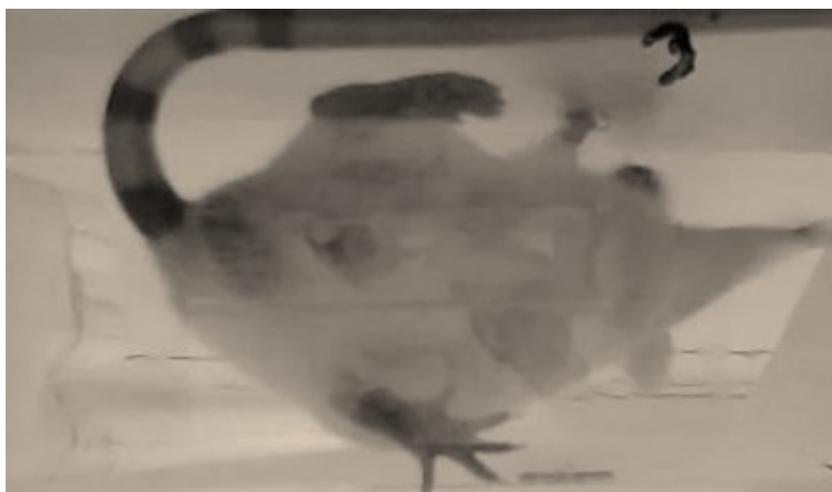


Figura 6 – Imagem do animal através do Índice Estático do Ciático. Fonte: Arquivo pessoal.

3.7.3 Hiperalgisia Térmica Ao Calor

A avaliação da hiperalgisia térmica ao calor foi realizada através do aparelho de Hargreaves[®] (UgoBasile, Comerio, Itália), conforme previamente descrito (HARGREAVES et al., 1988; FERNANDES et al., 2016) o qual possui uma fonte luminosa de infravermelho irradiada diretamente na pata do animal. Inicialmente, os animais foram ambientados na sala de experimentação por 1 hora antes do teste. A pata direita traseira foi alocada exatamente abaixo da pata ipsilateral (que recebeu o estímulo algogênico) e posteriormente ligada por um operador (figura 7).

A latência de retirada da pata após a aplicação do estímulo térmico foi medida automaticamente através de um sensor. O tempo de 20 segundos foi determinado como *cut-off*, a fim de evitar possíveis danos teciduais na pata dos animais. Foram realizadas três medidas do tempo de resposta, registradas em intervalos de 20 minutos. A fim de determinar o limiar basal, todos os grupos foram avaliados antes do procedimento cirúrgico. A avaliação da hiperalgesia térmica foi avaliada no dia 0,14^o, 21^o e 28^o dias pós-cirurgia, com exceção do 7^o dia, onde um estudo piloto mostrou alto potencial de deiscência da ferida operatória devido ao manejo necessário para a realização da avaliação.

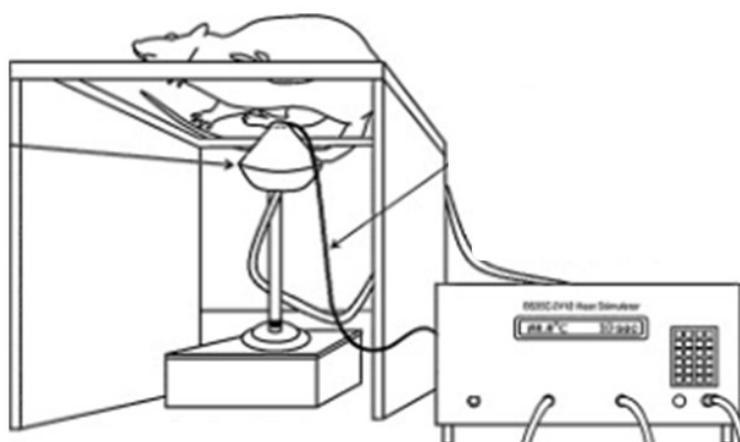


Figura 7 – Imagem ilustrativa do animal durante a análise da hiperalgesia térmica utilizando o aparelho de Hargreaves®. Fonte: Adaptado de Baniki e Kabadi (2013).

3.7.4 Hiperalgesia Mecânica

O procedimento de avaliação da hiperalgesia mecânica foi por meio da utilização dos Filamentos de Von Frey[®] (VFH, Stoelting, Chicago, EUA) pelo método de frequência de retirada (0-100%). Os animais foram alocados individualmente em caixas de acrílico (9x7x11 cm) em plataformas de arame elevadas, as quais permitem o acesso à superfície plantar da pata traseira direita dos animais (Figura 8). A frequência da resposta de retirada foi avaliada após 10 aplicações, com intervalo de 1 segundo. O filamento 0,4 g foi configurado a partir de estudos anteriores para produzir uma frequência de retirada média de cerca de 15%, adequado para medir a hiperalgesia mecânica.

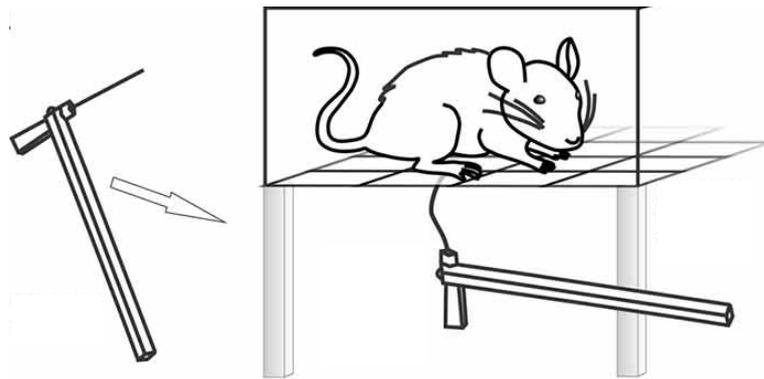


Figura 8 – Imagem ilustrativa do animal recebendo o estímulo tátil através dos filamentos do Von Frey®. Fonte: Adaptado de Deuis, Dvorakova e Vetter (2017).

3.7.5 Termografia

Para verificar a possibilidade de alteração na termorregulação do camundongo após o procedimento cirúrgico e ao tratamento com fotobiomodulação e sinvastatina foi avaliada a temperatura local por meio de uma câmera termográfica. A termografia envolve a captura de fotos infravermelhas usadas para medir a temperatura corporal da superfície periférica, verificando o fluxo sanguíneo em diferentes regiões do corpo (MUFFORD et al., 2016). O fluxo sanguíneo do camundongo aumenta na cauda e na periferia, a fim de dissipar o calor, assim, a termografia se torna útil para examinar a termorregulação (MUFFORD et al., 2016).

