



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE FISIOTERAPIA

LETÍCIA LEMES SASSO

**Análise comparativa da Fotobioestimulação e da Sinvastatina após lesão por
esmagamento do nervo ciático em camundongos**

Araranguá

2017

LETÍCIA LEMES SASSO

**Análise comparativa da Fotobioestimulação e da Sinvastatina após lesão por
esmagamento do nervo ciático em camundongos**

Projeto de Pesquisa apresentado ao
Curso de Graduação em
Fisioterapia, da Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial da disciplina de
Trabalho de Conclusão de Curso I.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Inácio
Barbosa.

Araranguá

2017

LISTA DE SIGLAS

AVE – Acidente Vascular Encefálico
ATP – Trifosfato de Adenosina
Akt – Proteína quinase B
AsGaAl - Arseneto de Gálio Aluminizado
AsGaInP – Arseneto de Gálio Índio Fósforo
cm² - Centímetro quadrado
cm – Centímetros
(E) - Energia Emitida
E – Experimental
g – Gramas
GAP43 - Proteína associada ao crescimento 43
HMG-COA redutase – 3-hidroxi-3-metil-glutaril- coenzima A
IEC – Índice Estático do Ciático
IFC - Índice Funcional do Ciático
IT - Espalhar intermediário dos dedos/*Intermediate toes*
J – Joules
Kg – Quilogramas
LBI – Laser de Baixa Intensidade
LAIF - Laboratório Autoimunidade e Imunofarmacologia
mg – Miligramas
ml – Mililitros
mW – Miliwatts
N – Normal
nm – Nanômetros
PL - Comprimento da pegada
PBS - Phosphate Buffered Saline/ Tampão fosfato-salino
s – Segundos
SFI - Índice Funcional do Ciático
SNP – Sistema Nervoso Periférico
SSI - *Sciatic Static Index* /Índice Estático do Ciático
TS - *Total spread*/Espalhar dos dedos

RESUMO

Introdução: Os nervos periféricos são estruturas que sofrem lesões semelhantes às observadas em outros tecidos, resultando em importantes deficiências motoras e sensoriais. A lesão provocada por esmagamento é um modelo experimental confiável, resultando em interrupção axonal, preservando o tubo neural. Estudos comprovam que a fotobioestimulação estimula fótons no citocromo C oxidase na cadeia respiratória mitocondrial modulando as espécies reativas de oxigênio e ativa a replicação do DNA mitocondrial, consequentemente aumentando os genes de resposta precoce e a expressão do fator de crescimento, induzindo a proliferação celular e alteram os níveis de óxido nítrico, e a sinvastatina aumenta a meia-vida do RNA mensageiro na síntese de óxido nítrico endotelial e ativa a via de proteína quinase Akt, resultando numa produção de óxido nítrico melhorada e também induz efeitos imunomoduladores, reduzindo a infiltração de células mononucleares no tecido lesionado. Devido a esses achados na literatura podemos concluir que os efeitos aplicação da fotobioestimulação associado a administração de sinvastatina podem auxiliar na regeneração dos nervos periféricos. **Objetivo:** Analisar o efeito comparativo da fotobioestimulação, através do laser de baixa intensidade (LBI), com comprimentos de onda de 660 nm e 830 nm, associados ou não a sinvastatina, no processo de regeneração do nervo ciático em camundongos, após a lesão por esmagamento. **Métodos:** Serão utilizados 42 camundongos adultos da linhagem *Swiss*. Os animais serão divididos aleatoriamente em 8 grupos (*sham*, controle, *naive*, laser 660nm, laser 830nm, laser 660nm/sinvastatina, laser 830nm/sinvastatina e sinvastatina) sendo submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, o nervo ciático será esmagado por uma pinça regulável de 5000g por 10 minutos. O LBI será aplicado imediatamente após a cirurgia e nos 20 dias subsequentes. Os camundongos receberão por via oral, 20 mg/kg de sinvastatina diluída em PBS estéril por 5 dias consecutivos. As avaliações dos grupos serão realizadas pré-operatório e pós-operatório nos dias 7, 14 e 21 através da atividade locomotora, hiperalgesia térmica e do registro de pegadas para análise do índice funcional do ciático e do índice estático do ciático. Espera-se que os resultados dessa pesquisa comprovem que a aplicação do LBI associado ou não a Sinvastatina contribua na melhor elucidação sobre a regeneração e recuperação funcional do nervo ciático em camundongos.

Palavras-chave: Nervo ciático. Terapia a laser de baixa intensidade. Sinvastatina.

ABSTRACT

Introduction: The peripheral nerves are structures that suffer lesions similar to those observed in other tissues, resulting in important motor and sensory deficiencies. The injury caused by crushing is a reliable experimental model, resulting in axonal disruption, preserving the neural tube. Studies prove that photobiostimulation stimulates photons in the cytochrome C oxidase in the mitochondrial respiratory chain, modulating the reactive oxygen species, and activates mitochondrial DNA replication, thus increasing the genes of early response and expression of the growth factor, inducing proliferation and alter nitric oxide levels, and simvastatin increases the half-life of messenger RNA in the synthesis of endothelial nitric oxide and activates the Akt protein kinase pathway, resulting in improved nitric oxide production and also induces immunomodulatory effects, reducing the infiltration of mononuclear cells into the injured tissue. Due to these findings in the literature, we can conclude that the effects of the application of photobiostimulation associated with the administration of simvastatin may help the regeneration of peripheral nerves.

Objective: To analyze the comparative effect of photobiostimulation through Low Level Laser Therapy (LLLT), with wavelengths of 660nm and 830 nm, associated or not to simvastatin, in the process of sciatic nerve regeneration in mice after crush injury. The injury caused by crushing is a reliable experimental model, resulting in axonal disruption, preserving the neural tube. Photobiostimulation is used in experimental studies involving peripheral nerve regeneration, as well as simvastatin. However, these studies present different methodologies, such as parameters, the location of the application, the dose and the time of treatment, thus demonstrating controversial conclusions.

Methods: 42 adult mice of the Swiss strain will be used. The animals will be randomly divided into 8 groups (sham, control, naive, 660nm laser, 830nm laser, 660nm laser / simvastatin, 830nm laser / simvastatin and simvastatin) undergoing the same surgical procedure where the sciatic nerve will be crushed by an adjustable clamp of 5000g for 10 minutes. The LLLT will be given immediately after the operation and for the next 20 days. The mice will receive orally 20mg per kg of simvastatin diluted in sterile PBS for 5 consecutive days. The evaluations of the groups will be carried out preoperatively and postoperatively on days 7, 14 and 21 through locomotor activity, thermal hyperalgesia and footprint registry for analysis of sciatic functional index and static sciatic index. It is expected that the results of this research demonstrate that the application of Low Level Laser Therapy associated or not to Simvastatin contributes in the best elucidation on the regeneration and functional recovery of the sciatic nerve in mice.

Keywords: Sciatic Nerve. Low Level Light Therapy. Simvastatin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Revisão de Literatura.....	8
1.1.1 Lesão Nervosa Periférica.....	8
1.1.2 Lesão Nervosa por Esmagamento.....	10
1.1.3 Laserterapia de Baixa Intensidade.....	11
1.1.4 Laser nas lesões nervosas por esmagamento.....	13
1.1.5 Sinvastatina nas lesões nervosas.....	16
1.1.6 Análise Funcional da Marcha: Índice Funcional do Ciático (IFC) e Índice Estático Ciático (IEC).....	18
1.2 Justificativa.....	21
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. HIPÓTESES	23
3.1 Hipótese Nula.....	23
3.2 Hipótese Alternativa.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Aspectos Éticos.....	24
4.2 Amostra e grupos experimentais.....	24
4.3 Procedimento Cirúrgico.....	26
4.4 Dispositivo de Esmagamento.....	26
4.5 Delineamento Experimental.....	27
4.6 Equipamento Emissor de Radiação Laser.....	28
4.7 Protocolo Sinvastatina.....	28
4.8 Instrumentos.....	29
4.8.1 Registros de Pegadas.....	29
4.8.2 Hiperalgesia Térmica.....	29
4.8.3 Atividade Locomotora.....	30
4.9 Análise Estatística.....	30
CRONOGRAMA	31
ORÇAMENTO	32
REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

Os nervos periféricos são estruturas que sofrem lesões semelhantes às observadas em outros tecidos, resultando em importantes deficiências motoras e sensoriais. Estima-se que a incidência de lesões traumáticas é de até 500.000 casos por ano em alguns países, 2,8% dos pacientes se tornam permanentemente incapacitados devido ao prolongamento do tempo de regeneração do nervo (BELCHIOR, 2009; BARBOSA *et al.*, 2010). Vinte milhões de americanos sofrem lesão nervosa periférica causada por lesões traumáticas. As lesões nervosas resultam em aproximadamente US\$ 150 bilhões gastos em dólares anuais de saúde nos Estados Unidos (GRINSELL; KEATING, 2014).

As lesões no Sistema Nervoso Periférico (SNP), são classificadas como neuropraxia, axonotmese e neurotmese (BARBOSA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014). No Brasil, estudo recente classificou 456 casos de lesão nervosa e mostrou que a axonotmese representa a lesão nervosa mais comum (45%) seguida por neurotmese (41%) e neuropraxia (14%), respectivamente (GIGO-BENATTO *et al.*, 2010).