No presente estudo foi utilizada a câmera termográfica FLIR C2 (FLIR® Systems), com gama espectral de 7,5 – 14 μm , resolução espacial (IFOV) de 11 mrad, sensibilidade de 100 mK. A câmera é equipada com microbolômetro não refrigerado com campo detector de 17 μm , faixa de temperatura de -10°C a $+150^{\circ}\text{C}$, acurácia de $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ou 2% à 25°C , frequência de imagem de 9 Hz e display de 320x240 pixels. Emissividade foi ajustada para 0.95, temperatura refletida de 30°C . A câmera foi posicionada a 25 cm de distância do animal e as fotos foram analisadas por meio do software FLIR Tools (FLIR®, Systems), com a escala de temperatura mantida de 20 a 40°C e realizadas no 0, 14°, 21° e 28° dias pós- cirurgia, com exceção do 7° dia, devido ao risco de deiscência da ferida (Figura 9).

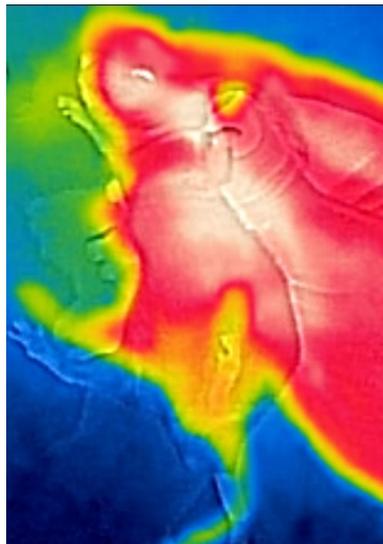


Figura 9 – Imagem obtida através da utilização da termografia. Fonte: Arquivo pessoal.

3.8 EUTANÁSIA

Após os 28 dias de tratamento, a eutanásia foi efetuada pelo uso excessivo de anestésico: Cetamina e Xilazina, seguindo as recomendações da Lei n. 11.794/2008, do Decreto n. 6.899/2009 e demais disposições legais pertinentes ao escopo da Lei n. 11.794/2008, e das resoluções do CONCEA, e o nervo foi recolhido e alocado em eppendorf com formaldeído para futuras análises.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, sendo analisados pelo ANOVA two way para modelos mistos seguido do pós-teste de Bonferroni. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Komogorov Smirnov. O valor alfa estabelecido foi de 5% considerando um valor de $p < 0,05$ para mostrar diferenças significativas entre os meios. Foi utilizado o software GraphPad Prism[®] 8.0 (San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 ÍNDICE ESTÁTICO E ÍNDICE FUNCIONAL DO CIÁTICO

Na figura 10, observa-se os dados referentes a análise do índice estático do ciático através do programa estatístico GraphPad Prism[®], nesta análise verifica-se que os dados obtidos estão dentro da normalidade considerando um alfa de 0.05.

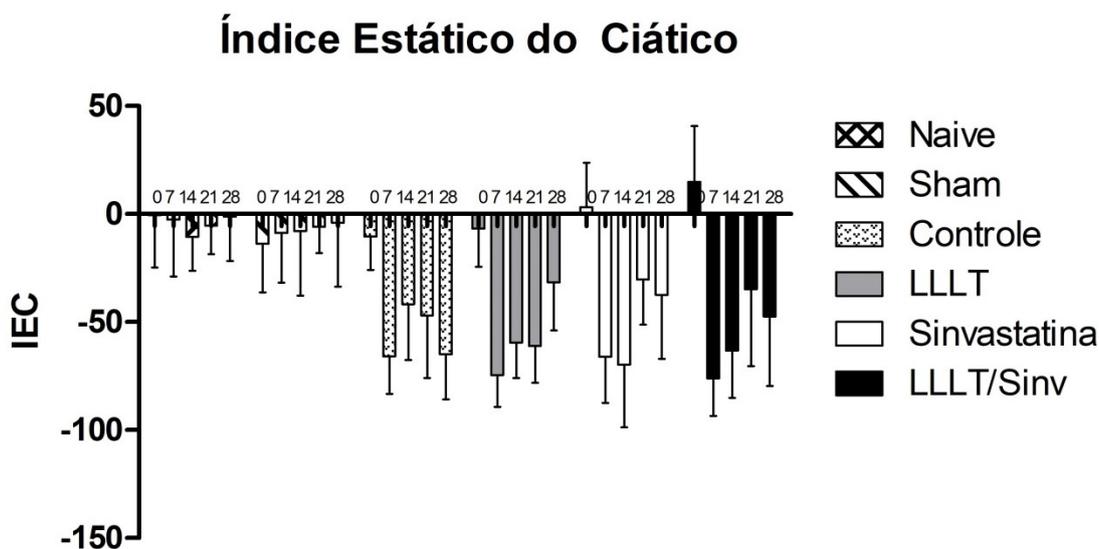


Figura 10 – Dados obtidos através da análise do índice estático do ciático, apresentando as diferentes variações de um grupo para o outro, assim como, de uma avaliação para a outra (dias).

Na figura 10, os dados referentes ao 7º dia de cada grupo demonstram a efetividade da operação cirúrgica e do esmagamento do nervo ciático nos grupos operados. Tal característica pode ser comparada aos dados dos grupos não operados a fim de confirmar a efetividade cirúrgica.

Observa-se que nos primeiros sete dias, os animais apresentaram valores mais próximos de 100, compatíveis com lesão de nervo ciático segundo os índices. Como

exemplo, usa-se a comparação entre o grupo naive (nenhuma intervenção) e o grupo controle (esmagamento sem tratamento) no 7º dia de pós-operatório, onde há diferença significativa entre os grupos com um $p < 0.05$.

A comparação grupo controle e grupo LLLT obteve diferença significativa no 28º dia ($p < 0.05$); grupo controle e grupo sinvastatina a partir do 14º dia ($p < 0.05$); grupo controle e grupo LLLT/Sinv sem diferenças significativas em nenhum dos dias verificados segundo o IEC.

Para o grupo LLLT, a sua comparação com o grupo sinvastatina obteve resultados positivos a favor do LLLT a partir do 21º dia de pós-operatório ($p < 0.05$) e quando comparados ao grupo LLLT/Sinv não apresentou diferenças ($p > 0.05$).

Para o grupo Sinvastatina, seus efeitos quando comparados ao grupo LLLT/Sinv e ao grupo LLLT não foram significativos ($p > 0.05$).

Em geral, a interação entre os efeitos observados nos grupos no decorrer das avaliações é de 13,94% da variância total, ou seja, extremamente significativa.

Na figura 11 consta os dados referentes à análise do índice funcional do ciático.