As causas de lesões no SNP incluem corte, feridas, lesões por arma de fogo, traumas devido a alterações de temperatura, compressões prolongadas ou agudas, tração mecânica, infecções, toxinas, lesões traumáticas, como esmagamento total ou parcial, estiramento, avulsão e secção que causam a interrupção da transmissão de impulsos nervosos, a redução ou perda de sensibilidade e motilidade na área inervada (BARBOSA *et al.*, 2010; CAMARA *et al.*, 2011), sendo 30% destas lesões decorrentes de laceração por objetos afiados e fraturas de ossos longos (ZIAGO *et al.*, 2017).

Estas lesões podem danificar a integridade do tecido, causando importantes disfunções nas estruturas inervadas pelo nervo danificado, (BARBOSA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012), resultando em perda ou redução da sensação e atividade motora da área inervada com consequentes alterações na via nervosa e transporte axonal (OLIVEIRA *et al.*, 2012; ZIAGO *et al.*, 2017). Se a lesão não for adequadamente tratada, pode provocar déficit significativo, com danos não apenas na qualidade de vida dos pacientes, mas também no sistema estadual em casos de aposentadoria prematura por incapacidade funcional (CAMARA *et al.*, 2011).

O SNP é composto de neurônios motores e sensoriais com seus corpos celulares na medula espinhal e extensões citoplasmáticas chamadas axônios, que sinalizam com um órgão alvo distante (GRINSELL; KEATING, 2014). Os nervos periféricos são subdivididos em 3

componentes: axônios, células de Schwann e tecido conjuntivo. Cada nervo é constituído de tecido conjuntivo e componente neural. As estruturas de tecido conjuntivo dos nervos formam três camadas distintas: endoneuro (fibra nervosa), perineuro (fascículo) e epineuro (nervo), do interior para a exterior, respectivamente. Essas estruturas organizam e protegem as fibras nervosas como demonstrado na Figura 1 (CIDRAL FILHO, 2011).

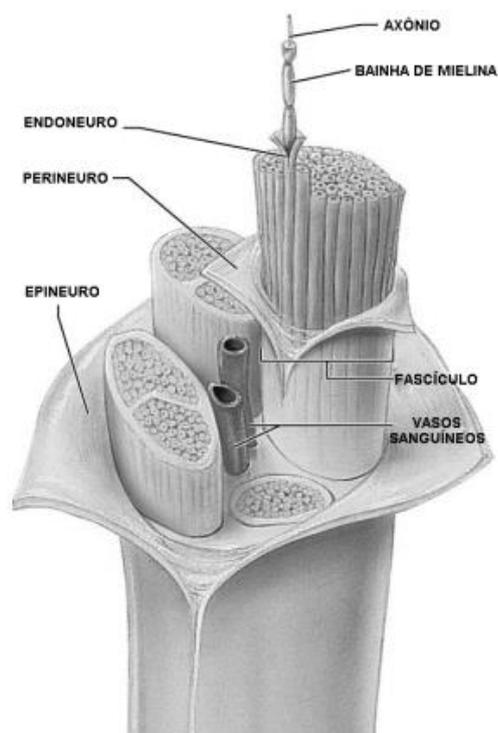


Figura 1 – Organização do nervo e seus compartimentos (CIDRAL FILHO, 2011).

A lesão provocada por esmagamento nervoso é um tipo comum de lesão nervosa que resulta em interrupção axonal induzida experimentalmente, mas preserva as bainhas conjuntivas, chamadas axonotmese (ZIAGO *et al.*, 2017). O laser de baixa intensidade (LBI) têm sido empregada para estimular a regeneração dos nervos periféricos (BARBOSA *et al.*, 2010; MARCOLINO *et al.*, 2010; MARCOLINO *et al.* 2013; WANG *et al.*, 2014; TAKHTFOOLADI *et al.*, 2015; ANDRAUS *et al.*, 2017).

De acordo com uma revisão de literatura de Gigo-benato, Geuna e Rochkind (2005), a restauração da atividade nervosa é uma prioridade da terapia com laser de baixa intensidade (LBI), um meio físico com um alto nível de resposta positiva com 80% de eficácia (ANDRAUS *et al.*, 2017).

Uma nova forma de tratamento que está sendo utilizada para recuperação de lesões de nervos periféricos são as estatinas, entre as quais está a Sinvastatina. Alguns estudos

experimentais sugerem que as estatinas podem ter valor terapêutico durante o tratamento de doenças neurodegenerativas e para a regeneração do sistema nervoso central. Embora vários estudos tenham investigado os efeitos das estatinas sobre o sistema nervoso central, poucos estudaram papel das estatinas na lesão do nervo periférico (GHOLAMI *et al.*, 2007; GHOLAMI *et al.*, 2008; XAVIER *et al.*, 2012).

A avaliação funcional tornou-se um dos métodos para estudar a regeneração nervosa periférica em modelos animais. O Índice Funcional do Ciático (IFC) é um método que usa uma plataforma na qual as pegadas do animal são impressas em uma tira de papel para análise de parâmetros tais como o comprimento da pegada (PL), o espalhar dos dedos (TS) e o espalhar intermediário dos dedos (IT). O IFC é um indicador negativo do grau de disfunção do nervo e varia de zero a -100, com zero correspondente à função normal e -100 indicando uma disfunção completa do segmento estudado (MARCOLINO *et al.*, 2013; TAKHTFOOLADI *et al.*, 2015).

O índice estático ciático (IEC), uma análise de pegada estática digitalizada é outra maneira de avaliar a recuperação da função após lesão ciática em modelos animais. Ele usa as pegadas, adquiridas quando o animal está em uma posição estática, e minimiza o viés relacionado à velocidade da marcha. No estudo de Smit *et al.* (2004), boas correlações entre o IFC tradicional e o IEC recentemente desenvolvido. Estes métodos têm a vantagem de não serem invasivos, além de mostrarem uma estreita correlação com o grau de regeneração histológica, e podem ser empregados como substituto para métodos invasivos. (TAKHTFOOLADI *et al.*, 2015).

1.1 Revisão de Literatura

1.1.1 Lesão Nervosa Periférica

Os axônios dos nervos periféricos são agrupados em feixes paralelos, conhecidos como fascículos, revestidos por bainhas de tecido conjuntivo frouxo, que fornecem suporte à regeneração axonal. O tecido que reveste cada axônio individualmente é o endoneuro, possui matriz de colágeno frouxo, na qual as fibras de colágeno irão formar as paredes de proteção dos tubos endoneurais e contém o suprimento de sangue para o nervo. Os feixes de axônios são revestidos pelo perineuro, separando as fibras nervosas em fascículos, e contendo fibroblastos, macrófagos, mastócitos, linfócitos e adipócitos. O tecido que reveste todo o nervo e que tem

como função proteger os fascículos de tramas externas é denominado epineuro, constituído de tecido conjuntivo frouxo que se estende ao longo de todo o nervo (GRINSELL; KEATING, 2014).

Os axônios são isolados eletricamente pelo endoneuro e por um complexo lipoprotéico denominado bainha de mielina. Esta é sintetizada pelas células de Schwann, as quais possuem a função crítica de suporte axonal regenerativo, servindo de via de crescimento para as fibras nervosas, além de servirem de isolantes elétricos para uma melhor condução dos impulsos nervosos. Na falta deste, o impulso é mais lento. Os nervos periféricos são alimentados por artérias que entram no tronco nervoso procedentes de vasos sanguíneos vizinhos. A rede arterial é rica em vasos colaterais, tanto em torno como no interior dos próprios nervos, resultando um sistema que apresenta resistência notável à isquemia que afeta os grandes vasos (GRINSELL; KEATING, 2014).

As lesões do nervo periférico ocorrem mais frequentemente do que as lesões da medula espinhal (ZIAGO, *et al.*, 2017). A primeira classificação de lesão nervosa foi feita por Seddon em 1947, que descreveu três graus de lesão, as quais poderiam ser classificadas em: neuropraxia, axonotmese e neurotmese (GRINSELL; KEATING, 2014).

A neuropraxia é a lesão segmentar da mielina e o axônio permanece intacto, geralmente causada por compressão, essa é uma lesão leve com perda motora e sensitiva, sem alteração estrutural, existe um bloqueio temporário de condução focal que se resolve completamente dentro de 12 semanas após a restauração da mielinização (GRINSELL; KEATING, 2014). Axonotmese é comumente vista em lesões por esmagamento, estiramento ou por percussão. Há perda de continuidade axonal, mas o tecido conjuntivo e a continuidade do nervo permanecem intactos e subsequentemente ocorre a degeneração Walleriana do segmento distal. Nesse tipo de lesão não ocorre perda de células de Schwann, e a recuperação irá depender do grau de desorganização do nervo e também da distância do órgão terminal (GRINSELL; KEATING, 2014). Por fim, a neurotmese é a transecção fisiológica e anatômica completa dos axônios e do tecido conjuntivo, com desorganização do axônio causada por uma fibrose tecidual com consequente interrupção do crescimento axonal. A recuperação espontânea é pobre sem intervenção cirúrgica. Além da classificação de Seddon, há uma outra conhecida, mas pouco utilizada na prática, a classificação de Sunderland de 1951 (GRINSELL; KEATING, 2014).

Sunderland refinou a classificação de Seddon dividindo-a em cinco graus baseado na histologia que correspondem amplamente à classificação de três níveis de Seddon, mas com um

prognóstico mais preciso dos desfechos em lesões axonotmáticas. Para Sunderland graus I e II tem recuperação completa, o grau III apresenta recuperação parcial, e graus IV e V geralmente requerem intervenção cirúrgica. A neuropraxia foi classificada como grau I. A axonotmese foi dividida em graus II, III e IV que variam de acordo com o grau da lesão. As lesões de grau V de Sunderland correspondem a neurotmese (GRINSELL; KEATING, 2014).

As lesões traumáticas dos nervos periféricos são frequentes e requerem cuidados especializados, que nem sempre produzem os efeitos desejados, levando à perda funcional de vários graus, mas muitas vezes incapacitantes, com os músculos esqueléticos alvo fortemente afetados (ZIAGO *et al.*, 2017).

1.1.2 Lesão Nervosa por Esmagamento

A lesão do nervo ciático de ratos é um modelo confiável para mimetizar diferentes tipos de lesão e métodos de tratamento, sendo a lesão por esmagamento é um dos tipos preferidos, porque ela causa ruptura das fibras nervosas sem interferir nas estruturas de sustentação do nervo o que facilita a regeneração subsequente à lesão (MONTE-RASO *et al.*, 2009).

Após uma lesão nervosa periférica os axônios e as bainhas de mielina localizadas distalmente se degeneram e sofrem ação das células de Schwann e dos macrófagos que através da degeneração walleriana ou anterógrada irão degradar toda a estrutura do axônio, proporcionando um ambiente favorável para o novo crescimento axonal (DIAS *et al.*, 2013).

Degeneração walleriana é um processo que ocorre quando uma fibra nervosa é esmagada ou seccionada, no qual a parte do axônio separada do corpo celular degenera distalmente à lesão, com infiltração de macrófagos que removem a mielina e os restos axonais. Durante este processo, a membrana basal que envolve o axônio e células de Schwann permanecem intactas formando um tubo como demonstrado na Figura 2. Dentro de 96 horas da lesão, a extremidade proximal da fibra nervosa envia brotamentos em direção ao tubo atraídos por fatores de crescimento produzidos pelas células de Schwann. Se um brotamento alcança o tubo, ele avança cerca de 1 mm por dia em seu interior, eventualmente reinervando o tecido alvo. Se os brotos não alcançam o tubo, por exemplo, porque a distância é muito grande ou devido à formação de tecido cicatricial, intervenção cirúrgica é necessária (CIDRAL-FILHO, 2011).

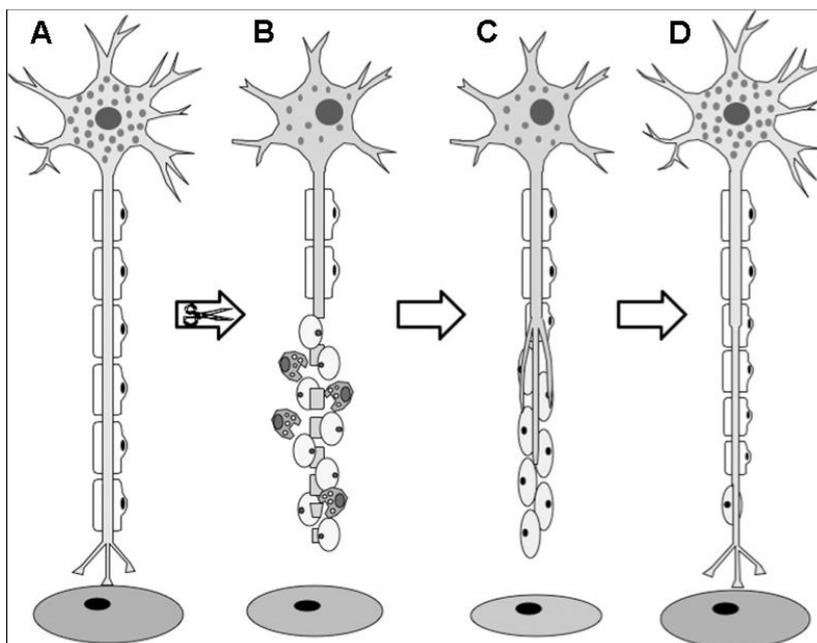


Figura 2 – Regeneração walleriana após secção nervosa. (A) fibra nervosa normal; (B) lesão por transecção das fibras e fase inicial da degeneração Walleriana; (C) Células de Schwann direcionam o crescimento axonal; (D) Regeneração axonal. (CIDRAL FILHO, 2011).

1.1.3 Laserterapia de Baixa Intensidade (LBI)

Muitos estudos entre eles Endo (2008), Belchior (2009), Barbosa *et al.* (2010), Gigo-benatto *et al.* (2010), Marcolino *et al.* (2010), Camara *et al.* 2011, Medalha (2012), Oliveira *et al.* (2012), Marcolino *et al.* (2013), Wang *et al.* (2014), Takhtfooladi *et al.* (2015) e Ziago *et al.*, (2017), foram conduzidos com o objetivo de favorecer ou acelerar a recuperação de nervos periféricos lesionados. Entre os métodos de tratamento estudados incluem LBI, cujo uso tem aumentado na última década (ZIAGO *et al.*, 2017).

A LBI utiliza luz laser de baixa potência na gama de 1-1000 mW, com comprimentos de onda que variam de 632 a 1064 nm, para estimular uma resposta biológica. Os mecanismos precisos de fotobiomodulação do LBI e seus benefícios terapêuticos não foram totalmente compreendidos. A luz infravermelha tem capacidade de fotobiomodulação significativa, pelo que seus fótons são absorvidos pela citocromo C oxidase na cadeia respiratória mitocondrial, que é o gatilho inicial da fotobiomodulação (ZIAGO *et al.*, 2017).

No entanto, observa-se frequentemente resultados conflitantes, provavelmente devido à grande variação dos parâmetros utilizados pelos diferentes pesquisadores, como comprimento

de onda, tipo de irradiação, doses e densidade energética, com resultados muito diferentes nos músculos nervoso e alvo (ANDRAUS *et al.*, 2017).

Vários autores concluíram que este tratamento promove uma influência positiva na regeneração de lesões traumáticas Endo (2008), Belchior (2009), Barbosa *et al.* (2010), Gigo-benatto *et al.* (2010), Marcolino *et al.* (2010), Camara *et al.* (2011), Medalha (2012), Oliveira *et al.* (2012), Marcolino *et al.* (2013), Wang *et al.* (2014), Takhtfooladi *et al.* (2015) e Andraus *et al.* (2017).

Os efeitos fotoquímicos e fotobiológicos do LBI ao nível celular podem induzir condições tróficas e inibir os processos inflamatórios, necessários para a regeneração dos nervos. A LBI melhora o crescimento de neurites, produção de ATP, expressão de genes e secreção de fatores neurais. (YAZDANI *et al.*, 2012; ZIAGO *et al.*, 2017). Uma revisão da literatura sobre fototerapia para reparo do nervo periférico encontrou vários comprimentos de onda (632-904 nm), tipos de lesão (esmagamento, neurografia e tubulação), tipos de amostra, duração e forma da emissão e os tipos de medição (como eletrofisiológico, morfométrico, e funcional) (TAKHTFOOLADI *et al.*, 2015).

Dados atuais mostram que a absorção de fótons pelo citocromo C oxidase na cadeia respiratória mitocondrial é o principal evento que inicia a fotobiomodulação. A atividade aumentada do citocromo C oxidase eleva a produção de adenosina trifosfato (ATP), que em feridas ou áreas com baixa perfusão sanguínea pode ativar células lesadas e distúrbios metabólicos (MORRIES; CASSANO; HENDERSON, 2015; ZIAGO *et al.*, 2017). A energia dos fótons pode modular espécies de oxigênio reativas, ativam a replicação do DNA mitocondrial, aumentam os genes de resposta precoce e a expressão do fator de crescimento, induzem a proliferação celular e alteram os níveis de óxido nítrico (HENDERSON; MORRIES; CASSANO, 2015).

Muitos estudos têm demonstrado a importância da terapia de fotobiomodulação em neurologia para o tratamento de AVE (acidente vascular encefálico), lesão cerebral traumática, doença degenerativa cerebral, lesão da medula espinhal e regeneração de nervos periféricos (HASHMI *et al.*, 2010; GOMES, DALMARCO, ANDRÉ *et al.*, 2012; ZIAGO *et al.*, 2017). O laser afeta os tecidos biológicos diferentemente de acordo com os parâmetros de uso, tais como dose, comprimento de onda, modo contínuo ou pulsado, duração do tratamento e local de aplicação. Assim, encontrar as condições ótimas para a irradiação laser é essencial na aplicação de laser na medicina. (TAKHTFOOLADI *et al.*, 2015).