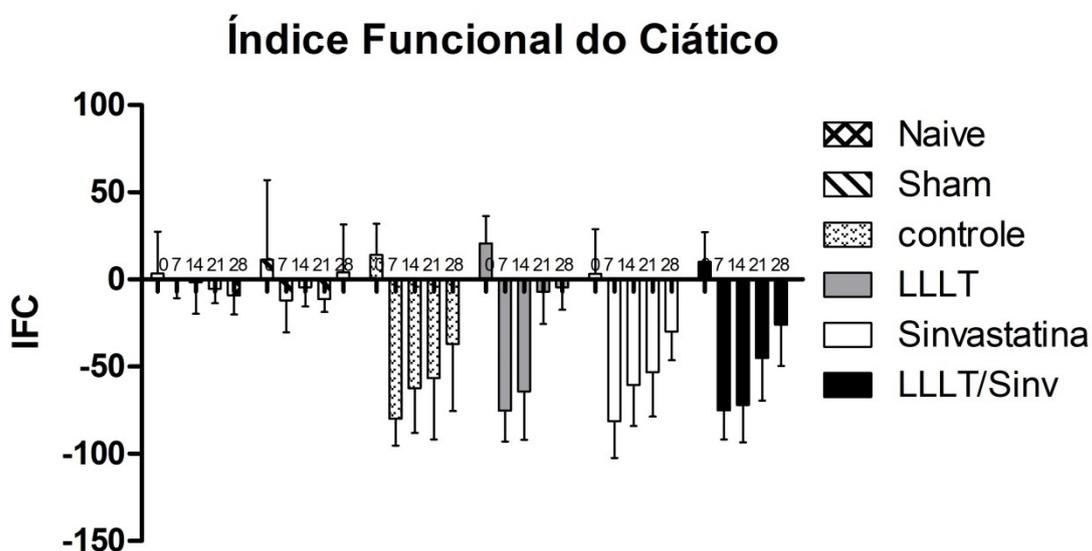


Figura 11 - Dados obtidos através da análise do índice funcional do ciático, apresentando as diferentes variações de um grupo para o outro, assim como, de uma avaliação para a outra (dias).

Na figura 11, na comparação entre o grupo LLLT com o grupo Sinvastatina é possível verificar visualmente uma melhora significativa nos valores a partir do 21º dia

para o grupo LLLT, sugerindo regeneração nervosa quase completa do segmento avaliado.

O grupo controle comparado ao grupo LLLT, obteve resultados estatisticamente significativos a partir do 21º dia ($p < 0.05$); grupo controle comparado ao grupo sinvastatina e posteriormente ao grupo LLLT/Sinv sem resultados significativos ($p > 0.05$).

Para as comparações entre o grupo LLLT com o grupo sinvastatina, obteve-se melhora significativa a partir do 21º dia ($p < 0.05$). O mesmo ocorreu na comparação com o grupo LLLT/Sinv ($p < 0.05$), comprovando estatisticamente que o LLLT é mais efetivo que as outras terapias a partir do 21º de pós-operatório, segundo o IFC.

No grupo sinvastatina, suas comparações com grupo LLLT e grupo LLLT/Sinv não foram significativas ($p > 0.05$), sugerindo deste modo, que a ação isolada da sinvastatina não foi efetiva quando comparada a ação do LLLT.

A interação entre os efeitos observados nos grupos no decorrer dos dias é extremamente significativa com um valor de 11,22% ($p < 0.05$) da variância total. A influência dos grupos sobre os resultados é de 16,59% ($p < 0.05$) da variação total e a influência dos dias sobre os resultados é de 29,00% ($p < 0.05$) da variação total.

4.2 HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR

Os dados apresentados na figura 12, referem-se a análise realizada para verificar a hiperalgisia térmica ao calor. Reduções significativas na latência de retirada da pata foram interpretadas como hiperalgisia térmica. Os dados obtidos com as análises demonstram que não houve diferença significativa entre os grupos.

A interação entre os efeitos observados nos grupos no decorrer dos dias é de 4,73% da variância total, sendo considerada não significativa ($P: 0.8160$). A influência dos grupos sobre os resultados obtidos é não significativa, possuindo 4,69% da variância total ($P: 0.0840$). Contudo, os valores diferem com o passar dos dias gerando uma variância total de 5,69% e um $P: 0.0087$ sendo considerado significativo.

Para a análise de hiperalgisia térmica, verificando os dados obtidos com a análise estatística para todos os grupos, não se obteve melhora significativa ($p > 0.05$) em nenhuma das comparações e em nenhum dos dias de avaliação, sugerindo assim, que a lesão do nervo ciático não ocasiona hiperalgisia térmica ao calor segundo os dados do

aparelho de Hargreaves.

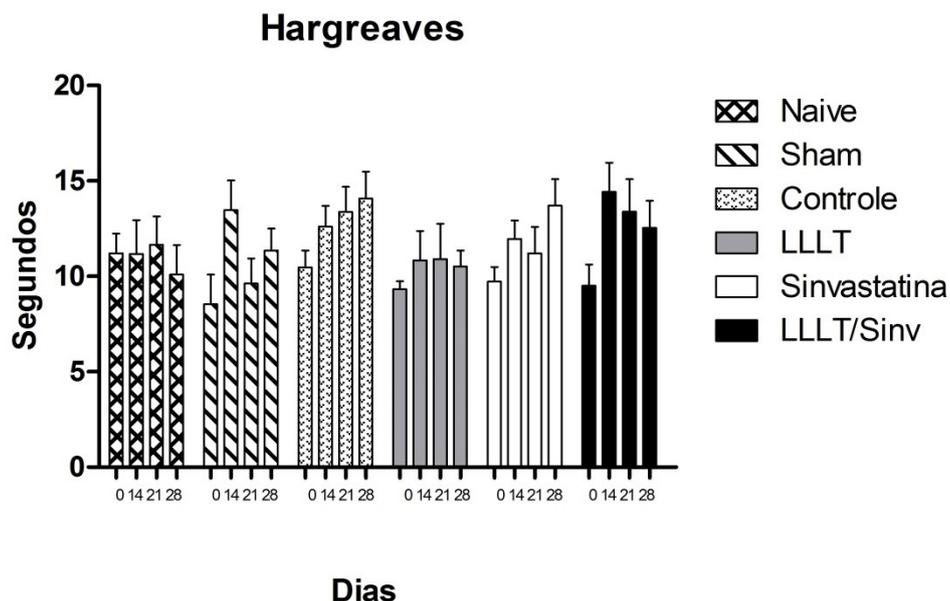


Figura 12 – Dados obtidos através da análise da hiperalgesia térmica ao calor.

4.3 HIPERALGESIA MECÂNICA

A figura 13 apresenta os dados obtidos com a análise de hiperalgesia mecânica verificada através do aparato de Von Frey® (VFH, Stoelting, Chicago, EUA). Verifica-se através da análise dos dados que não existe diferença significativa entre os meios, sendo que, os animais não apresentaram aumento ou diminuição da sensibilidade mecânica durante o experimento.

Os extremos observados se deve ao fato de que alguns dos animais avaliados nos grupos de interesse, apresentarão maior quantidade de retirada da pata quando o estímulo mecânico foi aplicado, porém, quando os dados foram rodados, não apresentou diferença significativa.

A interação dos efeitos observados nos grupos durante os dias de avaliação é de 11,02% da variância total, com um P: 0,1261. A influência dos grupos sobre os resultados é de 0,71% da variância total, com um P: 0,8765 e a influência dos dias sobre os resultados é de 2,22% da variância total, com um P: 0,2341, todas estas características são consideradas não significativas.

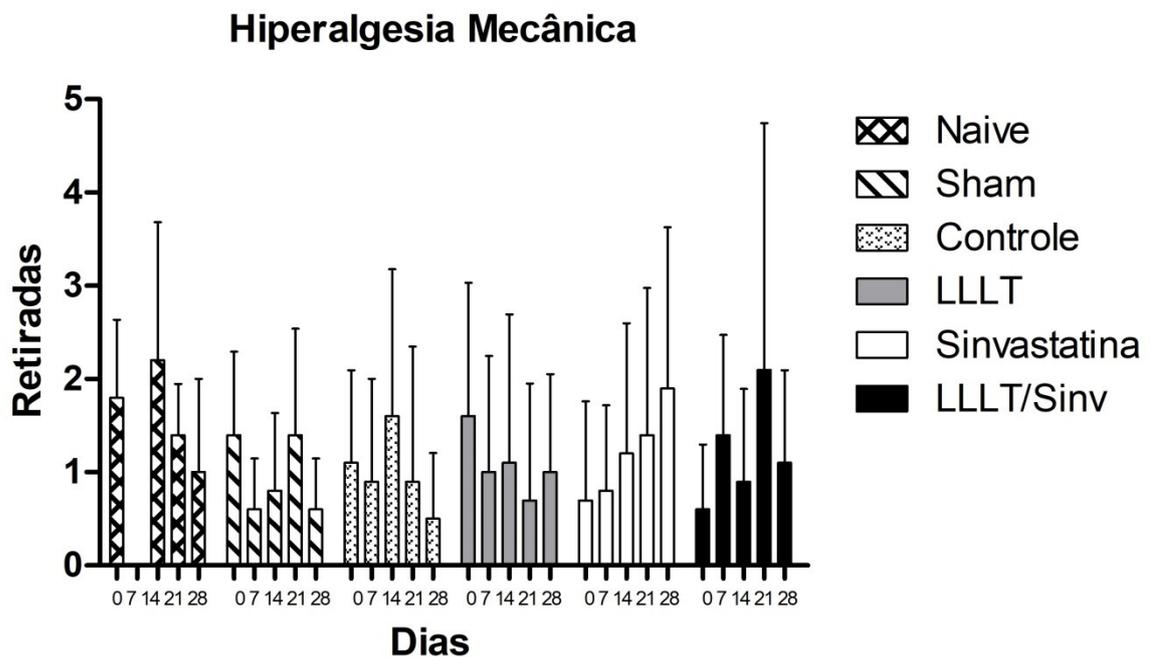


Figura 13 – Dados obtidos com a análise da hiperalgisia mecânica.

4.4 TERMOGRAFIA

A figura 14 apresenta os resultados da termografia aplicadas aos grupos experimentais. Para verificar a temperatura foi utilizado um ponto único da pata e o mesmo foi mensurado 3 vezes e a média foi calculada a fim de evitar vieses. Com base nas análises foi possível verificar que não houve diferença significativa na temperatura da pata no decorrer das avaliações ($p > 0.05$). Contudo, os dias avaliados afetaram diretamente sobre os resultados obtidos ao fim do estudo, com uma variância total de 5,35% e valor de $P = 0,0096$.

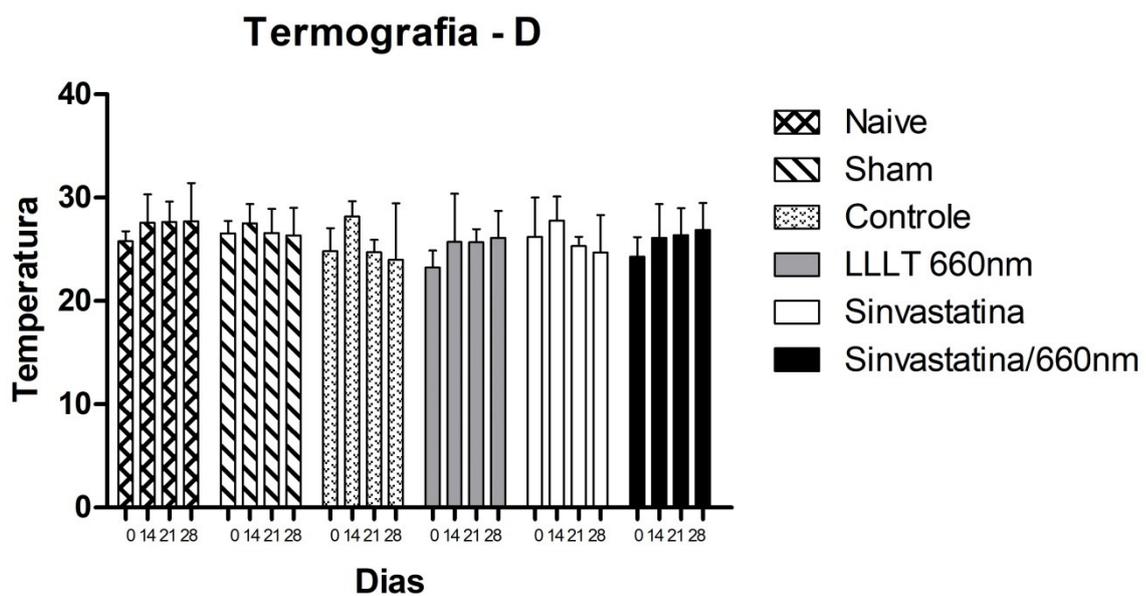


Figura 14 – Dados obtidos com a análise da termografia.

5 DISCUSSÃO

Os animais operados não apresentaram complicações pós-operatórias como autotomia e deiscência. Nenhuma perda foi registrada durante ou após a cirurgia dos animais, sendo então utilizados 50 animais como previsto anteriormente.

Durante os primeiros sete dias de lesão, observaram-se alterações biomecânicas nos animais. Os animais apresentavam dificuldades na deambulação, apresentando padrão flexor da pata, adução de metatarsos, descarga de peso na região calcânea e impossibilidade de realizar transferência de carga entre as patas. Estas características ocasionam uma aparência mais alongada da pata do animal, sendo compatível com disfunção severa do nervo ciático e evidenciando a efetividade cirúrgica. Estes dados podem ser confirmados através das análises do IEC e IFC já relatadas. Geralmente, a recuperação das lesões é estudada através de técnicas de histologia e morfometria, contudo, esses métodos não permitem um entendimento funcional do segmento avaliado, característica está presente no uso do IFC e do IEC.

Na avaliação através da termografia, hiperalgesia térmica e mecânica, os resultados não foram satisfatórios, indicando que os métodos não configuram variáveis de desfecho para avaliar a regeneração do nervo ciático.