1.1.4 Laser nas lesões nervosas por esmagamento

No estudo de Andraus *et al.* (2017), foram utilizados 72 ratos *Wistar*, distribuídos aleatoriamente em 6 grupos: G1/controle, G2/esmagamento sem LBI, G3/esmagamento e LBI com 35 J/cm², G4/esmagamento e LBI com 70 J/cm², G5/esmagamento e LBI com 140 J/cm², E G6/esmagamento e LBI com 280 J/cm², com 12 ratos em cada grupo. A lesão por esmagamento foi causada por uma pinça de mola ajustável com carga de 5000g e foi aplicada durante 10 minutos. Foi utilizado o laser GaAsAl 830nm, modo contínuo, potência de 100 mW, feixe de 0,0324 cm², com aplicação durante 21 dias consecutivos iniciando no 1º dia do pós-operatório, em 3 pontos com 1 cm de distância entre eles. Os animais do grupo G1 e G2 não foram submetidos a irradiação com laser. Os grupos G3 a G6 foram irradiados com as seguintes densidades de energia total emitida por ponto: G3/1,1 J, G4/2,2J, G5/4,4J e G6/8,8J. O tempo de irradiação foi: G3/11 segs., G4/22 segs., G5/44 segs. e G6/ 88 segs. Todos os grupos irradiados (G3 a G6) apresentaram resultados significativamente melhores ($p < 0,05$) em comparação com o grupo sem irradiação (G2) após 21 dias de tratamento.

Takhtfooladi *et al.* (2015), utilizaram 20 ratos adultos da linhagem *Wistar*, que foram aleatoriamente designados para dois grupos experimentais para verificação do efeito do laser de baixa intensidade na lesão por esmagamento do nervo ciático. Sendo que, o grupo controle foi submetido ao esmagamento do nervo ciático com aplicação de laser placebo e o grupo laser foi submetido à lesão com subsequente irradiação na região do esmagamento durante 21 dias consecutivos. Foi utilizado o laser AsGaInP 685 nm, potência de 15 mW, feixe de onda contínuo de 0,028 cm², fluência de 3 J/cm², com um tempo de 10s para cada ponto, sendo que, o mesmo, após 3 semanas de aplicação, foi eficaz na aceleração da regeneração do nervo ciático.

Wang *et al.* (2014), utilizaram laser de baixa intensidade AsGaAl 808 nm, com potência de 170 mW, densidade de potência de 44,7 mW/cm², fluência de 3,8 J/cm² (tempo de exposição de 67.2 s) e 15 J/cm² (tempo de exposição de 335.6 s) em lesão do nervo ciático por esmagamento em ratos. Utilizou-se 36 ratos da linhagem *Sprague Dawley* foram utilizados e divididos em 6 grupos experimentais: um grupo normal sem aplicação do laser, um grupo normal com 8 J/cm², um grupo com lesão sem aplicação do laser, um grupo com lesão com aplicação de 3 J/cm², um grupo lesão com aplicação de 8 J/cm² e um grupo com lesão com aplicação de 15 J/cm². Os ratos foram submetidos a aplicações transcutâneas consecutivas no

local da lesão e sacrificados 20 dias após a lesão por esmagamento. Os autores observaram melhorias significativas no índice funcional do ciático nos ratos submetidos com LBI tanto 3 e 8 J / cm², e aumento na espessura da bainha de mielina e nos níveis de expressão GAP43, concluindo que o laser de baixa intensidade (3 J / cm² e 8 J / cm²) é capaz de intensificar a regeneração do nervo ciático.

Marcolino *et al.* (2013), utilizaram 36 ratos da linhagem *Wistar* que foram separados aleatoriamente em quatro grupos e submetidos a irradiação com o laser AsGaAl 830 nm, potência de 30 mW, feixe de onda contínuo com tamanho de 0.116 cm², nas fluências de 10 J/cm² (E= 1.16 J e tempo de exposição de 38.66 s); 40 J/cm² (E= de 4.64 J e tempo de exposição de 154.66 s) e 80 J/cm² (E= 9.28 J e tempo de exposição de 309.33 s). O grupo 1 recebeu uma simulação de aplicação do laser; O grupo 2 foi submetido a irradiação de 10 J/cm²; Grupo 3 submetido a irradiação de 40 J/cm² e o Grupo 4 a irradiação com 80 J / cm², obtendo como resultado que os grupos submetidos a irradiação com 40 J/cm² e 80 J/cm² apresentaram efeitos positivos na aceleração da recuperação funcional do nervo.

Medalha (2012), utilizou LBI AsGaAl, contínuo, de 660 e 808 nm, com diâmetro de feixe de 0,028 cm², potência de 30 mW, densidade de energia de 10 J / cm² (0,27 J por ponto, com tempo de irradiação de 9 s) e 50 J / cm² (1,41 J por ponto, com tempo de irradiação de 47 s). Utilizou-se 50 ratos *Wistar* machos, que foram divididos em cinco grupos com 10 animais em cada grupo:(1) grupo operado simuladamente, (2) irradiação a laser de 660 nm a 10 J/cm², (3) irradiação a laser de 660 nm a 50 J/cm², (4) irradiação a laser de 808 nm a 10 J/cm² e, (5) irradiação a laser de 808 nm a 50 J/cm². O laser foi aplicado em três pontos, com foco na área nervosa danificada. A irradiação com laser foi iniciada 24 h após a cirurgia. Todos os animais completaram 15 sessões com o seguinte protocolo: aplicação do laser por 5 dias consecutivos seguido de um intervalo de 2 dias. Após o fim do tratamento, os animais foram alojados em grupo durante mais 4 meses. Utilizando o IFC os animais tratados com 660 nm a 10 e 50 J/cm² tinham melhores valores de IFC em comparação com o grupo controle e os grupos de 808 nm. Os diâmetros dos axônios e das fibras foram maiores nos animais irradiados com 660 nm a 50 J / cm² em comparação com o grupo de controle. Os animais irradiados com o laser de 808 nm a 50 J / cm² apresentam valores elevados de densidade de fibras do que os animais do controle. Os achados indicam que a LBI de 660 nm é capaz de proporcionar recuperação funcional da marcha e leva a aumentos no diâmetro da fibra após a ressecção do nervo ciático.

Barbosa *et al.* (2010), foi investigado o efeito do AsGaAl, com dois comprimentos de onda de 660 nm e 830 nm, ambos com potência de 30 mW e feixes contínuos de 0,06 cm² e 0,116 cm², respectivamente. Foram utilizados 27 ratos *Wistar*, os animais foram divididos em 3 grupos: grupo sham (simulação irradiação), grupo 660 nm (irradiação laser com fluência de 10 J / cm² de energia (E) de 0,6 J, e tempo de exposição de 20 s) e grupo 830 nm (irradiação laser com fluência de 10 J / cm² de energia (E) de 1,16 J e tempo de exposição de 38,66 s). Todos os grupos foram irradiados imediatamente após cirurgia e por mais 20 dias e o laser foi posicionado num ângulo de 90° com a pele. O nervo ciático de cada rato foi esmagado em um ponto 5 mm acima dos três ramos principais (fibular, tibial e sural). Utilizou-se um peso morto de 5.000 g durante 10 minutos durante cada procedimento de esmagamento, após o nervo foi realocado e os músculos foram suturados. A comparação dos resultados do IFC entre os grupos antes da cirurgia a 7, 14 e 21 dias e após a cirurgia mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para os grupos no 21° dia. Os resultados da análise intra-grupo mostraram diferenças no 14° dia após a cirurgia nas comparações entre grupo sham e grupo 660 nm, bem como entre grupo 660 nm e grupo 830 nm. O laser de 660 nm proporcionou recuperação precoce do nervo ciático em comparação com os outros grupos.

Gigo-Benatto *et al.* (2010), investigaram o efeito do laser de arseneto de gálio-alumínio com os seguintes parâmetros: radiação contínua, comprimento de onda: 660 ou 780 nm, potência: 40mW, densidade de energia no ponto de entrada: 10, 60 ou 120 J / cm². A lesão nervosa por esmagamento foi causada por um grampo exercendo uma força de 54N (newton), por um período de 30 segundos para criar uma lesão de esmagamento de 3 mm de comprimento. Utilizou-se 64 ratos *Wistar* que receberam irradiação de LBI transcutânea no local da lesão durante 10 dias consecutivos pós-lesão e foram sacrificados 28 dias após a lesão. Os animais foram divididos em 8 grupos: N (controle) os animais não receberam intervenção e permaneceram livres na gaiola por 28 dias, CR os animais foram submetidos a lesão por esmagamento e receberam tratamento simulado/placebo, 1 min de irradiação, CR660 (esmagamento + 660 nm; 10 J/cm²; 4J total de energia por ponto; 30 seg de irradiação), CR660 (esmagamento + 660 nm; 60 J/cm²; 24J total de energia por ponto; 1 min de irradiação), CR660 (esmagamento + 660 nm; 120 J/cm²; 48J total de energia por ponto; 2 min de irradiação), CR780 (esmagamento + 780 nm; 10 J/cm²; 4J total de energia por ponto; 30 seg de irradiação), CR780 (esmagamento + 780 nm; 60 J/cm²; 24J total de energia por ponto; 1 min de irradiação) e CR780 (esmagamento + 780 nm; 120 J/cm²; 48J total de energia por ponto; 2 min de irradiação). Foram

analisados o nervo ciático e o músculo tibial anterior. Os dados sugerem que o LBI de 660nm com densidades de energia baixas (10 J / cm²) ou moderadas (60 J / cm²) é capaz de acelerar a recuperação neuromuscular após lesão por esmagamento do nervo em ratos. O laser de 660nm com densidades de energia baixas (10 J / cm²) ou moderadas (60 J / cm²) é capaz de acelerar a recuperação neuromuscular após lesão por esmagamento do nervo em ratos.