Franco et al. (2019) relatou que durante o estresse infligido ao animal para as avaliações, ocorre resposta hipertensiva mediada pela adrenal e pelos eixos hipotálamo-hipófise-adrenal, acompanhado por vasoconstrição simpática, o que ocasiona queda transitória da temperatura nas extremidades do animal (pata, cauda), seguida de vasodilatação e então aquecimento do local. Esta resposta, quando ocasionada repetidamente, entra como mecanismo de alarme do animal, ou seja, o mesmo desenvolve a resposta fisiológica antes do manuseio propriamente dito. Sendo assim, estas alterações fisiológicas advindas do estresse animal, podem interferir diretamente sobre os resultados da termografia, dessa forma, todos os animais avaliados, sem exceções, foram submetidos aos mesmos tipos de protocolos (aplicação efetiva ou placebo do LLLT e da Sinvastatina) para garantir que todos desenvolvessem a mesma resposta durante as avaliações. No presente estudo, a termografia não obteve resultados estatisticamente significativos no aumento ou redução da temperatura local da pata em camundongos submetidos à lesão do nervo ciático, este dado pode ter sofrido influência das alterações fisiológicas do organismo animal em resposta ao estresse, mascarando o

resultado das análises, além disso, sua não efetividade pode se dar pela baixa sensibilidade da câmera e por uma acurácia muito ampla.

Os efeitos positivos da fotobiomodulação sobre o processo de regeneração nervosa estão bem estabelecidos na literatura e incluem melhora na remodelação do colágeno, modulação da expressão de fatores de crescimento, aumento no número de fibras imaturas, redução de citocinas pró-inflamatórias e angiogênese. Contudo, ainda não há padronização dos parâmetros da fotobiomodulação aplicados sobre a regeneração nervosa, o que acarreta em resultados variados dependendo do parâmetro a ser utilizado (ANDREO et al., 2018). Uma revisão sistemática realizada por Andreo et al. 2017, objetivou padronizar os parâmetros utilizados na fotobiomodulação para lesões do nervo ciático, contudo, os dados ainda não são fidedignos e necessitam de mais estudos.

Os agentes fotobiomoduladores amplamente utilizados são o laser de baixa intensidade e os diodos emissores de luz (LED), ambos possuem efeitos equivalentes e o LED vem demonstrando efeitos positivos no alívio da dor e redução de processos inflamatórios. Pigatto, Silva e Parizotto (2019) verificaram os efeitos da fotobiomodulação LED sobre a nocicepção aguda induzida por fármacos (formalina, ácido acético, cinamaldeído, capsaicina, mentol e soro fisiológico acidificado) em camundongos Swiss. A fotobiomodulação foi utilizada como um agente preventivo, sendo aplicado 30s, 60s, 90s e 120s antes das administrações farmacológicas para indução nociceptiva. Os autores verificaram que o grupo submetido a fotobiomodulação 60s antes do experimento, apresentou redução da dor nociceptiva neurogênica, assim como, da fase inflamatória. Todos os grupos apresentaram redução da nocicepção por conta da administração da irradiação, além disso, respectivamente, os grupos 30s e 90s, apresentaram efeito antiedematogênico e redução da migração de células inflamatórias. Estes dados corroboram com o presente estudo quanto à efetividade da fotobiomodulação e seus efeitos sobre a fase inflamatória da lesão, repercutindo em uma cascata de efeitos positivos para a lesão nervosa, tanto em sua regeneração como visto no presente estudo, assim como, na redução do limiar nociceptivo como visto por Pigatto, Silva e Parizotto (2019).

No presente estudo, observa-se que na análise do IEC, as diferenças significativas entre os grupos foram observadas no 7º dia de pós-operatório para todos os grupos, com valores próximos a -100, caracterizando lesão do nervo ciático. Com as

análises obtidas com o IEC, o grupo tratado com fotobiomodulação obteve resultados significativos sobre o grupo tratado com sinvastatina ($p < 0.05$), tais resultados não foram verificados nos grupos LLLT/Sinv e grupo sinvastatina isolada.

No estudo de Souza et al. (2018) verificaram os efeitos comparativos da fotobiomodulação (mesmos parâmetros utilizados no presente estudo) associados a dexametasona (anti-inflamatório glicocorticoide) e utilizarão o IEC, assim como, o IFC para verificar a regeneração funcional do nervo ciático e constataram que o grupo comparação LLLT/Dex foi mais efetivo que os demais grupos de acordo com o IEC, apresentando resultados a partir do 14º dia de avaliação. Já para as análises do IFC, os autores verificaram que o grupo LLLT isolado apresentou resultados melhores e mais significativos que o grupo LLLT/Dex para o IEC. No presente estudo, foram verificados os efeitos de um fármaco diferente, porém, administrado com o mesmo intuito do estudo de Souza et al. (2018), o de verificar sua ação isolada e em conjunto com LLLT na regeneração do nervo ciático. Contudo, a sinvastatina é um fármaco altamente utilizado e possui facilidade de acesso e preço, o que a difere da dexametasona. E assim como o estudo de Souza et al. (2018), verifica-se, de forma geral, que a fotobiomodulação foi mais efetiva na regeneração do nervo ciático de camundongos submetidos a axonotmese, quando comparado aos demais grupos utilizados.

No presente estudo, os resultados obtidos com o IFC apresentaram efeitos positivos do LLLT a partir do 21º dia de pós-operatório, enquanto que, o grupo sinvastatina e o grupo LLLT/Sinv não apresentaram resultados semelhantes quando comparado a fotobiomodulação isolada. Diferentes estudos verificaram através do IFC a sua eficácia em comprovar os efeitos positivos da fotobiomodulação sobre a regeneração nervosa. No estudo de Marcolino et al. (2013), os autores verificaram recuperação funcional nervosa utilizando dois parâmetros diferentes, 40 J/ cm² e 80 J/ cm², Akgul; Gulsov; Gulcur (2014) obtiveram recuperação da funcionalidade utilizando a fotobiomodulação 650 nm de forma tardia, ou seja, a aplicação da irradiação ocorreu 7 dias após a lesão, da mesma forma que Medalha et al. 2012 que utilizou a 660 nm a 50 J/ cm². Contudo, dos Reis et al. (2009) observaram que a fotobiomodulação aumentou a morfometria da espessura da bainha de mielina, mais não teve efeitos sobre a funcionalidade do segmento avaliado. Sene et al. (2013) verificaram que a fotobiomodulação (830 nm) não acelerou a recuperação nervosa e Dias et al. (2015) ao associar fotobiomodulação (780 nm) com a proteína do látex não encontraram resultados significativos.

Apesar de alguns estudos verificarem a não efetividade da fotobiomodulação sobre a regeneração nervosa, os efeitos advindos desta terapia são amplamente divulgados e possuem características positivas, isto pode ser verificado através de 2 revisões sistemáticas recentes que objetivaram verificar os efeitos da fotobiomodulação sobre a regeneração nervosa, assim como, padronizar os parâmetros a serem utilizados (ANDREO et al., 2017; ROSSO et al., 2018). Nas revisões de Andreo et al. (2017) e Rosso et al. (2018), apresentaram que a fotobiomodulação possui grandes resultados sobre a regeneração nervosa, contudo, os parâmetros específicos ainda não estão bem determinados.

O presente estudo verificou de forma inédita a comparação dos efeitos da fotobiomodulação conjuntamente com os efeitos da sinvastatina, um fármaco pertencente à classe dos inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) da via do mevalonato. A sinvastatina vem sendo recentemente empregada como tratamento para a regeneração nervosa devido a seus efeitos pleiotrópicos, sendo uma alternativa eficaz e de fácil acesso, para o tratamento das lesões do sistema nervoso periférico. Ciric et al. (2018) verificou os efeitos da sinvastatina e da metformina sobre as características estruturais do nervo ciático em camundongos. Em suas análises verificaram que a sinvastatina reduziu significativamente o número de fibras mielinizadas danificadas no nervo ciático dos camundongos, fator este, necessário para a regeneração nervosa. Em contrapartida, Ohsawa et al. (2016) objetivaram verificar os efeitos da sinvastatina sobre a dor neuropática e verificaram que a sinvastatina inibe a sinalização da RhoA/ROCK, responsável por ocasionar hiperalgesia e alodinia, sendo assim, a sinvastatina desempenha um importante papel contra a dor neuropática.

Esses dados corroboram com o presente estudo, onde os efeitos isolados da sinvastatina quando comparados ao grupo controle, apresentam melhora significativa a partir do 14º dia, segundo o IEC. Porém, na comparação de seus efeitos isolados com o grupo LLLT e grupo LLLT/Sinv, a mesma não obteve resultados significativos.

Nas pesquisas que utilizam a fotobiomodulação sobre a lesão nervosa, há uma grande variação dos parâmetros utilizados e poucos estudos foram realizados para verificar o efeito da sinvastatina na lesão do nervo periférico, dificultando a comparação entre os resultados e a compreensão dos mecanismos envolvidos. Assim, novos estudos são necessários para verificar o uso da fotobiomodulação e da sinvastatina na lesão nervosa periférica e comparar seus efeitos quando associados em diferentes tempos e

doses de aplicação. Além disso, estudos clínicos são necessários para traduzir os efeitos do LLLT e da sinvastatina para o modelo humano.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a fotobiomodulação se mostrou mais eficaz quando comparado ao uso isolado da sinvastatina e também em suas ações conjuntas, obtendo resultados significativos após o 21º dia de pós-operatório. A sinvastatina apresentou resultados positivos quando comparada ao grupo controle, após o 14º dia de avaliação, contudo, a comparação com os grupos terapias não foram significativas.

A lesão nervosa realizada não ocasionou hiperalgesia térmica no segmento afetado, assim como, hiperalgesia mecânica e alterações termográficas. A fotobiomodulação continua sendo a melhor escolha para lesões do sistema nervoso periférico.

7 REFERÊNCIAS

AKGUL, Tuba; GULSOY, Murat; GULCUR, Halil O.. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. **Lasers In Medical Science**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.351-357, 29 maio 2013.

AL-SHAMMARI, Ahmed Majeed; SYHOOD, Yahya; AL-KHAFAJI, Ahmed S.. Use of low-power He-Ne laser therapy to accelerate regeneration processes of injured sciatic nerve in rabbit. **The Egyptian Journal Of Neurology, Psychiatry And Neurosurgery**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.1-7, 5 jan. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s41983-018-0047-6>.

ANDRAUS, RAC. et al. LLLT actives MMP-2 and increases muscle mechanical resistance after nerve sciatic rat regeneration. **Lasers in Medical Science**, [s/i], v. 32, n. 4, p.771-778, 2017.

ANDREO, L. et al. Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury. **Lasers In Medical Science**, [s/i], v. 32, n. 0, p.2155-2165, 10 out. 2017.

ANDREO, Lucas et al. Effects of Photobiomodulation on Functionality in Wistar Rats with Sciatic Nerve Injury. **Photochemistry And Photobiology**, [s.l.], v. 0, n. 0, p.1-7, 10 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/php.13048>.

BAIN, JR; MACKINNON, SE; HUNTER, DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconstr Surg**, [s/i], v. 1, n. 83, p.129-138, jan. 1989.

BANIK, Ratan K.; KABADI, Rajiv A.. A modified Hargreaves' method for assessing threshold temperatures for heat nociception. **Journal Of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 219, n. 1, p.41-51, set. 2013.

BARBOSA, Rafael Inácio et al. Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers In Medical Science**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.423-430, 6 fev. 2010b.

BARBOSA, Rafael Inácio et al. Efeito do laser de baixa intensidade (660 nm) na regeneração do nervo isquiático lesado em ratos. **Fisioterapia e Pesquisa**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.294-299, dez. 2010a.

BAREZ, Mohammadreza Mashhoudi et al. Stimulation Effect of Low Level Laser Therapy on Sciatic Nerve Regeneration in Rat. **Journal Of Lasers In Medical Science**, [s/i], v. 8, n. 0, p.32-37, ago. 2017.

BERVAR, Marijan. Video analysis of standing — an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. **Journal Of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 102, n. 2, p.109-116, out. 2000.

BOLAND, Anna J. et al. Simvastatin Suppresses Interleukin I β Release in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated With Cholesterol Crystals. **Journal Of Cardiovascular Pharmacology And Therapeutics**, [s/i], v. 0, n. 0, p.1-9, abr. 2018.

BUCHAIM, Daniela Vieira et al. 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 In Medical Science**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.965-972, 25 abr. 2016.

CIRIC, Darko et al. Metformin exacerbates and simvastatin attenuates myelin damage in high fat diet-fed C57BL/6 J mice. **Neuropathology**, [s.l.], v. 38, n. 5, p.468-474, 19 ago. 2018.

CORSO, Claudia Rita et al. Effect of simvastatin on sensorial, motor, and

morphological parameters in sciatic nerve crush induced-neuropathic pain in rats. **Inflammopharmacology**, [s/i], v. 26, n. 3, p.793-804, nov. 2017.

DEUIS, Jennifer R.; DVORAKOVA, Lucie S.; VETTER, Irina. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Frontiers In Molecular Neuroscience**, [s.l.], v. 10, n. 284, p.1-17, 6 set. 2017.

DIAS, Fernando J. et al. Morphometric and high resolution scanning electron microscopy analysis of low-level laser therapy and latex protein (*Hevea brasiliensis*) administration following a crush injury of the sciatic nerve in rats. **Journal Of The Neurological Sciences**, [s.l.], v. 349, n. 1-2, p.129-137, fev. 2015.

DIAS, Fernando José et al. Growth factors expression and ultrastructural morphology after application of low-level laser and natural latex protein on a sciatic nerve crush-type injury. **Plos One**, [s/i], v. 14, n. 1, p.1-17, 09 jan. 2019.