Marcolino *et al.* (2010) investigaram os efeitos do laser de baixa intensidade (830 nm, potência de 30 mW, feixe de área de 0.116 cm²) na recuperação funcional da marcha de ratos após o esmagamento do nervo ciático. Utilizou-se 18 ratos da linhagem *Wistar* submetidos ao esmagamento do nervo ciático direito através do equipamento de peso morto e divididos aleatoriamente em dois grupos de nove ratos cada. O grupo 1 foi o controle e o grupo 2 foi irradiado com laser diodo de 830 nm com densidade de energia 40 J / cm², e energia emitida de 4,64 J em um único ponto durante 21 dias consecutivos. Após análise dos resultados verificaram melhoras significativas no Índice Funcional do Ciático no 7º e 14º dia de pós-operatório, porém não houve diferenças significativas entre os grupos após o 21º de pós-operatório. Concluíram que o laser de baixa intensidade (830 nm) foi eficaz na aceleração da recuperação da marcha nas primeiras duas semanas de aplicação do laser.

1.1.5 Sinvastatina nas lesões nervosas

As estatinas, são fármacos que diminuem o colesterol através da inibição da 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), uma enzima reguladora chave na via de biossíntese do colesterol que é necessária para a produção de mevalonato, produto intermediário na síntese de colesterol (MOST *et al.*, 2009; XAVIER *et al.*, 2012). Recentemente, foram atribuídos efeitos pleiotrópicos a esta classe de fármacos, que incluem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, imunomoduladoras e neuroprotetoras (HAYASHI *et al.*, 2005; NIESSNER *et al.*, 2006; GHOLAMI *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2009; XAVIER *et al.*, 2012). Estudos experimentais revelaram que a terapia com sinvastatina aumenta a meia-vida do RNA mensageiro na síntese de óxido nítrico endotelial e ativa a via de proteína quinase Akt, resultando numa produção de óxido nítrico melhorada (GHOLAMI *et al.*, 2007).

Gholami *et al.* (2007) e Gholami *et al.* (2008) comprovaram em seu estudo que a sinvastatina pode melhorar a regeneração do sistema nervoso periférico, baseado em um

modelo experimental de isquemia e reperfusão em lesões de nervo ciático de ratos. Os autores sugerem que os efeitos antioxidantes da sinvastatina podem ter contribuído para a recuperação funcional e morfológica do nervo ciático. No entanto, outros mecanismos podem estar envolvidos na regeneração nervosa, tais como melhorias na regeneração axonal e na modulação de respostas inflamatórias e imunológicas. A droga acelera o crescimento neuronal mesmo na presença de moléculas inibidoras da mielina em abordagens experimentais *in vitro* (HOLMBERG *et al.*, 2006; XAVIER *et al.*, 2012).

No estudo de Xavier *et al.* (2012), verificaram o efeito da sinvastatina num modelo de lesão por esmagamento do nervo ciático em ratos. Utilizou-se 40 ratos *Wistar*, divididos em 4 grupos com 10 animais em cada grupo: C/animais de controlo (não lesionados) + PBS estéril, CS/animais de controlo (não lesionados) + sinvastatina; LC/animais lesionados + PBS estéril e LS/animais lesionados + sinvastatina. O nervo foi comprimido num segmento proximal a 5 mm da sua bifurcação durante 30 s com pinças hemostáticas adaptadas a uma força constante de 20 g. Os ratos CS e LS receberam sinvastatina (20 mg/kg) diluída em PBS estéril e os animais CC e LC receberam uma quantidade igual de PBS estéril. A Sinvastatina ou PBS foi administrada após procedimentos cirúrgicos aos grupos LS e LC durante cinco dias consecutivos. As pegadas dos animais foram registadas no pré-operatório e semanalmente durante três semanas após a operação. A função do nervo ciático foi pontuada pelo IFC conforme descrito por De Medinaceli *et al.* e utilizando a fórmula descrita por Bain *et al.* Os animais foram sacrificados após 21 dias. O grupo LS apresentou maiores escores de recuperação funcional motora (IFC), após 7, 14 e 21 dias em comparação aos outros grupos. O tratamento com sinvastatina também reduziu áreas de edema no nervo ciático, e os animais do grupo LS apresentaram menos detritos de mielina e a mesma estava mais organizada em comparação com o grupo LC. Na análise do baço mostrou um aumento significativo na contagem de linfócitos sanguíneos nos grupos com sinvastatina (CS e LS) após 7, 14 e 21 dias.

Aydin, Yildirim e Erol (2013) avaliaram os efeitos antinociceptivos da sinvastatina e contribuição do óxido nítrico para o modelo de dor neuropática experimental em ratos. Foram utilizados 48 ratos machos *Sprague-Dawley* divididos em sete grupos: controle, *sham*, sinvastatina 10 mg/kg, sinvastatina 20 mg/kg, tramadol 10 mg/kg, L-NAME 10 mg/kg + sinvastatina 20 mg/kg, L-Arginina 10 mg/kg + sinvastatina 20 mg/kg. O nervo ciático foi exposto e dissecado a partir do tecido de ligação em todos os grupos menos o *sham*. Os testes de comportamento (alodinia fria, alodinia mecânica e hiperalgesia térmica) foram realizados

antes da lesão do nervo ciático e os mesmos testes foram repetidos 30 minutos após as injeções de fármaco nos dias 3, 5, 7 e 10 após lesão do nervo. Verificou-se que a sinvastatina 20 mg/kg tem efeito antinociceptivo no teste de alodinia mecânica e alodinia fria, no entanto este efeito não foi observado no teste de hiperalgesia térmica. No terceiro dia, ocorreu melhora significativa no limiar de retirada da pata no grupo L-Arginina + sinvastatina 20 mg/kg. A sinvastatina 20 mg/kg aumentou a latência de retirada da pata no décimo dia e o limiar de retirada da pata em L-NAME + sinvastatina 20 mg/kg aumentou significativamente no décimo dia do teste mecânico de alodinia. O limiar de retirada da pata aumentou significativamente no grupo tratado com tramadol 10mg/kg em relação ao grupo controle no teste de alodinia mecânica. No teste de alodinia mecânica, a sinvastatina 20 mg/kg teve efeito semelhante com 10 mg/kg de tramadol em termos de limiar de retirada da pata. No teste de alodinia fria, a sinvastatina 20 mg/kg mostrou ser mais eficaz do que o tramadol 10 mg/kg.

1.1.6 Análise Funcional da Marcha: Índice Funcional do Ciático (IFC) e Índice Estático Ciático (IEC)

A avaliação funcional tornou-se um dos métodos para estudar a regeneração nervosa periférica em modelos animais, uma vez que a descrição do Índice Funcional do Ciático (IFC) por De Medinaceli, Freed e Wyatt (1982) e De Medinaceli, Freed e Wyatt (1984), que foi posteriormente modificado por Bain, Mackinnon e Hunter (1989). O método usa uma plataforma, as pegadas são impressas em uma tira de papel para análise de parâmetros tais como o comprimento da pegada (PL), o espalhar dos dedos (TS) e o espalhar intermediário dos dedos (IT). O IFC é um indicador negativo do grau de disfunção do nervo e varia de zero a -100, com zero correspondente à função normal e -100 indicando uma disfunção completa do segmento estudado (MARCOLINO *et al.*, 2013; TAKHTFOOLADI *et al.*, 2015). As imagens serão analisadas através da seguinte fórmula como demonstrada na figura 3:

$$SFI = -38.3 \times \frac{EPL - NPL}{NPL} + 109.5 \times \frac{ETS - NTS}{NTS} + 13.3 \times \frac{EIT - NIT}{NIT} - 8.8$$

Figura 3: Índice Funcional do Ciático (MARCOLINO *et al.*, 2013; TAKHTFOOLADI *et al.*, 2015)

No qual:

SFI: Índice Funcional do Ciático

N: Normal

TS: Espalhar dos dedos

E: Experimental

PL: Comprimento da pegada

IT: Espalhar intermediário dos dedos

O índice estático ciático (IEC), uma análise de pegada estática digitalizada que economiza tempo, é outra maneira de avaliar a recuperação da função após lesão ciática em modelos animais. Ele usa as pegadas, adquiridas quando o animal está em uma posição estática, e minimiza o viés relacionado à velocidade da marcha. Além disso, o IEC melhora a aquisição de pegadas e é mais repetitivo e preciso do que o IFC. No estudo de Smit *et al.* (2004), houve boas correlações entre o IFC tradicional e o IEC recentemente desenvolvido. Estes métodos têm a vantagem de não ser invasivos, além de mostrarem uma estreita correlação com o grau de regeneração histológica, e podem ser empregados como substituto para métodos invasivos. (TAKHTFOOLADI *et al.*, 2015). As imagens serão analisadas através da seguinte fórmula como demonstrada na Figura 4:

$$SSI = \left[\left(108.44 \times \frac{ETS-NTS}{NTS} \right) + \left(31.85 \times \frac{EIT-NIT}{NIT} \right) \right] - 5.49$$

Figura 4: Fórmula do Índice Estático do Ciático (TAKHTFOOLADI *et al.*, 2015).

No qual:

E = experimental;

N = normal;

TS = *total spread* (espalhar dos dedos);

IT = *intermediate toes* (espalhar dos dedos intermediários);

SSI = *Sciatic Static Index* (Índice Estático do Ciático)

No estudo Takhtfooladi *et al.* (2015), verificaram o efeito do laser de baixa intensidade na recuperação do nervo ciático submetido a lesão por esmagamento, utilizando como métodos

de avaliação das pegadas, o IFC e o IEC. Utilizou-se 20 ratos adultos da linhagem Wistar, divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais de dez animais cada, de acordo com o procedimento a ser efetuado. Os resultados obtidos pelo IFC e IEC, mostrou que, após a lesão por esmagamento do ciático, ocorreu perda funcional em ambos os grupos no 7º dia de pós-operatório e no grupo controle no 14º e 21º dia apresentou diminuição sem diferenças significativas do índice funcional, no mesmo período o grupo a laser mostrou melhora funcional significativa quando comparado a avaliação realizada no 7º dia de pós-operatório. Dessa forma, mostrou-se que o IFC e IEC possuem confiabilidade e aplicabilidade no âmbito experimental.

Van Neerven *et al.* (2012) verificou a relação entre neurônios sensoriais e motores e o grau de recuperação funcional após a lesão do nervo ciático. Utilizaram 25 ratos fêmeas da linhagem *Lewis* e usaram como método de avaliação o *software* do IEC “Visual SSI”. Dessa forma demonstraram que o nível de recuperação funcional não está diretamente relacionado com a quantidade de neurônios sensoriais e motores.

Bozkurt *et al.* (2008) realizaram um estudo com objetivo de verificar a eficácia do IEC através da combinação com um novo *software*, chamado “Visual SSI”. Foram utilizados 24 ratos da linhagem *Lewis*, sendo um grupo composto por 16 ratos observados na sexta semana e um grupo composto por 8 ratos observados na décima segunda semana, todos submetidos a neurotome do nervo ciático. A partir disso demonstraram que a utilização de um *software* para a avaliação do IEC é altamente rentável e confiável quando verificado a regeneração nervosa pós neurotome do nervo ciático, possuindo confiabilidade na avaliação da função do nervo ciático.

Baptista *et al.*, (2006) foi verificado a confiabilidade do método IEC na avaliação funcional de camundongos submetidos a lesão do nervo ciático através da comparação com o IFC. Utilizou-se 63 camundongos machos, da linhagem *Swiss*, divididos aleatoriamente em três grupos de acordo com a lesão, onde, o grupo controle (n=21) não sofreu lesão do nervo ciático; grupo esmagamento (n=21), submetidos ao esmagamento de 1 cm do nervo ciático e grupo transecção (n=21) submetidos a transecção do nervo ciático com remoção de 2 mm do hiato. A aplicação do IFC e IEC resultaram em padrões semelhantes de função quando comparados entre os três grupos analisados. Pequenas diferenças foram observadas, concluindo que a alta correlação entre o IFC e o IEC valida o uso da análise estática para avaliar as disfunções do nervo ciático após lesão, além de ser facilmente aplicável e não requer o uso de tinta ou outros recursos que podem confundir na avaliação dos resultados e medição dos parâmetros.

1.2 Justificativa

Este estudo faz parte de uma linha de pesquisa em lesão nervosa periférica do Laboratório de Avaliação e Reabilitação do Aparelho Locomotor da UFSC- Araranguá/SC, na qual são utilizados recursos terapêuticos visando à avaliação funcional dessas lesões.

Estudos comprovam que o LBI estimula fótons no citocromo C oxidase modulando as espécies reativas de oxigênio e ativa a replicação do DNA mitocondrial, consequentemente aumentando os genes de resposta precoce e a expressão do fator de crescimento, induzindo a proliferação celular e alteram os níveis de óxido nítrico, (MORRIES; CASSANO; HENDERSON, 2015), e a sinvastatina aumenta a meia-vida do RNA mensageiro na síntese de óxido nítrico endotelial e ativa a via de proteína quinase Akt, resultando numa produção de óxido nítrico melhorada (GHOLAMI *et al.*, 2007; GHOLAMI *et al.*, 2008) e também induz efeitos imunomoduladores, reduzindo a infiltração de células mononucleares no tecido lesioando (XAVIER *et al.*, 2012). Devido a esses achados na literatura podemos concluir que os efeitos aplicação do LBI associado a administração de sinvastatina podem auxiliar na regeneração dos nervos periféricos (XAVIER *et al.*, 2012; YAZDANI *et al.*, 2012; ZIAGO *et al.*, 2017).

Devido à falta de consenso quando a forma de aplicação, tempo e parâmetros utilizados nos estudos com fotobioestimulação, nas falhas metodológicas sobre a forma de aplicação, a dose e o tempo de tratamento da sinvastatina e na falta de estudos que associam essas duas intervenções, esse estudo pretende a analisar o efeito comparativo do laser de baixa intensidade com o comprimento de onda de 660 nm, 830 nm e da sinvastatina no processo de regeneração do nervo ciático em camundongos, além da comparação da aplicabilidade entre o Índice Funcional do Ciático (IFC) e Índice Estático do Ciático (IEC).

Baseado nos resultados positivos de ambas as formas de tratamento espera se que a associação da fotobioestimulação e da sinvastatina seja eficaz na recuperação funcional do nervo ciático após a lesão por esmagamento em camundongos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito comparativo do LBI de 660 nm e 830 nm associado a Sinvastatina no processo de regeneração do nervo ciático em camundongos, após a lesão por esmagamento.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar a dose de Sinvastatina necessária para a regeneração do nervo ciático em camundongos, após a lesão por esmagamento, através da avaliação do IFC, IEC, Hargreaves e Open Field.

Comparar a aplicabilidade entre o IFC, IEC, Hargreaves e Open Field, após o protocolo do LBI e da Sinvastatina.

3. HIPÓTESES

3.1 Hipótese Nula

H_0 : A aplicação de LBI e Sinvastatina não é eficaz na regeneração do nervo ciático em camundongos.

3.2 Hipótese Alternativa

H_1 : A aplicação de LBI e Sinvastatina é eficaz na regeneração do nervo ciático em camundongos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

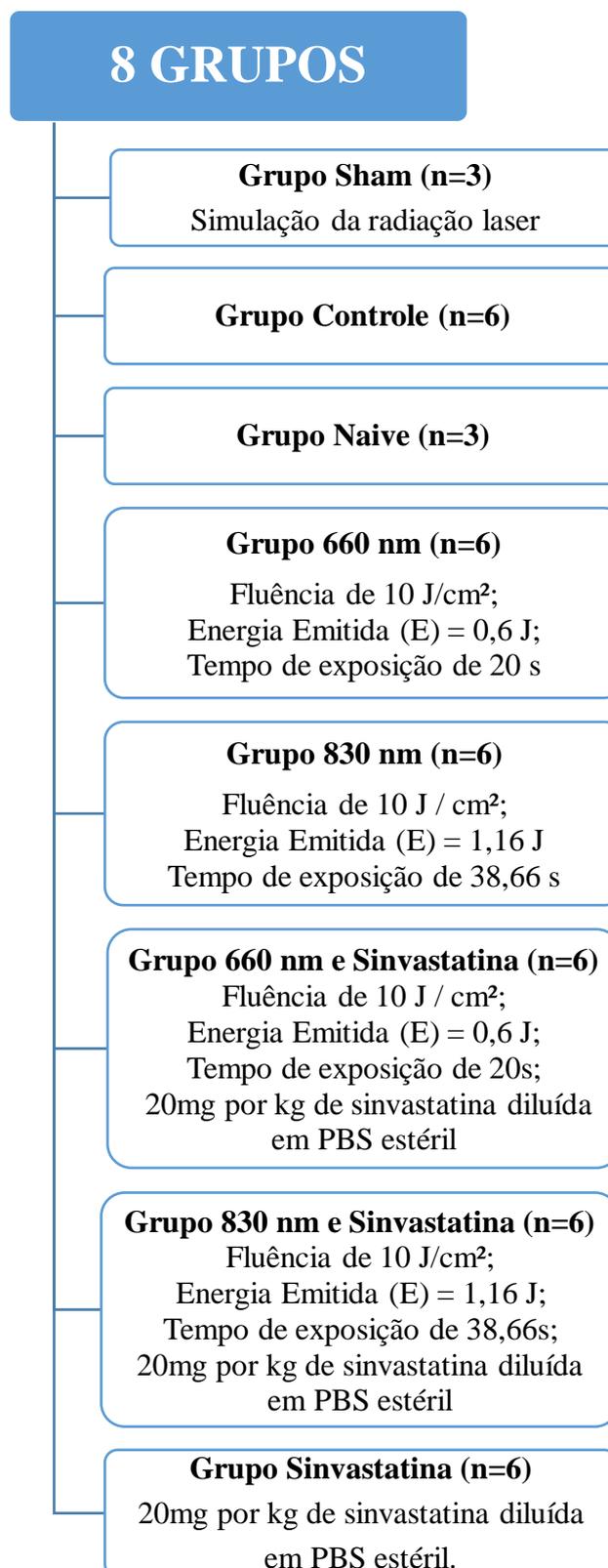
O referido projeto foi encaminhado para apreciação na comissão de ética do uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o protocolo: CEUA N° 8142240317.

4.2 Amostra e grupos experimentais

Para a realização deste estudo serão utilizados 42 camundongos, adultos, machos, aproximadamente três meses de idade, da linhagem *Swiss*, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, campus Florianópolis e alocados no Biotério Setorial da Universidade Federal de Santa Catarina, campus Araranguá.

Os procedimentos experimentais serão realizados no Laboratório Autoimunidade e Imunofarmacologia (LAIF). Os animais serão mantidos em gaiolas coletivas, com no máximo 5 animais cada, recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

Os animais serão pesados e distribuídos em 8 grupos como demonstrado no fluxograma 1, dois grupos com 3 animais e seis grupos com 6 animais cada, sendo todos submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico. A dose de sinvastatina 20 mg/kg foi baseada no estudo de Xavier *et al.* (2012).



Fluxograma 1 – Divisão dos grupos.

4.3 Procedimento Cirúrgico

Os camundongos serão pesados para o cálculo da dose necessária de anestésico para o procedimento e então anestesiados uma mistura de Ketamina a 10% (0,1ml/100g peso corpóreo) e Xylazina a 2% (0,07 ml/100 g peso corpóreo), sendo administrado por via intraperitoneal. Após a anestesia, os animais serão submetidos a tricotomia da coxa traseira direita onde ocorrerá a incisão na face lateral do membro. Após a incisão, o nervo ciático será separado e posteriormente esmagado acima da divisão dos três ramos principais (fibular, tibial e sural). Será utilizado como dispositivo de esmagamento, a pinça regulável, de 5000g, com área de esmagamento de 0,5 cm por 10 minutos de compressão. Após o esmagamento o nervo será colocado em seu leito seguido da sutura dos músculos e da pele como demonstrado na Figura 5.



Figura 5 – Passo a passo do procedimento cirúrgico realizado em camundongo: (A) acesso ao nervo ciático intacto; (B) Nervo ciático após o esmagamento; (C) Sutura da pele.

4.4 Dispositivo de Esmagamento

Para o esmagamento do nervo ciático dos camundongos, será utilizado um dispositivo portátil de pinça regulável de 5000g com área de esmagamento de 0,5 cm.

O equipamento disponibiliza resultados semelhantes ao equipamento de peso morto, amplamente utilizado nas pesquisas clínicas e com alta aplicabilidade, porém, a pinça regulável possui aplicação e manuseio mais simples em comparação com o equipamento de peso morto. Sendo que, a pinça esmagadora foi projetada para uso in loco, sem a necessidade de transporte e de adaptação do animal ao equipamento.

A carga de esmagamento aplicada pela pinça é regulável, pelo aumento ou diminuição da tensão da mola que a aciona, através de um parafuso de regulagem de calibração, feita com uma célula de carga, como demonstrado na Figura 6 (GONÇALVES *et al.*, 2010).

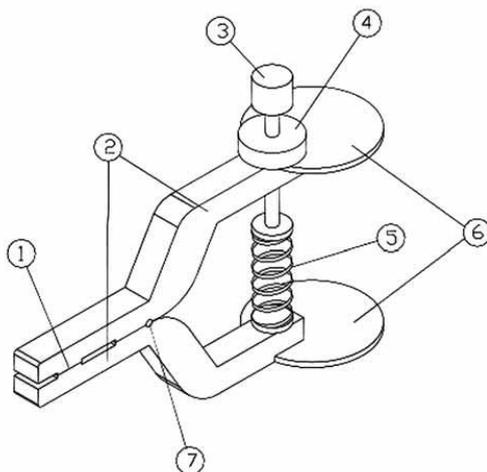


Figura 6 - Ilustração esquemática da pinça esmagadora: Base de lesão (1); haste da pinça (2); parafuso de calibração (3); porca trava (4); mola aplicadora de força; (5); base de afastamento (6); pino de articulação (7) (GONÇALVES *et al.*, 2010).

4.5 Delineamento Experimental

A radiação laser para todos os grupos será realizada em cima dos ramos do ciático no ato cirúrgico no local do esmagamento do nervo. A caneta então será posicionada a 90° em relação ao tecido cutâneo, sendo utilizada a técnica pontual com contato, imediatamente após a operação e nos 20 dias subsequentes em todos os grupos como demonstrado na Figura 7. Antes da aplicação do laser os animais serão tricotomizados diariamente.



Figura 7 – Técnica de aplicação pontual com contato utilizando o laser sobre o local de esmagamento.

4.6 Equipamento Emissor de Radiação Laser

Será utilizado um equipamento laser de diodo de Arseneto de Gálio Aluminizado (AsGaAl), com duas canetas com comprimento de onda de 660 e 830 nm, potência de 30 mW e área do feixe de 0,06 cm² (660 nm) e 0,116 cm² (830 nm), com feixe contínuo da marca Ibramed Equipamento Médicos® como demonstrado na figura 8. O equipamento foi adquirido para a realização desta pesquisa, a aferição da emissão do laser foi realizada inicialmente pelo fabricante, e após o término dos experimentos será realizada a aferição da emissão do laser no Laboratório de Avaliação e Reabilitação do Aparelho locomotor da UFSC- Araranguá/SC.



Figura 8 - Equipamento emissor do laser de baixa intensidade.

4.7 Protocolo Sinvastatina

Os camundongos receberão 20ml/kg de sinvastatina diluída em PBS estéril (XAVIER *et al.*, 2012) administrados através da via oral por gavagem 30 minutos (AYDIN; YILDIRIM; EROL *et al.*, 2013) antes da aplicação do laser, como demonstrado na Figura 9, logo após o procedimento cirúrgico e durante 5 dias consecutivos. O animal será manualmente contido e a agulha ponta-bola será introduzida lentamente na cavidade oral, através da boca e da faringe para o esôfago até o estômago (NEVES; FILHO; MENEZES, 2013).



Figura 9: Gavagem em rato (NEVES; FILHO; MENEZES, 2013).

4.8 Instrumentos

4.8.1 Impressões de Pegadas

As impressões serão registradas por smartphone, modelo Samsung Galaxy J1 Ace Duos, com 5 megapixels, posicionado abaixo da passarela de acrílico com dimensões de 43 cm de comprimento, 5,5 cm de altura e 8,7 cm de largura e ao final uma casinha de madeira. As imagens das pegadas por meio do *software Image J*® para transformar os pixels da imagem e do vídeo em milímetros, para calcular os parâmetros pré-determinados na avaliação do Índice Funcional do Ciático e do Índice Estático do Ciático. As impressões das pegadas serão obtidas no pré-operatório e após 7, 14, 21 dias da lesão inicial em todos os grupos.

4.8.2 Hiperalgisia Térmica

A avaliação da hiperalgisia térmica ao calor será realizada através do aparelho de Hargreaves, conforme previamente descrito Hargreaves (FERNANDES *et al.*, 2016), o qual possui uma fonte luminosa de infravermelho (UgoBasile, Comerio, Itália) irradiada diretamente na pata do animal. Inicialmente, os animais serão ambientados na sala de experimentação por 1 hora antes do teste. A latência de retirada da pata após a aplicação do estímulo térmico será medida automaticamente através de um sensor. O tempo de 20 segundos será determinado como *cut-off*, a fim de evitar possíveis danos teciduais na pata dos animais. Serão realizadas três medidas do tempo de resposta, as quais serão registradas em intervalos de 20 minutos. A fim

de determinar o limiar basal, todos os grupos serão avaliados antes do procedimento cirúrgico. A avaliação da hiperalgesia térmica será avaliada no dia 0,1, 7, 14 e 21 dias pós-cirurgia.

4.8.3 Atividade Locomotora

Para excluir a possibilidade de prejuízo no desempenho motor dos animais após o tratamento com o laser será avaliada a atividade locomotora espontânea no campo aberto. A atividade locomotora será avaliada em um campo aberto, que consiste de uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm e o fundo desta arena é dividido em 12 quadrados idênticos (MEOTTI *et al.*, 2006). Os camundongos serão tratados, 30 min antes de serem colocados individualmente na arena e observados por um período de 6 min. O apoio bipodal e o número de quadrados cruzados com todas as patas será contado.

4.9 Análise Estatística

Os resultados serão expressos como média \pm erro padrão médio, serão analisados através do ANOVA, seguido do teste post hoc de Bonferroni. Os valores de $p < 0,05$ serão considerados para demonstrar diferenças significativas entre os grupos. O software GraphPad Prism® 6.0 (San Diego, CA, EUA) será utilizado para as análises.

CRONOGRAMA

Quadro 1 – Cronograma do projeto

Atividade	Janeiro/Fevereiro/Março	Abril/Maio/Junho	Julho/Agosto/Setembro	Outubro/Novembro/Dezembro
Revisão bibliográfica	X	X		
Elaboração do projeto		X		
Submissão CEP		X		
Apresentação do TCC I		X		
Coleta de dados			X	
Análise dos resultados e			X	X
Discussão dos dados			X	X
Apresentação do TCC II			X	X
Submissão do Artigo				X

ORÇAMENTO

Os gastos referentes ao estudo serão de responsabilidade do pesquisador.

Quadro 2 – Orçamento do estudo

Material	Quantidade	Valor unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Folhas A4	1 resma	20,00	20,00
Fotocópias	300	0,20	60,00
Luvas	1	16,00	16,00
Animal	42	28,00	1.176,00
Ração	1	112,00	112,00
Maravalha	1	60,00	60,00
Caixas	8	80,00	640,00
Agulha/Seringa	50	0,73	36,50
Gavage	1	80,00	80,00
Sinvastatina	2 caixas	30,00	60,00
Encadernação TCC I	4	3,00	12,00
CD	1	2,00	2,00
Kit Material Cirúrgico (bisturi, fio de sutura, anestésico)	1	200,00	200,00
Total			2.474,50

REFERÊNCIAS

ANDRAUS, R. A. C. et al. LLLT activates MMP-2 and increases muscle mechanical resistance after nerve sciatic rat regeneration. **Lasers In Medical Science**, v. 32, n. 4, p.771-778, 6 mar. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10103-017-2169-y>>.

AYDIN, S.; YILDIRIM, E.; EROL, K.. Effects of Simvastatin on Experimental Neuropathic Pain Model and the Role of Nitric Oxide. **Journal Of The Analgesics**, p.5-12, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14205/2311-0317.2013.01.01.2>>.

BARBOSA, R. I. et al. Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers In Medical Science**, v. 25, n. 3, p.423-430, 6 fev. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10103-009-0750-8>>.

BAPTISTA, A. F. et al. A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse—Adaptation of the sciatic static index. **Journal Of Neuroscience Methods**, Rio de Janeiro, v. 161, n. 2007, p.259-264, nov. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.11.016>>.

BELCHIOR, A. C. G. et al. Influence of laser (660 nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers In Medical Science**, v. 24, n. 6, p.893-899, 6 fev. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10103-008-0642-3>>.

BOZKURT, A. et al. Evaluation of functional nerve recovery with Visual-SSI—A novel computerized approach for the assessment of the static sciatic index (SSI). **Journal Of Neuroscience Methods**, v. 170, n. 2008, p.117-122, jan. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.006>>.

CAMARA, C. S. et al. Histological analysis of low-intensity laser therapy effects in peripheral nerve regeneration in *Wistar* rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, n. 1, p.12-18, fev. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502011000100004>>.

CIDRAL FILHO, F. J. **Terapia por diodo emissor de luz promove antihipersensibilidade, mas falha em acelerar regeneração nervosa após lesão do nervo ciático em camundongos**. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

DIAS, F. J. et al. Application of a Low-Level Laser Therapy and the Purified Protein from Natural Latex (*Hevea brasiliensis*) in the Controlled Crush Injury of the Sciatic Nerve of Rats: A Morphological, Quantitative, and Ultrastructural Study. **Biomed Research International**, v. 2013, p.1-11, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2013/597863> >.

ENDO, C. et al. A Laserterapia de baixa intensidade acelera a regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 16, n. 5, p.305-310, 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-78522008000500011> >.

FERNANDES, E. 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**, v. 18, n. 1, p.2-12, 11 jan. 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-015-0905-x> >

GHOLAMI, M. R. et al. The Effects of Simvastatin on Functional Recovery of Rat Reperfused Sciatic Nerve. **Pakistan Journal Of Biological Sciences**, v. 10, n. 23, p.4256-4260, 1 dez. 2007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2007.4256.4260> >.

GHOLAMI, M. R. et al. The effects of simvastatin on ischemia–reperfusion injury of sciatic nerve in adult rats. **European Journal Of Pharmacology**, v. 590, n. 1-3, p.111-114, ago. 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.05.050> >.

GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; ROCHKIND, S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: A review of the literature. **Muscle & Nerve**, v. 31, n. 6, p.694-701, 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/mus.20305> >.

GIGO-BENATO, D. et al. Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve. **Lasers In Surgery And Medicine**, v. 42, n. 9, p.833-842, 25 out. 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20978> >.

GOMES, L. E. A; DALMARCO, E. M.; ANDRÉ, E. S. The Brain-Derived Neurotrophic Factor, Nerve Growth Factor, Neurotrophin-3, and Induced Nitric Oxide Synthase Expressions After Low-Level Laser Therapy in an Axonotmesis Experimental Model. **Photomedicine And Laser Surgery**, v. 30, n. 11, p.642-647, nov. 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2012.3242>>.

GONÇALVES, R. B. et al. Efeitos da aplicação do laser de baixa potência na regeneração do nervo isquiático de ratos. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 17, n. 1, p.34-39, mar. 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/s1809-29502010000100007>. >

GRINSELL, D.; KEATING, C. P. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. **Biomed Research International**, v. 2014, p.1-13, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2014/698256> >.

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

HASHMI, J. T. et al. Role of Low-Level Laser Therapy in Neurorehabilitation. **Pm&r**, v. 2, n. 12, p.292-305, dez. 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmrj.2010.10.013>>.

HENDERSON, T. A.; MORRIES, L.; CASSANO, P. Treatments for traumatic brain injury with emphasis on transcranial near-infrared laser phototherapy. **Neuropsychiatric Disease And Treatment**, p.2159-2175, ago. 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2147/ndt.s65809>>.

HOLMBERG, E. et al. Simvastatin Promotes Neurite Outgrowth in the Presence of Inhibitory Molecules Found in Central Nervous System Injury. **Journal Of Neurotrauma**, v. 23, n. 9, p.1366-1378, set. 2006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/neu.2006.23.1366>>.

LI, B. et al. Simvastatin attenuates microglial cells and astrocyte activation and decreases interleukin-1b level after traumatic brain injury. **Neurosurgery**, v. 65, n. 1, p.179-186, jul. 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1227/01.neu.0000346272.76537.dc>>.

MARCOLINO, A. M. et al. Laser de baixa intensidade (830 nm) na recuperação funcional do nervo isquiático de ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 18, n. 4, p.207-211, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-78522010000400007> >.

MARCOLINO, A. 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**, v. 5, n. 02, p.49-53, dez. 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12593-013-0096-0>. >

MEDALHA, C. C. et al. Low-level laser therapy improves repair following complete resection of the sciatic nerve in rats. **Lasers In Medical Science**, v. 27, n. 3, p.629-635, 19 out. 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-011-1008-9> >.

MEOTTI, F. C. Analysis of the Antinociceptive Effect of the Flavonoid Myricitrin: Evidence for a Role of the L-Arginine-Nitric Oxide and Protein Kinase C Pathways. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 2, p.789-796, 6 out. 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.105.092825> >.

MONTE-RASO, V. V. et al. Uma nova pinça regulável para a produção de lesões por esmagamento do nervo ciático do rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 4, p.236-238, 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-78522009000400009> >.

MOST, P. J. D. et al. Statins: Mechanisms of neuroprotection. **Progress In Neurobiology**, v. 88, n. 1, p.64-75, maio 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.02.002>>.

NEVES S.M.P.; FILHO J. M.; MENEZES E.W. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: 2013. 234 p.

NIESSNER, A. et al. Simvastatin suppresses endotoxin-induced upregulation of toll-like receptors 4 and 2 in vivo. **Atherosclerosis**, v. 189, n. 2, p.408-413, dez. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.12.022>>.

OLIVEIRA, F. B. et al. Ação do laser terapêutico e do ultrassom na regeneração nervosa periférica. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 20, n. 2, p.98-103, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1413-78522012000200008>>.

TAKHTFOOLADI, M. A. 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**, v. 30, n. 3, p.1047-1052, 17 jan. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10103-015-1709-6>>.

VAN NEERVEN, S.G. et al. Retrograde tracing and toe spreading after experimental autologous nerve transplantation and crush injury of the sciatic nerve: a descriptive methodological study. **Journal Of Brachial Plexus And Peripheral Nerve Injury**, v. 07, n. 01, p.1-7, 30 abr. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1749-7221-7-5>>.

WANG, C. et al. Low-Level Laser Irradiation Improves Functional Recovery and Nerve Regeneration in Sciatic Nerve Crush Rat Injury Model. **Plos One**, United States Of America, v. 9, n. 8, p.1-11, ago. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103348>>.

XAVIER, A. et al. Simvastatin improves morphological and functional recovery of sciatic nerve injury in *Wistar* rats. **Injury**, v. 43, n. 3, p.284-289, mar. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2011.05.036>>.

YAZDANI, S. O. et al. Effects of low level laser therapy on proliferation and neurotrophic factor gene expression of human schwann cells in vitro. **Of Photochemistry And**

Photobiology B: Biology, v. 107, p.9-13, fev. 2012. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.11.001>>.

ZIAGO, E. K. M. et al. 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**, v. 32, n. 2, p.369-378, 7 jan. 2017. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2126-1>>.