DIAS, Fernando José et al. Growth factors expression and ultrastructural morphology after application of low-level laser and natural latex protein on a sciatic nerve crush-type injury. **Plos One**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-17, 9 jan. 2019.

DUN, Xin-peng; PARKINSON, David B.. Whole Mount Immunostaining on Mouse Sciatic Nerves to Visualize Events of Peripheral Nerve Regeneration. **Methods In Molecular Biology**, New York, v. 1739, n. 0, p.339-348, 15 mar. 2018.

ENDO, Takeshi et al. A Novel Experimental Model to Determine the Axon-Promoting Effects of Grafted Cells After Peripheral Nerve Injury. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, [s/i], v. 13, n. 280, p.1-12, jul. 2019.

FALLAH, Alireza et al. Clinical effectiveness of low-level laser treatment on peripheral somatosensory neuropathy. **Lasers In Medical Science**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.721-728, 10 jan. 2017.

FERNANDES, Elizabeth S. et al. 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 Research & Therapy**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-12, 11 jan. 2016.

FRANCO, Nuno Henrique et al. ThermoLabAnimal – A high-throughput analysis software for non-invasive thermal assessment of laboratory mice. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 207, n. 19, p.113-121, ago. 2019.

GALLAHER, Zachary R.; STEWARD, Oswald. Modest enhancement of sensory axon regeneration in the sciatic nerve with conditional co-deletion of PTEN and SOCS3 in the dorsal root ganglia of adult mice. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 303, n. 0, p.120-133, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.02.012>.

GUO, Qi et al. Chitosan conduits filled with simvastatin/Pluronic F-127 hydrogel promote peripheral nerve regeneration in rats. **Society For Biomaterials**, [s/i], v. 2, n. 106, p.787-799, fev. 2018.

HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.77-88, jan. 1988.

HASHMI, Javad T. et al. Role of Low-Level Laser Therapy in Neurorehabilitation. **Hhs Public Access**, [s/i], v. 12, n. 2, p.292-305, dez. 2010.

HOLANDA, VM et al. The mechanistic basis for photobiomodulation therapy of neuropathic pain by near infrared laser light. **Lasers in Surgery and Medicine** [s/i], v. 49, n. 5, p.516-524, 2017.

JEONG, Chandong et al. Exploring the In Vivo Anti-Inflammatory Actions of Simvastatin-Loaded Porous Microspheres on Inflamed Tenocytes in a Collagenase-Induced Animal Model of Achilles Tendinitis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s/i], v. 19, n. 3, p.1-15, mar. 2018.

KRYSIK, Robert; KOWALCZE, Karolina; OKOPIEŃ, Bogusław. The effect of statin therapy on thyroid autoimmunity in patients with Hashimoto's thyroiditis: A pilot study. **Pharmacological Reports**, [s.l.], v. 68, n. 2, p.429-433, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2015.11.005>.

LI, Lixia et al. Ascorbic Acid Facilitates Neural Regeneration After Sciatic Nerve Crush Injury. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, [s.l.], v. 13, n. 108, p.1-17, 21 mar. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2019.00108>.

MARCOLINO Alexandre Márcio et al. Low-intensity laser (830 nm) functional to recover of the sciatic nerve in rats. **Acta Ortopédica Brasileira**, [s/i], v. 18, n. 4, p.207-211, 2009.

MARCOLINO, Alexandre et al. Assessment of Functional Recovery of Sciatic Nerve in Rats Submitted to Low-Level Laser Therapy with Different Fluences. An Experimental Study. **Journal Of Hand And Microsurgery**, [s.l.], v. 5, n. 02, p.49-53, 25 abr. 2013.

MEDALHA, Carla Christina et al. Low-level laser therapy improves repair following complete resection of the sciatic nerve in rats. **Lasers In Medical Science**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.629-635, 19 out. 2011.

MEDINACELI, L. de; FREED, Wj; WYATT, Rj. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**, [s/i], v. 3, n. 77, p.634-643, set. 1982. MIRANDA, Hugo F. et al. Antinociception induced by rosuvastatin in murine neuropathic pain. **Pharmacological Reports**, [s.l.], v. 70, n. 3, p.503-508, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2017.11.012>.

MOATTARI, Mehrnaz et al. **Journal Of Cranio-maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 18, n. 30089-1, p.1-7, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2018.03.015>.

MOATTARI, Mehrnaz et al. Study of Transected Sciatic Nerve Repair by Biodegradable Membrane and Betamethasone in Adult Albino Wistar Rats. **Turk Neurosurg**, [s/i], v. 0, n. 0, p.1-10, 09 jun. 2017.

MUFFORD, J.t. et al. The development of a non-invasive behavioral model of thermal heat stress in laboratory mice (*Mus musculus*). **Journal Of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 268, n. 0, p.189-195, ago. 2016.

NAMAZI, Hamid et al. Simvastatin vs. L-Carnitine: An Experimental Study on Optimizing Nerve Repair. **Turk Neurosurgery**, [s/i], v. 2, n. 19, p.1-8, 13 maio 2019.

OHSAWA, Masahiro et al. Involvement of inhibition of RhoA/Rho kinase signaling in simvastatin-induced amelioration of neuropathic pain. **Neuroscience**, [s.l.], v. 333, n. 0, p.204-213, out. 2016.

ÖKMEN BM, ÖKMEN K. Comparison of photobiomodulation therapy and suprascapular nerve-pulsed radiofrequency in chronic shoulder pain: a randomized controlled, single-blind, clinical trial. **Lasers in Medical Science**, [s/i], p.1-8, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-017-2237-3>

OLIVEIRA, Victória Regina da Silva et al. Photobiomodulation induces antinociception, recovers structural aspects and regulates mitochondrial homeostasis in peripheral nerve of diabetic mice. **Journal Of Biophotonics**, [s.l.], v. 0, n. 0, p.201800110-0, 11 maio 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201800110>.

PEDRAM, Mir Sepehr et al. Therapeutic effects of simultaneous Photobiomodulation therapy (PBMT) and Meloxicam administration on experimental acute spinal cord injury: Rat animal model. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 189, n. 0, p.49-54, dez. 2018.

PELLEGATTA, Marta; TAVEGGIA, Carla. The Complex Work of Proteases and

Secretases in Wallerian Degeneration: Beyond Neuregulin-1. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, [s.l.], v. 13, n. 93, p.1-13, 20 mar. 2019.

PIGATTO, Glauce Regina; SILVA, Carolina Seabra; PARIZOTTO, Nivaldo Antonio. Photobiomodulation therapy reduces acute pain and inflammation in mice. **J Photochem Photobiol B.**, [s/i], v. 196, n. 21, p.1-10, 21 maio 2019.

REIS, Filipe Abdalla dos et al. Effect of laser therapy (660 nm) on recovery of the sciatic nerve in rats after injury through neurotmesis followed by epineural anastomosis. **Lasers In Medical Science**, [s.l.], v. 24, n. 5, p.741-747, 24 set. 2009.

ROBERTS, Sheridan L. et al. The role of p38alpha in Schwann cells in regulating peripheral nerve myelination and repair. **Journal Of Neurochemistry**, [s.l.], v. 141, n. 1, p.37-47, 13 jan. 2017.

ROSSO, Marcelie Priscila de Oliveira et al. Photobiomodulation Therapy (PBMT) in Peripheral Nerve Regeneration: A Systematic Review. **Bioengineering**, [s/i], v. 5, n. 2, p.1-12, jun. 2018.

RYU, Jung-hee et al. The attenuation of neurological injury from the use of simvastatin after spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats. **Bmc Anesthesiology**, [s/i], v. 18, n. 31, p.1-7, mar. 2018.

SENE, Giovana Almeida Leitão et al. Efeitos da laserterapia na regeneração nervosa periférica. **Acta Ortopédica Brasileira**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.266-270, 2013.

SMIT X. et al. (2004) Static footprint analysis: a time-saving functional evaluation of nerve repair in rats. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg**, [s/i], v. 38, n. 6, p.321-325, 2004.

SONG JW et al. (2017) Low-level laser facilitates alternatively activated macrophage/microglia polarization and promotes functional recovery after crush spinal cord injury in rats. **Scientific Reports**, [s/i], v. 7, n. 1, p.1-13, 2017. [7http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-00553-6](http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-00553-6)

SOUZA, Luana Gabriel de et al. Comparative effect of photobiomodulation associated with dexamethasone after sciatic nerve injury model. **Lasers In Medical Science**, [s.l.], v. 33, n. 6, p.1341-1349, 2 abr. 2018.

STASSART, Ruth M. et al. The Axon-Myelin Unit in Development and Degenerative Disease. **Frontiers In Neuroscience**, [s/i], v. 12, n. 467, p.1-22, 11 jul. 2018.

TAKHTFOOLADI, Mohammad Ashrafzadeh et al. Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm²) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers In Medical Science**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.1047-1052, 17 jan. 2015.

TOMAZONI, Shaiane Silva et al. Effects of photobiomodulation therapy and topical non-steroidal anti-inflammatory drug on skeletal muscle injury induced by contusion in rats—part 2: biochemical aspects. **Lasers In Medical Science**, [s.l.], v. 32, n. 8, p.1879-1887, 9 ago. 2017.

VIEIRA, Graziela et al. Effects of Simvastatin Beyond Dyslipidemia: Exploring Its Antinociceptive Action in an Animal Model of Complex Regional Pain Syndrome-Type I. **Frontiers In Pharmacology**, [s/i], v. 8, n. 584, p.1-13, set. 2017.

WANG, C-Z et al. Low-level laser irradiation improves functional recovery and nerve regeneration in sciatic nerve crush rat injury model. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 9., p.1-11, 2014.

XAVIER, A.m. et al. Simvastatin improves morphological and functional recovery of sciatic nerve injury in Wistar rats. **Injury**, [s.l.], v. 43, n. 3, p.284-289, mar. 2012.

Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2011.05.036>

YI, Sheng et al. Microarray and qPCR Analyses of Wallerian Degeneration in Rat Sciatic Nerves. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, [s.l.], v. 11, n. 22, p.1-12, 10 fev. 2017.

ZHANG, Yu et al. Simvastatin attenuates renal ischemia/reperfusion injury from oxidative stress via targeting Nrf2/HO-1 pathway. **Experimental And Therapeutic Medicine**, [s/i], v. 14, n. 5, p.4460-4466, nov. 2017.

ZHU, Huifeng et al. Catalpol improves axonal outgrowth and reinnervation of injured sciatic nerve by activating Akt/mTOR pathway and regulating BDNF and PTEN expression. **Am J Transl Res**, [s/i], v. 3, n. 11, p.1311-1326, 2019.

ZIAGO EKM et al. (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 in Medical Science**, [s/i], v. 32, n. 2, p.369-378, 2017.. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2126-1>.

8 ANEXO A- CEUA



Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise comparativa do efeito do laser de baixa intensidade associado a dexametasona e a simvastatina após lesão por esmagamento do nervo ciático em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 8142240317, sob a responsabilidade de **Rafael Inácio Barbosa e equipe; Rafael Cypriano Dutra** - 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 Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 05/09/2017.

We certify that the proposal "Comparative analysis of the effect of low level lasertherapy associated with dexamethasone and simvastatin after sciatic nerve injury", utilizing 96 Heterogenics mice (96 males), protocol number CEUA 8142240317, under the responsibility of **Rafael Inácio Barbosa and team; Rafael Cypriano Dutra** - 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 Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 09/05/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **09/2017** a **09/2019**

Área: **Ciências da Saúde**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **6 a 8 semanas**

N: **96**

Linhagem: **Espécie: Mus musculus/Linhagem:Swiss**

Peso: **20 a 35 g**

Resumo: Introdução: Os nervos periféricos sofrem constantes lesões, acarretando em déficit motor e sensitivo. A lesão nervosa periférica por esmagamento do nervo ciático em roedores é amplamente usada, pois ocasiona uma axonotmese, onde ocorre ruptura das fibras nervosas sem ruptura das estruturas de sustentação do nervo, facilitando a regeneração pós-lesão nervosa. Estudos demonstram a eficácia do Índice Funcional (IFC) e do Índice Estático do Ciático (IEC) na avaliação da marcha em roedores pós lesão do nervo ciático. Objetivo: Verificar os efeitos da Fotobiomodulação através do Laser de Baixa Intensidade (LBI), da dexametasona e da simvastatina na recuperação funcional do nervo ciático em camundongos submetidos à lesão por esmagamento. Métodos: Nesse estudo, serão utilizados 96 camundongos da linhagem Swiss, divididos em 8 grupos: Naive, Sham, Esmagamento, 660 nm, Dexametasona, Dex/660nm, Simvastatina e Sinv/660nm.. Para o esmagamento do nervo ciático, será utilizado um dispositivo portátil de pinça regulável de 5000g com área de esmagamento de 0,5 cm, com 10 minutos de compressão. Para o IFC e o IEC as impressões serão registradas por uma câmera digital fixada sob caixa de acrílico (20 cm x 12 cm x 9 cm). Será utilizado o software Image J ® para transformar os pixels em milímetros, para calcular os parâmetros pré-determinados na avaliação do IFC e do IEC. As imagens serão obtidas no pré-operatório e após 7, 14 e 21 dias da lesão inicial. Além disso será realizada a avaliação da hiperalgesia térmica ao calor através do aparelho de Hargreaves e a atividade locomotora espontânea no campo aberto.

Local do experimento: Departamento: Ciências da Saúde Instituto: Centro Araranguá Laboratório: Laboratório de Autoimunidade e Imunofarmacologia (LAIF) Rodovia Governador Jorge Lacerda, nº 3201 - Km 35,4. Bairro: Jardim das Avenidas. Araranguá - SC. CEP: 88906-072

Florianópolis, 31 de outubro de 2017

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina