AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Avaliação *in vivo* do potencial regenerativo na degeneração Walleriana de nervos
periféricos - com a utilização de laser de baixa potência e composto
polivitamínico $\mathfrak{U}$ -NERVE®**

Luciana Crepaldi Yazawa Pistarini

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências na Área de Tecnologia Nuclear -
Materiais**

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Helena de A. Bressiani

São Paulo

2015

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Avaliação *in vivo* do potencial regenerativo na degeneração Walleriana de nervos
periféricos - com a utilização de laser de baixa potência e composto
polivitamínico 3-*NERVE*®**

Luciana Crepaldi Yazawa Pistarini

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências na Área de Tecnologia Nuclear -
Materiais**

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Helena de A. Bressiani

Versão Corrigida

Versão original disponível no IPEN

São Paulo

2015

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) pela oportunidade que me foi dada para o desenvolvimento deste estudo.

À minha orientadora Professora e Doutora Ana Helena de Almeida Bressiani pelo profissionalismo que sempre ofereceu durante toda essa jornada. A disciplina e o carinho da sua pessoa sempre estiveram presentes durante esses anos. O diálogo, a paciência e a orientação foram lapidando o trabalho para que o resultado final apresentasse um conteúdo científico e enriquecedor.

Ao Professor e Doutor Marcelo Yoshimoto por oferecer a oportunidade de desenvolver o estudo no IPEN. Pela paciência de guiar detalhes deste trabalho, de nunca poupar esforços para estar presente em vários momentos, inclusive na parte experimental.

Ao Professor e Doutor Marcos Barbosa Salles pela orientação científica e conversas para guiar propostas do trabalho. Sempre disposto a ajudar e com imensa paciência para expor seu grande conhecimento.

Ao Professor e Doutor Sérgio Allegrini Junior por oferecer fundamentos científicos e criteriosos ao trabalho, proporcionando perspectivas para estudos futuros.

À equipe do Biotério do IPEN que disponibilizou a infraestrutura e orientou sobre os cuidados diários com os animais utilizados no experimento.

À técnica Elisa e à sua equipe do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo pela orientação na confecção das lâminas histológicas para as análises em microscopia.

Aos amigos que no cotidiano dividem experiências que sempre nos ajudam, especialmente, ao Márcio Mendes que sempre disponibilizou sua atenção e orientação com grande boa vontade quando eu pedia qualquer ajuda.

Entretanto, agradeço a DEUS pela força imensa que ilumina a minha vida a cada dia. Pela sabedoria e discernimento que Ele me oferece em todos os momentos presentes, sejam eles de alegrias, decisões ou até de aceitações de situações que não são da nossa vontade.

À minha família meu imenso agradecimento, pois sem ela não conseguiria alcançar as conquistas que tive até aqui, não só do estudo mas na vida também.

Aos meus pais Elizena e Yoschio que sempre me ensinaram a ser uma pessoa digna e batalhadora. Eles sempre, sempre me deram a força, a coragem e a estrutura para chegar até aqui. São eles que iluminam meu caminho.

Agradeço a minha irmã Eliana, meu cunhado Aldy e minhas sobrinhas Anna Letícia e Mariana que sempre estiveram presentes no meu dia a dia, estimulando e vibrando com as minhas conquistas.

Ao meu esposo Henrique pela paciência, pelo carinho e pela cumplicidade durante todo o período do trabalho, sem esquecer o quanto estive presente com nossos filhos durante os momentos em que estive ausente.

Aos meus filhos: Paulo Henrique, Marcos Paulo e Arthur, presentes de Deus. A eles dedico todas as minhas conquistas. Os sorrisos que eles oferecem, as ingenuidades e as brincadeiras de criança dão o brilho e fortalecem cada dia.

EPÍGRAFE

Senhor, dê-me serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar,
coragem para mudar as que posso e
sabedoria para distinguir entre elas.

(Reinhold Niebuhr)

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO POTENCIAL REGENERATIVO NA DEGENERAÇÃO WALLERIANA DE NERVOS PERIFÉRICOS - COM A UTILIZAÇÃO DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA E COMPOSTO POLIVITAMÍNICO U^{TM} -NERVE®

Luciana Crepaldi Yazawa Pistarini

RESUMO

Nas áreas médica e odontológica existem situações clínicas e cirúrgicas que podem ter, como consequência, um dano ao tecido conjuntivo nervoso, chamado de neuropatia. O objetivo deste trabalho é avaliar terapias para tratamento das neuropatias causadas por manipulação do feixe nervoso periférico, minimizando ou eliminando sintomas causados pela lesão. O estudo foi feito em 60 ratos machos *Wistar*, com a avaliação morfológica da degeneração Walleriana e da regeneração do tecido nervoso no 15º e 30º dia após o trauma. A lesão consistiu na exposição e compressão do nervo isquiático da pata direita do animal, através de três nós consecutivos com fio de sutura e distância entre eles de ~ 2mm. Três tratamentos sobre a lesão foram comparados: o uso do biomaterial U^{TM} - NERVE®, a laserterapia de baixa potência e a associação dos dois. Os resultados histológicos revelaram que o biomaterial aumentou o processo inflamatório, mas modulou a degeneração inicial, através do surgimento de células de neoformação, favorecendo a regeneração nervosa no decorrer dos trinta dias. A laserterapia foi um tratamento favorável para a parestesia porque modulou os danos do processo de degeneração inicial e estimulou o reparo do tecido desde os 15 primeiros dias. Ao atingir os 30 dias o tecido se apresentou organizado e com uma quantidade menor de tecido neoformado quando comparado com o uso do biomaterial. A associação das terapias associou as propriedades das duas terapias, pois modulou a inflamação inicial, propiciou o aumento do número de células de neoformação do tecido nervoso e favoreceu a regeneração dos feixes nervosos nas amostras de 15 e 30 dias. Conclui-se que o não tratamento dificulta ou impede a regeneração nervosa, pois qualquer uma das terapias citadas modula os eventos desencadeados pela lesão. A associação do uso da laserterapia com o U^{TM} -NERVE® mostrou melhores resultados.

EVALUATION IN POTENTIAL OF LIVE IN REGENERATIVE WALLERIANA DEGENERATION PERIPHERAL NERVE - WITH LASER USE LOW POWER AND COMPOUND MULTIVITAMIN $\mathfrak{S}$ -NERVE®

Luciana Crepaldi Yazawa Pistarini

ABSTRACT

In medical and dental areas are clinical and surgical situations that may have, as a result, damage to the nervous tissue. This is called a neuropathy. The objective is to support therapies for treatment of neuropathies caused by manipulation of the peripheral nervous bundle, minimizing or eliminating symptoms caused by injury. The study was conducted in 60 male Wistar rats by morphological analysis of Wallerian degeneration and regeneration of nerve tissue in the 15th and 30th day after the trauma. The lesion consisted of exposure and sciatic nerve compression of the right paw of the animal through three consecutive nodes with suture and the distance between them of ~ 2mm. Three treatments on the injury were compared: the use of -NERVE® biomaterial, the low level laser therapy and their association. Histological findings revealed in samples 15 and 30 days the biomaterial increased inflammation and degeneration of the initial modulated through the cell neogenesis emergence favored nerve regeneration in the course of 30 days. Laser therapy was a favorable treatment for paresthesia because modulates the damage of the initial degeneration process and stimulates tissue repair since the first 15 days. When reaching the 30 days the tissue was organized and presented with a smaller amount of neoformed tissue when compared with the use of the biomaterial. The combination therapies of the modulated the initial inflammation, led to an increase in the number of cells neogenesis and promoted nerve tissue regeneration of nerve bundles in the samples 15 and 30 days. We conclude that no treatment hinders or prevents nerve regeneration, for any of the therapies mentioned modulate the events triggered by the injury. The association between the use of laser therapy with Nerve® proved with better results.

SUMÁRIO

	Página
1) INTRODUÇÃO	1
2) REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1) Estrutura de uma fibra nervosa normal	5
2.2) Definição de células de <i>Schwann</i>	8
2.3) Tecido nervoso e trauma	9
2.4) Processo fisiológico da degeneração Walleriana	9
2.5) Fisiopatologia da lesão	13
2.6) Características histológicas de regeneração de nervos periféricos	13
2.7) Terapias que modulam a regeneração nervosa	14
2.7.1) Laser - definição	14
2.7.1.1) Radiação ionizante e não ionizante	14
2.7.1.2) Fundamentos sobre o laser	15
2.7.1.3) Tipos de laser: de baixa e alta potência	15
2.7.1.4) Fotobiologia do tecido	16
2.7.2) Biomaterial	17
2.7.2.1) O biomaterial utilizado no estudo: composto polivitamínico β - <i>NERVE</i> ®	20
2.7.3) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	22
3) OBJETIVO	23
4) MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1) Grupos experimentais	26
4.2) Procedimento cirúrgico	28
4.3) Terapias	30
4.3.1) Composto polivitamínico β - <i>NERVE</i> ®	31
4.3.2) Laserterapia	31
4.3.3) Uso do Composto polivitamínico β - <i>NERVE</i> ® associado a laser	33
4.4) Avaliação Morfológica	33
5) RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1) Os animais	37
5.1.1) Locomoção dos animais	38

5.2) Análise Morfológica _____	40
5.2.1) Histologia do grupo G1 – controle _____	41
5.2.2) Histologia do grupo G2 – Sham _____	42
5.2.3) Histologia do grupo G3 – Neuropraxia _____	43
5.2.4) Histologia do grupo G4 – Composto Polivitamínico β - <i>NERVE</i> [®] _____	46
5.2.5) Histologia do grupo G5 – Laser _____	50
5.2.6) Histologia do grupo G6 – Laser e composto polivitamínico β - <i>NERVE</i> [®] associados _____	54
5.3) Dimensão da área da degeneração ou regeneração _____	59
6) CONCLUSÕES _____	62
ANEXOS _____	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – descreve o agrupamento dos animais de acordo com a divisão dos grupos experimentais, seu nome e procedimento executado, época da eutanásia.....27

TABELA 2 – Número de animais por grupo de acordo com a evolução cronológica do experimento.....37

TABELA 3 – valores obtidos de três distâncias, em μm , entre as extremidades de uma mesma amostra de cada grupo tratado.....60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – esquema da divisão do sistema nervoso central e periférico, com ênfase aos componentes do sistema nervoso periférico	5
FIGURA 2 – desenho de um neurônio composto por corpo celular, axônio, dendritos e terminações	6
FIGURA 3 – Microscopia óptica de um corte transversal de nervo isquiático de rato pertencente ao grupo controle G1. As estruturas, coradas com hematoxilina e eosina, foram: perineuro, endoneuro e epineuro.	7
FIGURA 4- esquema para ilustrar o sentido da degeneração do nervo e a presença de organelas – setas vermelhas - após uma lesão no tecido nervoso periférico	10
FIGURA 5 - animais acomodados na gaiola	26
FIGURA 6 - gaiolas organizadas nas prateleiras	26
FIGURA 7 – Assepsia com gaze e clorexidina 2% na região a ser incisada	28
FIGURA 8 – animal pronto para incisão e posicionado na mesa cirúrgica	28
FIGURA 9 – foto da lâmina de bisturi nº 15 da marca Solidor® utilizada no experimento para fazer a incisão no tecido externo do animal.	28
FIGURA 10 – foto da exposição do nervo isquiático da pata direita do animal após incisão e separação do tecido muscular.	29
FIGURA 11 - foto ilustrando a exposição e individualização do nervo isquiático da pata direita do animal	29
FIGURA 12 - nervo isquiático individualizado dos tecidos adjacentes	30
FIGURA 13 – foto da execução do segundo nó cirúrgico 2x2 no nervo dissecado	30
FIGURA 14 – foto A ilustra a execução do terceiro nó cirúrgico no nervo isquiático do animal; a foto B é o maior aumento dos três nós sequenciados com distância de aproximadamente 2mm entre eles.	30
FIGURA 15 –nervo submetido a neuropraxia e o biomaterial sendo adaptado ao redor do nervo na região onde foi causada a lesão	31

FIGURA 16 - recobrimento total dos nós com 3- <i>NERVE</i> ®.....	31
FIGURA 17 – representação da área irradiada na pata do animal que recebeu a terapia com laser. A linha vermelha se refere à incisão e A, B, C e D a localização da ponta do equipamento para a aplicação e entrega da radiação.....	32
FIGURA 18 – realizando a aplicação do laser na região operada nos animais do grupo G6 após sutura final do tecido externo.....	33
FIGURA 19 – dissecação para remoção do fragmento do nervo isquiático do animal envolvendo uma distância de 1 cm a mais tanto do coto proximal e distal.....	34
FIGURA 20 – micrótomo da marca JUNG pertencente ao Instituto de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo	35
FIGURA 21 – imagens das amostras do grupo G3 preparadas para microscopia de varredura. A imagem A representa a amostra desidratada e a B representa as amostras recobertas com ouro.....	35
FIGURA 22 – foto de animal do grupo G3 com comprometimento motor da pata direita logo após o ato cirúrgico	38
FIGURA 23 – esquema para ilustrar o fragmento removido para a análise histológica	40
FIGURA 24 - imagem de microscopia óptica de um corte longitudinal do grupo G1 revelando feixe íntegro, onde se observa a continuidade das fibras e feixes com a presença de vasos sanguíneos íntegros no mesmo sentido.	41
FIGURA 25 – Imagem A - fragmento do nervo isquiático de rato como parâmetro de normalidade, com perineuro íntegro, sob MEV. Imagem B mostra a parte interna com visão longitudinal dos fascículos do nervo isquiático do grupo de animais preservados. Os fascículos possuem um envoltório de tecido conjuntivo rico em vasos denominado de epineuro.	42
FIGURA 26 – Imagem da amostra do grupo G2 após 15 dias do procedimento cirúrgico. Há tecido muscular (TM) e tecido adiposo (TA) ao redor do feixe íntegro	43
FIGURA 27 – Imagens obtidas por microscopia óptica de uma amostra do grupo G3 na eutanásia de 15 dias. As imagens A, B, C revelam a descontinuidade do feixe devido a lesão causada pelos três nós consecutivos (indicados pelas setas). O coto proximal (A) se apresenta com espaços entre os fascículos, o distal (C) apresenta espaços vazios de degeneração.	44

FIGURA 28 – Imagens de microscopia óptica das amostras do grupo G3 com eutanásia de trinta dias. A imagem A é um corte longitudinal da área da lesão (seta preta) demonstrando a destruição e a descontinuidade das fibras nervosas, a imagem B é um corte transversal do coto distal com desorganização dos fascículos e infiltrado inflamatório. O perineuro está desorganizado em ambas as imagens.45

FIGURA 29 – imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostra do grupo G3 revelando nas imagens A e B a destruição da camada externa (seta) do coto proximal e distal respectivamente, em animal eutanasiado após quinze dias; sendo as imagens C e D a destruição da camada externa (seta) também dos cotos proximal e distal em animais eutanasiados após trinta dias. ...46

FIGURA 30 – gráfico da citotoxicidade do composto polivitamínico $\tilde{\Omega}$ -NERVE®...47

Figura 31 – Microscopia óptica da amostra do grupo G4. A imagem A ilustra o coto proximal e a seta indica a área do primeiro nó, a imagem B indica com a seta a área do segundo nó e, a imagem C a desorganização do coto distal. O infiltrado inflamatório (I) está presente em todos os cortes.47

FIGURA 32 – Imagem em microscopia óptica do grupo G4 da região da lesão causada pelo primeiro nó, referente ao coto proximal. Há espaços vazios (VAZIO) caracterizando a degeneração, presença de vasos sanguíneos (V), área de neoformação (NEO) iniciando uma organização das fibras (setas vermelhas) e, com coloração rosada o tecido conjuntivo (TC)48

FIGURA 33 – microscopia óptica de amostra do grupo G4 com eutanásia de 30 dias, A imagem A representa o coto proximal e a imagem B o coto distal.....49

FIGURA 34 – imagens das amostras em microscopia eletrônica de varredura do grupo G4. As setas brancas indicam a região dos nós, as setas pretas os cotos. Imagens A e B são imagens de eutanásia de quinze dias sendo que o coto distal apresenta desorganização da camada externa; as imagens C e D são das amostras com eutanásia de trinta dias, com destruição do epineuro no coto proximal na imagem C e características de regeneração do coto distal em D, pois a camada externa da estrutura apresenta-se com continuidade.....49

FIGURA 35 – corte histológico do grupo G5. A imagem A representa o coto proximal e a região do primeiro nó, a imagem B representa a região do segundo nó e, a imagem C representa o coto distal com maior desorganização do feixe. Em todas as imagens A, B e C um tecido inflamatório abundante circunscreve as três regiões da lesão.....50

FIGURA 36 - imagem de microscopia óptica do grupo G5. Em maior aumento a histologia desta amostra demonstra a neoformação na região intermediária da lesão referente ao segundo nó.....51

FIGURA 37 – imagem de microscopia de luz de um corte longitudinal do grupo G5 após 30 dias do procedimento onde os feixes revelam uma organização e direcionamento das fibras revelando a sua neoformação. A região onde foi dado o nó se apresenta com fechamento total.51

FIGURA 38– Imagens de microscopia eletrônica de varredura de uma estrutura do grupo G5. A imagem A e B são fotos sequenciadas envolvendo o coto proximal em A, o segmento intermediário e o segundo nó. Na figura B temos o coto distal. As imagens C e D se referem a microscopia eletrônica de varredura de um segmento do grupo G5 após 30 dias da cirurgia. A imagem C apresenta a continuidade da camada externa exibindo apenas uma área marcada pela região do nó. Já a imagem D demonstra uma pequena área de rompimento do perineuro, mas uma integridade da estrutura.....52

FIGURA 39 - Imagem de microscopia óptica de cortes referentes à amostra do grupo G6 que sofreram eutanásia com 15 dias. As imagens A, B e C são sequenciadas e se referem aos nós (seta preta) do coto proximal para distal, o tecido inflamatório (TI) presente na região das lesões, ilhas de neoformação indicadas pela seta vermelha.....55

FIGURA 40 - Imagem de microscopia óptica de uma amostra do grupo G6, com a presença de inúmeros vasos sanguíneos e tecido conjuntivo espesso corado em rosa55

FIGURA 41 – Cortes referentes a eutanásia de 30 dias. Imagens A e B revelam ilhas de neoformação, onde em A a lesão já se apresenta com as fibras organizadas fechando a área vazia da degeneração e a imagem B as ilhas de neoformação se apresentam bem definidas.56

FIGURA 42 – imagens de microscopia eletrônica de varredura com amostras do grupo G6. As setas brancas indicam a região dos nós, sendo que a imagem A representa a integridade do epineuro do coto proximal de uma amostra que sofreu eutanásia com quinze dias; a imagem B é referente ao coto distal da mesma amostra que apresenta o epineuro com áreas de descontinuidade; a imagem C representa o coto proximal da amostra deste grupo, com áreas de integridade e descontinuidade do epineuro na eutanásia de trinta dias; a imagem D desta amostra apresenta o epineuro com características de áreas de descontinuidade e reparo do coto distal na eutanásia de trinta dias.....57

FIGURA 43 – imagem de microscopia óptica da amostra do grupo G6 após trinta dias do procedimento cirúrgico. A imagem é um corte transversal próximo ao coto

proximal com a presença de vasos sanguíneos e fascículos em reorganização. Ilhas de neoformação são identificadas pelas setas vermelhas.57

FIGURA 44 – Esquema para visualização da tomada das três medidas consecutivas no mesmo fragmento.....59

FIGURA 45 – imagem de microscopia óptica de uma amostra do grupo G4. Os traços em preto são as distâncias medidas entre as duas extremidades da lesão referente a um corte longitudinal.....59

FIGURA 46 – Gráfico da distância média transversal de uma mesma amostra de cada grupo para quantificar a região da regeneração do tecido nervoso na região da lesão. Os dados das medidas e desvio padrão estão na TABELA 3.60

LISTA DE SIGLAS

AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato
BMPb	<i>Bone Morphogenetic Bovine Protein</i> Proteína Óssea Morfogenética Bovina
CEUA	Comissão de ética no Uso de Animais
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations.</i>
GAP	<i>Growth- associated protein</i> Proteína associada ao crescimento
IPEN	Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares
LASER	<i>Light Amplification By Stimulated Emission of Radiation</i> Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NF-Kb	Factor Nuclear Kappa B Fator Nuclear Kappa B
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> Fator de Crescimento Neural
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico

INTRODUÇÃO

No cotidiano da área médica e odontológica situações clínicas ou cirúrgicas podem gerar lesões em nervos periféricos. Neste capítulo são apresentadas situações que possam causar essas lesões e a descrição do processo fisiológico presente no decorrer da degeneração do nervo. São apresentadas opções de tratamento para regenerar o tecido ou minimizar as consequências dessas manipulações.

1) INTRODUÇÃO

Na área médica em geral, ou na Odontologia especificamente, são vivenciadas situações clínicas e cirúrgicas que envolvem a manipulação do tecido nervoso periférico¹.

A origem do processo da degeneração nervosa pode ser um acidente sofrido pelo paciente ou mesmo por uma manipulação necessária próxima ou direta na estrutura desse tecido. Assim, danos podem surgir e gerar sintomas desagradáveis ao paciente. Os sintomas neurossensoriais ou neuromotores geram desconforto, que exige do profissional, iniciativas terapêuticas para tratamento de cura ou minimização da queixa presente².

Com isto, terapias são elaboradas e estudadas para tratamento ou a minimização de sintomas consequentes desta manipulação. As lesões neurossensoriais causadas no tecido nervoso são estudadas neste experimento, como neuropatias, especificamente a parestesia³.

Existem procedimentos cirúrgicos nas diversas áreas médicas e odontológicas que exigem do profissional muita precisão e habilidade, pois na execução são manipuladas estruturas nervosas que podem levar à parestesia temporária ou permanente. Alguns exemplos: cirurgias de terceiro molar, traumatismos da face, implantes odontológicos próximos a nervos e, até mesmo cirurgias específicas como a lateralização de nervo alveolar inferior⁴. Esta última refere-se à instalação de implantes dentais quando não há estrutura óssea em altura suficiente para a inserção de implantes em mandíbula posterior, sendo necessária a manipulação do nervo, afastando-o para a colocação do implante.

Qualquer manipulação do feixe vaso-nervoso pode levar a um dano tecidual que comprometa a integridade das fibras nervosas e a condução de informações ao longo desta estrutura. Essa manipulação é classificada como mecânica, mas causas químicas podem levar a neuropatias, devido à toxicidade do material. Exemplos disso são os sais anestésicos quando associados a vasoconstritores⁵, ou a presença de material obturador endodôntico⁶ em contato com estrutura tecidual nervosa. As consequências de uma neuropatia podem ser desde a destruição da bainha de mielina, até a ruptura total do nervo, ambas podendo levar a parestesia.

A parestesia refere-se a sensações cutâneas subjetivas (ex: frio, calor, formigamento, pressão, etc.) que são vivenciadas espontaneamente na ausência de estimulação⁷. O diagnóstico da parestesia crônica é baseado na determinação das sensações de sensibilidade, formigamento, dormência e outras, segundo testes clínicos no paciente. O histórico médico da pessoa, o exame físico e testes laboratoriais são essenciais para este diagnóstico.

Para compreender essa análise clínica no paciente é de conhecimento que no estudo histológico haverá evidências da degeneração Walleriana, pois dentro de 24 horas após o trauma a degeneração dos axônios e das suas bainhas de mielina já estão presentes. O material resultante da degeneração da mielina e dos axônios tende a formar enovelados de membranas conhecidas como figuras de mielina. São encontradas tanto no citoplasma das células de Schwann como em macrófagos que afluem ao local para auxiliar na remoção de debris⁸. A evolução da degeneração é fator determinante para propiciar ou comprometer a regeneração que irá se desencadear. Então, a intervenção terapêutica nesta cascata de eventos da degeneração irá determinar o sucesso, ou não, da regeneração do tecido conjuntivo nervoso.

O tratamento apropriado para a parestesia depende do diagnóstico preciso da sua causa, do tempo de exposição do nervo e do tempo que a lesão se iniciou. O prognóstico também depende da severidade das sensações e das condições sistêmicas do paciente. Sabendo que esta situação está presente no cotidiano da clínica odontológica e médica, o estudo proposto foi feito para coletar resultados que possam embasar terapias que proporcionem um melhor prognóstico para o paciente em menor tempo.

A proposta deste trabalho é avaliar a degeneração Walleriana de nervos periféricos e o potencial regenerativo de terapias aplicadas no tecido nervoso de 60 ratos machos *Wistar*. A lesão foi causada no nervo isquiático da pata direita dos animais e grupos foram tratados com laserterapia de baixa potência, com o uso do composto polivitamínico 3-*NERVE*®⁹ e com a associação das duas terapias. As análises utilizadas são microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV), juntamente com a avaliação da capacidade de locomoção (claudicar) dos animais. Os períodos de análise foram de 15 e 30 dias após a data da lesão.

REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo são abordados conceitos sobre o tecido nervoso periférico e suas características de normalidades, situações que possam levar a lesões da estrutura e como ocorre esse processo da degeneração Walleriana. Alternativas de tratamento são apresentadas: o uso da laserterapia de baixa potência, do composto polivitamínico $\mathfrak{U}$ -*NERVE*® e a associação das mesmas na regeneração nervosa.

2) REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo são abordados conceitos que definem o tecido nervoso central e periférico, características morfológicas do tecido nervoso periférico comparadas entre a normalidade e a neuropraxia e, opções de tratamento utilizando o laser de baixa potência, o composto polivitamínico $\mathfrak{Z}$ -NERVE® e a associação de ambos.

2.1) Estrutura de uma fibra nervosa normal

Para compreender o processo da degeneração nervosa é necessário estabelecer conceitos de normalidade do tecido referido. Esta revisão literária descreve o sistema nervoso e a fibra nervosa normal e, em seguida, os eventos que sucedem uma lesão.

O Sistema Nervoso é anatomicamente dividido em Sistema Nervoso Central (SNC), formado pelo encéfalo e pela medula espinhal, e Sistema Nervoso Periférico (SNP), formado pelos nervos e gânglios nervosos, FIG.1. A célula essencial neste sistema é o neurônio.

FIGURA 1 – esquema da divisão do sistema nervoso central e periférico, com ênfase aos componentes do sistema nervoso periférico

Os neurônios são células responsáveis pelos impulsos nervosos, altamente especializadas, dotadas de um corpo celular e numerosos prolongamentos citoplasmáticos denominados neurofibras ou fibras nervosas, FIG.2. Eles têm a capacidade de serem estimulados por substâncias químicas

(neurotransmissores) ou estímulos elétricos geralmente originados em outras células, gerando um potencial de ação ("impulso nervoso").¹⁰

FIGURA 2 – desenho de um neurônio composto por corpo celular, axônio, dendritos e terminações¹¹

O corpo celular do neurônio contém um núcleo grande e arredondado. As mitocôndrias são numerosas e o ergastoplasma, bem desenvolvido. Os prolongamentos do neurônio podem ser de dois tipos:

- dendritos: ramificações que têm a função de captar estímulos;
- axônio: é o prolongamento da célula nervosa (varia de frações de milímetro até cerca de um metro) que transmite os impulsos nervosos.

A membrana celular do neurônio separa dois ambientes que apresentam composições iônicas próprias: o meio intracelular (citoplasma), onde predominam íons orgânicos com cargas negativas e potássio; e o meio extracelular, onde predominam sódio e cloro. As cargas elétricas dentro e fora das células são responsáveis pelo estabelecimento de um potencial elétrico na membrana e o movimento de íons através da membrana permitem alterações deste potencial: íons só atravessam a membrana através de canais iônicos, segundo o gradiente de concentração. Os axônios tipicamente possuem canais iônicos de sódio (Na) e potássio (K), enquanto o corpo celular, dendritos e terminações axonais possuem um grande número de canais químicos. O tipo de resposta obtido por um transmissor depende do tipo de canal associado que é ativado por ele. Os canais iônicos são formados por proteínas e caracterizam-se pela seletividade e, alguns deles, pela capacidade de fechar e abrir¹².

Os nervos espinhais são formados por conjuntos de axônios que emergem do corno anterior da medula espinhal (motores) e do gânglio da raiz dorsal (sensitivos), onde estão seus corpos celulares. O axônio é a região do neurônio responsável pela condução do estímulo nervoso tanto no sentido centrípeto (*inputs* sensoriais) quanto no sentido centrífugo (*outputs* motores). Os conjuntos de axônios são envoltos por membranas conjuntivas que circundam todo o nervo - epineuro; feixes de fibras - perineuro e cada fibra individualmente – endoneuro, FIG.3. As bainhas conjuntivas são essenciais para a proteção da fibra nervosa e estão orientadas de forma a limitar o estiramento mecânico do nervo tanto por movimentos do corpo, como por forças externas aplicadas sobre ele. Sua integridade é importante nos processos de regeneração nervosa¹³.

FIGURA 3 – Microscopia óptica de um corte transversal de nervo isquiático de rato pertencente ao grupo controle G1. As estruturas, coradas com hematoxilina e eosina, foram: perineuro, endoneuro e epineuro.

Acompanhando os axônios do sistema nervoso periférico, estão as células de Schwann, que ao longo do desenvolvimento, elegem axônios de maior calibre e se enrolam ao seu redor formando a bainha de mielina. À reunião de um axônio com uma célula de Schwann formadora de mielina dá-se o nome de fibra mielínica. Grupos de axônios de menor calibre são envolvidos por células de Schwann que, neste caso não irão formar mielina, constituindo as fibras amielínicas. A mielina é um componente morfofuncional importante, pois está diretamente relacionada à velocidade de condução do estímulo elétrico do nervo¹⁴, axônios mais calibrosos conduzem mais rapidamente e, por sua vez, o calibre do axônio é diretamente proporcional à espessura da bainha de mielina.

Os axônios são inteiramente dependentes dos seus corpos celulares para sobreviver; pois não sintetizam proteínas; eles são constituídos de axolema e axoplasma. Axolema: é a membrana celular do neurônio constituída de várias proteínas integrais e periféricas, como, proteínas de canais, enzimas e moléculas de adesão além de fosfolipídios. O citoplasma do axônio, denominado axoplasma, é constituído por citosol, organelas e inclusões axoplasmáticas, apresenta organelas citoplasmáticas comuns a todos os tipos celulares à exceção de retículo endoplasmático granular, ribossomos livres, complexo de Golgi (presentes apenas no corpo celular, nos dendritos e no cone de implantação do neurônio). A ausência do retículo endoplasmático rugoso torna o axônio inábil para a síntese de proteínas, indispensável à sua sobrevivência. As proteínas e organelas produzidas no corpo celular se locomovem ao longo do eixo do axônio através de um complexo sistema de transporte mediado por componentes do citoesqueleto¹⁵.

Das estruturas axoplasmáticas, a mais eminente é o citoesqueleto, que determina o calibre, padrão de crescimento, estabiliza o axolema e promove a dinâmica básica necessária ao transporte axoplasmático tanto anterógrado (do corpo celular para a periferia) quanto retrógrado (da periferia para o corpo celular). Ele é formado de microtúbulos (25 μm de espessura), neurofilamentos (10 μm de espessura) e microfilamentos de actina (4 a 6 μm de espessura)¹⁶.

2.2) Definição de células de *Schwann*

As células de *Schwann* são células do sistema nervoso que formam a bainha de mielina do sistema nervoso periférico¹⁷.

O axônio, uma vez em contato com a célula de Schwann é chamado de fibra. As células de Schwann não formadoras de mielina se estendem ao longo de grupos de axônios sendo que cada axônio é separado do outro por um sulco longitudinal¹⁸. Essas fibras são conhecidas como amielínicas. Nas fibras mielínicas, um único axônio é envolvido a cada internodo por uma célula de *Schwann* que se enrola ao seu redor formando lamelas concêntricas.

A mielinização começa quando o axônio atinge o diâmetro de 1 a 2 μm . Embriologicamente, o processo de mielinização não se encerra durante a formação intra-uterina, mas se completa até dois anos de idade em humanos.

Qualquer subsequente aumento no comprimento do axônio após o término da mielinização, ocorre à custa de aumento no comprimento dos internodos já existentes e não à adição de novos internodos¹⁹.

2.3) Tecido nervoso e trauma

Segundo Krogh et al²⁰, os nervos periféricos não toleram compressão, alongamento e angulações bruscas. O mecanismo de injúria parece ser uma combinação de fatores, incluindo edema endoneural, dano ao sistema microcirculatório dentro do nervo, dano às barreiras de difusão, desenvolvimento de uma miniatura de síndrome de compartimento nos fascículos do nervo e, em alguns casos, desmielinização segmental até a degeneração Walleriana. Cicatrizes intraneurais podem se desenvolver tardiamente e impedir a regeneração nervosa.

A degeneração do nervo periférico é caracterizada pela destruição do coto distal quando uma injúria é causada no corpo da célula. O processo se caracteriza pela destruição do axônio e da bainha de mielina²¹. Essa degeneração é denominada degeneração Walleriana.

2.4) Processo fisiológico da degeneração Walleriana

A Degeneração Walleriana compreende uma série de eventos²² que se dividem basicamente em:

- alterações no citoesqueleto;
- alterações nas células de *Schwann* e na bainha de mielina;
- alterações nas barreiras hemato-nervosas;
- respostas dos macrófagos. As alterações começam de forma centrípeta ou centrífuga em relação ao local da lesão, ou seja, a degeneração ocorre de forma simultânea ao longo do axônio, sendo que fibras mielínicas, maiores, ou menores, degeneram-se ao mesmo tempo.

Poucas horas após a lesão, a maior parte do coto distal apresenta-se normal exceto pela região imediatamente distal à lesão (zona de trauma), a qual apresenta acúmulos de organelas, FIG.4. Este acúmulo se deve ao material transportado retrogradamente.

FIGURA 4- esquema para ilustrar o sentido da degeneração do nervo e a presença de organelas – setas vermelhas - após uma lesão no tecido nervoso periférico

Outra alteração precoce na zona de trauma é o edema endoneural, refletindo quebra na barreira hemato-nervosa. No restante do coto distal, as alterações são sutis: há uma tendência a acúmulo de organelas sob os nodos de *Ranvier* (espaçamento isento de mielina, internodal), e incisuras de Schmidt-Lantermann (incisuras do citoplasma da célula de Schwann que percorrem a bainha de mielina desde a face externa até a face interna)²³.

A duração deste estágio inicial varia entre as espécies. Nos invertebrados a degeneração Walleriana é mais lenta do que nos mamíferos, depende do comprimento do coto distal, ou seja quanto maior, mais longa a sobrevivência, e depende da temperatura, a sobrevivência é maior em tecidos com temperatura mais baixa, devido a desnaturação de proteínas²⁴.

Em condições normais, a concentração intra-axonal de íons cálcio é muito baixa; em fibras amielínicas sua distribuição é homogênea, mas nas mielínicas, o cálcio parece confinado a domínios específicos (maior concentração no axoplasma nodal, menor sob as incisuras de Schmidt-Lanterman e nenhum cálcio associado ao axolema). Em fases precoces de degeneração Walleriana (30 horas após lesão) a precipitação de cálcio caracteriza áreas de desintegração do citoesqueleto, o que definitivamente coloca o cálcio como protagonista do processo²⁵.

Fisiologicamente, a transmissão sináptica é interrompida precocemente, mesmo antes das primeiras alterações morfológicas detectáveis, devido à degeneração do terminal sináptico. O momento exato em que há esta falha, no entanto, é difícil precisar, já que depende de onde o nervo foi lesado, uma vez que quanto mais próxima do terminal for à lesão, mais rapidamente a transmissão sináptica será interrompida²⁶.

Após estas alterações preliminares, segue-se a desintegração granular do citoesqueleto, que tem início em torno de 24 horas após a lesão, quando se pode observar um pequeno número de fibras com degeneração do citoesqueleto axonal. 30 horas após a lesão, é possível detectar o comprometimento de aproximadamente 25% das fibras, sendo que as 75% restantes, apresentam-se, metade normais, e a outra metade em processo inicial de desintegração²⁷.

Quarenta e oito horas após a lesão restam apenas raras fibras normais. A desintegração do citoesqueleto axonal constitui um processo ativo de degradação por proteólise enzimática possivelmente mediada por calpaínas, que são proteases ativadas por cálcio.

Após a instalação do processo de desintegração granular do citoesqueleto iniciam-se as respostas de células não neuronais à lesão, sendo uma das primeiras, a quebra na barreira hemato-nervosa, que ocorre após a desintegração do citoesqueleto, de 24 a 48 horas pós-trauma. A desintegração de um pequeno número de axônios já parece ser suficiente para deflagração deste evento²⁸.

As células de Schwann respondem de forma intensa à lesão axonal. Paulatinamente, há uma ampliação dos nodos de Ranvier em virtude da retração da mielina paranodal. As alças terminais de mielina separam-se do axolema, separam-se e vacuolizam-se. O citoplasma da célula de Schwann aumenta seu volume próximo aos nodos e emite processos que se insinuam entre as alças terminais de mielina e o axolema, e também entre as lamelas, levando a uma retração ainda maior da mielina. As alterações axonais precedem as da mielina, porém, algumas fibras já as apresentam alteradas 24 horas após a lesão²⁹.

Cerca de 70 horas após o início da desintegração do citoesqueleto (3º dia após a lesão), as células de Schwann entram em divisão celular (fase proliferativa) e atingem o máximo de atividade em quatro dias. As células de Schwann resultantes das divisões celulares formam cadeias de células que se sobrepõem formando as bandas de Büngner (condutos longitudinais formados pelas células de Schwann em proliferação). Nas fibras amielínicas degeneradas, também ocorre mitose nas células de Schwann, juntamente com a replicação das células endoneurais, como por exemplo: fibroblastos, mastócitos e células endoteliais. A divisão celular das células de Schwann corresponde a importantes

modificações na síntese protéica destas células, que incluem sub-regulação da maior parte das proteínas de mielina e associadas à mielina³⁰. Esta sub-regulação é dependente da perda axonal. A síntese de fatores neurotróficos, como o fator de crescimento neural (NGF), proteína associada ao crescimento 43 (GAP-43) e seus receptores, estão sobre-regulados devido à sub-regulação dos neurofilamentos e proteínas na região lesada, em consequência do aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc)³¹.

A GAP-43 está associada ao crescimento e mobilidade do cone do tecido nervoso. Inicialmente foi observada apenas nos axônios, posteriormente notou-se que as células de Schwann também liberam esta proteína, isto observado em cones distais de crescimento nervoso³². O papel desta proteína está relacionado à notificação do citoesqueleto e à adesão entre os cotos de axônios lesados³³.

Os eventos celulares e moleculares envolvidos no processo de degeneração nervosa aparentemente visam proporcionar caminhos para que ocorra a regeneração. No sistema nervoso periférico, diferentemente do sistema nervoso central, isto muitas vezes é possível e acredita-se que o sucesso da regeneração após lesão do sistema nervoso periférico, se deva ao meio ambiente propício, especialmente à presença das células de Schwann^{34, 35}.

As lesões nervosas são classificadas em três grupos³⁶ de acordo com a gravidade do dano:

- Neuropraxia: lesão onde ocorre alteração da bainha de mielina, sem perda da continuidade do nervo, não ocorrendo a degeneração deste, onde seu mecanismo de lesão pode ocorrer por contusão ou compressão.
- Axoniotmese: mais grave que a neuropraxia, apresenta interrupções tanto na bainha de mielina quanto no axônio. Basicamente, ocorre a interrupção dos axônios, permanecendo intacto o tecido conectivo que o rodeia e, portanto, sem perda da continuidade no nervo. Clinicamente, existe uma perda completa da função nervosa, tanto motora como sensitiva.
- Neurotmese: caracteriza-se pela perda da continuidade anatômica do nervo produzida geralmente por secção do mesmo, com a manutenção parcial ou não do perineuro, sendo a mais frequente e a mais grave das lesões nervosas.

2.5) Fisiopatologia da lesão

A neuropraxia resulta da “compressão”, promovendo uma anóxia local dos axônios por compressão dos vasos sanguíneos. Ocorre um fenômeno de adelgaçamento da fibra nervosa com desmielinização focal (diminuição axoplasmática intensa e localizada)³⁷. A condução nervosa se mantém preservada acima e abaixo do local de lesão, não ocorrendo degeneração Walleriana (decomposição química da bainha de mielina em material lipídico e fragmentação das neurofibrilas).

Uma vez removido o processo compressivo, ocorre remielinização, reaparecendo a condução em dias ou semanas, com função nervosa condutiva normal.

Na neuropraxia a alteração patológica presente é a desmielinização das fibras nervosas. Este fenômeno leva à perda da condutividade, mas sem qualquer degeneração de axônios³⁸.

2.6) Características histológicas da regeneração de nervos periféricos

Os nervos periféricos podem se regenerar de três diferentes maneiras, dependendo do mecanismo da injúria:

- Na desmielinização segmentar, a camada de mielina lesada se recompõe num processo chamado de remielinização. Esta é a forma mais rápida de recuperação, ocorrendo entre 2 e 12 semanas após a lesão. Nas lesões nervosas onde a continuidade dos axônios é interrompida, parcial ou totalmente, ocorre degeneração axonal distal à lesão, pois a comunicação com o corpo celular é interrompida. Isto inicia nos primeiros minutos após a lesão. Após as primeiras 24 horas, esta degeneração já é evidente e a destruição das bainhas de mielina se inicia. Após o terceiro dia inicia-se a quebra da bainha de mielina que se torna mais evidente a partir do quinto dia. Histologicamente, esse fenômeno é conhecido como câmaras de digestão de mielina. Após três semanas da lesão axonal ter ocorrido, inicia-se o processo de regeneração do nervo³⁹.
- Nas lesões axonais parciais ocorre um processo conhecido como brotamento axonal, onde axônios vizinhos intactos passam a inervar a área desnervada pela injúria. Este fenômeno demora de dois a seis meses para ocorrer⁴⁰.

- Após uma lesão completa de um nervo periférico, a regeneração das fibras proximais somente ocorre se houver preservação do corpo celular, presente no corno anterior da medula para os axônios motores e no gânglio da raiz dorsal para os axônios sensoriais.

2.7) Terapias que modulam a regeneração nervosa

2.7.1) Laser - definição

LASER significa “Light Amplification By Stimulated Emission of Radiation”, ou seja, dispositivo que gera intenso feixe de luz monocromático, coerente e colimado, podendo ter como meio ativo – gás, sólido ou líquido⁴¹.

A radiação *laser* pode ser refletida, transmitida, absorvida e espalhada por um sistema biológico e, depende das micro e macroestruturas do meio⁴².

2.7.1.1) Radiações ionizantes e não ionizantes

Radiação ionizante é a radiação que possui energia suficiente para ionizar átomos e moléculas, podendo danificar células e afetar o material genético de seres vivos, causando doenças graves ou até levando a morte. Exemplos de radiação ionizante: a radiação eletromagnética ultravioleta e partículas como os elétrons e os prótons que possuem altas energias. As partículas podem ser: alfa, beta (elétrons e pósitrons), os raios gama, raios-x e nêutrons.

Esse tipo de radiação pode ser usada para pesquisa, diagnóstico e tratamento na medicina estando todos esses usos sujeitos às regulações governamentais. Nas aplicações das radiações ionizantes, o planejamento da dosimetria nos tratamentos que usam feixes de radiação envolve a estimativa da densidade de energia no tecido, que é usada para determinar não apenas a profundidade de penetração da radiação, mas o valor e a posição de máxima energia dentro do tecido.

Já para a radiação não-ionizante, como é o caso dos lasers, mesmo conhecendo as propriedades ópticas do tecido-alvo, não é possível prever com precisão quão longe o fóton se propagará antes de causar algum tipo de interação. O motivo é que na radiação não-ionizante, o mecanismo de interação com o tecido varia de acordo com o comprimento de onda incidente e com as características ópticas do tecido-alvo, que é heterogêneo e complexo, tornando

extremamente difícil modelar todas as possíveis interações e, portanto, a trajetória dos fótons e o valor máximo da densidade de energia dentro do tecido⁴¹

2.7.1.2) Fundamentos sobre o laser

O laser é a amplificação de luz e sua emissão depende do meio ativo utilizado. O meio ativo é uma coleção de átomos, moléculas ou íons que emitem radiação eletromagnética. É gerado um processo de excitação, chamado bombeamento, e o meio ativo amplifica a radiação. Praticamente, não existe dispersão ou espalhamento neste feixe. O laser quando acionado pode ser contínuo ou pulsátil. Para atingir o alvo, o laser pode ser entregue por fibra óptica, que permite contato com o tecido e pode consistir em fibroscópio com sistema de visualização; guia de onda oco, que consiste em tubos flexíveis com superfície interna refletora; braço articulado, que consiste em espelhos localizados nos “cotovelos” do braço e que direcionam o feixe ao longo dele; endoscópio, que pode ser acoplado a um microscópio.

2.7.1.3) Tipos de lasers: de baixa e alta potência

O laser é classificado em: laser de alta potência ou cirúrgicos, com potencial efeito térmico, apresentando propriedades de corte, vaporização e hemostasia; e laser de baixa potência ou terapêuticos, apresentando propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e de bioestimulação. Exemplos: o laser de Hélio-Neônio (He-Ne), cujo comprimento de onda é 632,8nm, ou seja, na faixa de luz visível (luz vermelha); o laser de Arseneto de Galio-Alumínio (Ga-Al-As), cujo comprimento de onda se situa fora do espectro de luz visível (luz infravermelha), sendo mais comumente 630-980nm, e o laser combinado de Hélio-Neônio diodo. Alguns dos lasers utilizados em Odontologia estão situados na faixa de luz visível e outros na faixa do infravermelho⁴³.

O laser terapêutico baseia-se no conceito de bioestimulação. Este conceito surgiu em 1967 quando Endre Mester estudou a radiação laser em camundongos. Ele acreditou que o laser poderia causar câncer⁴⁴. O estudo foi feito com um laser de rubi de baixa potência, com comprimento de onda de 694nm em um grupo de camundongos que teve o dorso depilado. O resultado final não foi o desenvolvimento do câncer, e sim, o crescimento mais rápido de pelos. Este fato descrito foi precursor, mas com o passar do tempo os

conceitos foram se modificando e o uso da laserterapia se tornando cada vez mais rotineiro na área médica. Portanto, entender como a energia de lasers trabalha nos níveis celulares e quais os parâmetros ótimos de irradiação para os diferentes usos destas fontes de luz se faz necessário para seu uso seguro.

A fototerapia é utilizada e estudada há muito tempo⁴⁵, mas atualmente os estudos buscam entender como a energia de lasers terapêuticos atua nos níveis celulares, ou seja, a fotobiologia do tecido, para que se possa determinar os parâmetros ótimos de irradiação para os diferentes usos destas fontes de luz.

2.7.1.4) Fotobiologia do tecido

A primeira lei da fotobiologia postula que, para a luz visível de baixa potência ter qualquer efeito em um sistema biológico vivo, os fótons devem ser absorvidos pelas bandas de absorção eletrônica ou bandas de vibrações moleculares pertencentes a alguma molécula que age como um cromóforo ou fotorreceptor⁴⁶. Um cromóforo para a luz visível é uma molécula (ou parte de uma molécula) na qual a diferença de energia entre os elétrons em dois orbitais moleculares diferentes coincide com a energia do fóton. Numerosos exemplos de cromóforos existem na natureza, tais como clorofila nas plantas, em algas bacterioclorofila bluegreen, flavoproteínas e de hemoglobina encontrada nas células vermelhas do sangue⁴⁷.

Um modo de encontrar este cromóforo específico é medir o espectro de absorção. O espectro de absorção em função do comprimento de onda indicará quais comprimentos de onda são mais efetivos para um tipo de tecido biológico. Em 1989, foi sugerido que o mecanismo de ação da terapia com laser de baixa potência em nível celular era baseado na absorção da radiação monocromática visível e no infravermelho próximo por componentes da cadeia respiratória celular⁴⁸.

Como o efeito dessa terapia depende da energia envolvida, a mitocôndria, organela da cadeia respiratória, tem função relevante no processo. A mitocôndria desempenha um papel importante na geração de energia e no metabolismo celular, e se diferenciam por possuir duas membranas e geralmente têm formato arredondado, com dimensão da ordem de 1 a 10 μm . Elas convertem moléculas de glicose em energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) por meio

do processo de fosforilação oxidativa. As mitocôndrias participam do processo de catabolismo usando caminhos metabólicos que incluem o ciclo de Krebs, a oxidação de ácido graxo e a oxidação de aminoácidos. Segundo uma revisão literária de 2010⁴⁹, as mitocôndrias são consideradas os fotorreceptores principais, e o aumento de adenosina trifosfato, o oxigênio reativo, o cálcio intracelular, a liberação de óxido nítrico são eventos iniciais da cadeia metabólica.

Além do conceito de cromóforos, uma consideração importante no uso da laserterapia são as propriedades ópticas do tecido alvo. Tanto a absorção quanto o espalhamento da luz são dependentes do comprimento de onda, sendo que na região azul do espectro é maior que no vermelho. Os principais cromóforos do tecido são: água, hemoglobina e melanina, estas últimas possuem alta banda de absorção em comprimentos de onda menores que 600 nm, a água começa a absorver significativamente em comprimentos de onda maior do que 1150 nm.. Portanto, embora as luzes azul, verde e amarela possam ter efeitos significativos sobre células em crescimento em meios de cultura opticamente transparentes, o uso da laserterapia em animais, majoritariamente envolve as luzes vermelha e infravermelha⁵⁰.

Muitas das aplicações dessa terapia estão na neurologia, envolvendo o sistema nervoso central e periférico. Muitas doenças ou lesões cerebrais graves podem se tratadas com sucesso com laserterapia, sem necessitar de procedimentos invasivos. Além disso, no sistema nervoso periférico, pode ser utilizado eficazmente para a regeneração de nervos e para alívio da dor⁵¹.

A terapia com o laser modula também o fator nuclear transcricional Kapa B, o NF-kB. Ele é um fator de transcrição regulador de expressão gênica⁵² que pode governar várias funções celulares, incluindo a resposta inflamatória induzida por estresse e sobrevivência⁵³ celular. Entender os mecanismos de ativação que governam o NF-kB pode ser importante no estudo da reparação do tecido ou mesmo na progressão do câncer. O NF-kB é um fator de transcrição sensível a redox⁵⁴ que tem sido proposto ser o sensor para estresse oxidativo⁵⁵.

2.7.2) Biomaterial

Segundo a Sociedade Européia de Biomateriais, em 1987, o termo era definido como “um material não vivo utilizado como dispositivo médico, para

interagir com sistemas biológicos” (*Consensus Conference on Definitions in Biomaterials Science of the European Society for Biomaterials*). Esse conceito considerava apenas material não vivo e, foi se modificando de acordo com os estudos que avaliavam a interação do biomaterial e do tecido receptor. Em 1992 Willians⁵⁶ designou biomateriais como uma classe de substâncias naturais ou sintéticas que em contato, de forma permanente ou não, com tecidos e fluidos de seres vivos, não causam efeitos deletérios ao organismo.

Em 2007 segundo Park e Lakes⁵⁷ o conceito de biomaterial pode ser definido como qualquer material usado na fabricação de dispositivos para substituir uma parte ou função do corpo de forma segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável.

Atualmente, o conceito de biomaterial se baseia em um estudo de 2009: biomaterial é toda substância projetada para assumir uma forma que, por si só ou como parte de um sistema complexo, é utilizada para direcionar, através do controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o percurso de qualquer procedimento de diagnóstico ou terapêutico, no ser humano ou na Medicina Veterinária⁵⁸.

A origem do biomaterial pode ser de natureza biológica ou sintética. Inicialmente, a procura de tais compostos se deu com a utilização de materiais de origem biológica como autógenos (onde o doador é o próprio receptor), alógenos (onde o doador e o receptor são da mesma espécie) e xenógenos (onde o doador é de origem animal)⁵⁹. Com a evolução da Engenharia dos tecidos trabalhos foram realizados com o objetivo de dispor de materiais de origem sintética com características adequadas que permitam diminuir e, em alguns casos eliminar o uso de materiais de origem biológica.

Para que um biomaterial possa desempenhar uma determinada função seja de substituir, aumentar ou suportar uma estrutura, dois princípios fisiológicos devem ser considerados: a biofuncionalidade e a biocompatibilidade. Esses princípios são considerados desde a escolha do material para a sua fabricação até a determinação da função a que se destina. O processo de fabricação tem início com a seleção do material, podendo este ser metal ou liga, materiais cerâmicos, polímeros de natureza variada ou compósitos; com a análise de quantidade dos mesmos; e por fim, com a análise das possíveis reações no

organismo de acordo com critérios químicos, fisiológicos e mecânicos da relação do biomaterial com o organismo receptor⁶⁰.

A biocompatibilidade é a capacidade do material de gerar uma resposta, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos⁶¹. A biocompatibilidade compreende as interações dos tecidos *in vivo*, ou em fluidos, incluindo sangue, com um implante ou biomaterial. As interações podem ser do meio fisiológico sobre o material ou ação do material no tecido, sendo difícil separar estas duas interações.

A biofuncionabilidade caracteriza a função a qual o biomaterial se destina. Ela se baseia nas propriedades específicas do material sejam elas mecânicas, químicas, ópticas, elétricas.

Todo material implantado em tecidos vivos causa uma resposta no organismo hospedeiro. Os biomateriais podem ser classificados de acordo com o comportamento fisiológico gerado quando na interação com o hospedeiro..

O biomaterial pode ser bioinerte, biotolerável, biorreabsorvível e bioativo. O material bioinerte não libera nenhum tipo de componente ou quantidade mínima do biomaterial, sendo considerado estável e mantendo suas propriedades físicas e mecânicas. O material bioinerte é utilizado para revestimento de tecidos ou para sustentação mecânica. Exemplos: titânia, zircônia, alumina⁶². O biotolerável é o material que quando em contato com o organismo apresenta a formação de tecido fibroso ao seu redor. Esta camada é induzida por meio da liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros. É através da espessura dessa camada fibrosa que a toxicidade do material é determinada. Exemplos: polímeros sintéticos e metais. O material biorreabsorvível é aquele que após certo período de tempo em contato com os tecidos é degradado, solubilizado ou fagocitado pelo organismo. Exemplo: fosfato tricálcico. O material bioativo promove ligações químicas com o tecido receptor. Exemplo: hidroxiapatita⁶³.

Para que um material seja aceito como biomaterial e utilizado em seres vivos, vários testes são exigidos primeiramente. O teste de citotoxicidade é o teste inicial para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso médico ou odontológico. Esse teste pode ser uma avaliação qualitativa e/ou quantitativa. A

avaliação qualitativa observa as mudanças morfológicas das células. A avaliação quantitativa investiga os parâmetros celulares como a morte celular, a inibição do crescimento, proliferação celular ou formação de colônias⁶⁴.

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993⁶⁵, após a utilização de testes de citotoxicidade *in vitro*, e comprovada a sua não toxicidade é que o estudo de biocompatibilidade do produto pode ter continuidade, sendo realizados os ensaios necessários em animais de laboratório.

Vários métodos *in vitro* para avaliar a toxicidade de biomateriais foram padronizados utilizando culturas celulares. Consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto, é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular⁶⁶. O uso de culturas celulares tem como vantagem a rapidez, o custo, a sensibilidade e são reprodutíveis.

No atual trabalho o biomaterial utilizado é nomeado como composto polivitamínico $\mathfrak{U}$ -**NERVE**® e será descrito a seguir.

2.7.2.1) O biomaterial utilizado no estudo: composto polivitamínico $\mathfrak{U}$ -NERVE**®**

O biomaterial compreende uma composição de vitaminas e sais minerais fornecido pela JHS-Biomaterials, Sabará, Brasil. Segundo a empresa, o biomaterial experimental é aplicado diretamente na lesão e, tem a capacidade de limitar a ação dos radicais livres. Dados fornecidos pelo fabricante, segundo a função dos componentes: antioxidantes - β -caroteno, α -tocoferol, sais de selênio e zinco; atividade metabólica - complexo B, calciferol, sais de magnésio, sais de

fósforo, ácido glutâmico e lecitina de soja; agentes aglutinadores – colágeno hidrolisado, sulfato de glicosaminoglicanas e sulfato de condroitina.

O biomaterial apresenta uma consistência de uma resina epóxi que é aplicada ao redor da lesão nervosa. A consistência se dá pela presença do colágeno hidrolisado, do sulfato de glicosaminoglicanas e do sulfato de condroitina em sua composição.

Segundo o fabricante, este biomaterial recebeu esta nomenclatura para simbolizar a tríade do processo de reparo: proteção celular, fornecimento de nutrientes ATP e indicação do tecido. De acordo com a descrição, deve proporcionar a redução do dano oxidativo e melhorar a sustentação metabólica local para o tecido desejado: ósseo ou nervoso. Os resultados histológicos realizados em animais indicaram uma preservação ou regeneração do tecido envolvido⁶⁷.

Allegrini⁶⁸ avaliou o efeito da proteína morfogenética óssea bovina (BMPb), do composto polivitamínico e da hidroxiapatita quando inseridos em leito ósseo na tíbia de coelho. Nesse estudo a BMPb e o composto não desencadearam efeitos positivos no processo de deposição óssea em comparação ao grupo da hidroxiapatita. O composto não foi absorvido pelo organismo ficando entre o osso e a hidroxiapatita.

Em 2007, Salles⁶⁹ estudou o estresse oxidativo agudo após trauma cirúrgico, pela ativação de uma endonuclease sensível ao estresse, o fator nuclear kappa-beta (NF-kB), avaliada em cortical óssea de ratos Wistar. As causas do estresse oxidativo pode ser dividido em duas classes: interna (inflamação, reação auto-imune, problemas metabólicos e isquemia) e externa (organismos microbiológicos, radiação eletromagnética ou mecânica, ação térmica ou química), ocasionando falta de habilidade do organismo ou da célula para se defender contra as espécies reativas do oxigênio e ou nitrogênio. A NF-kB é considerada um fator de estresse cuja ativação induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, a morte ou adaptação celular. O estresse se apresentou reduzido indicando a influência do composto no equilíbrio da oxidação no tecido ósseo.

2.7.3) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é um tipo de microscópio eletrônico capaz de produzir imagens de alta resolução da superfície de uma amostra. Devido a maneira com que as imagens são criadas, imagens de MEV tem uma aparência tridimensional característica e são úteis para avaliar a estrutura superficial de uma dada amostra.

Quando o feixe primário interage com a amostra, os elétrons perdem energia por dispersão e absorção em um volume em forma de gota, conhecido como volume de interação, o qual se estende de menos de 100 nm até em torno de 5 µm para dentro da superfície da amostra. O tamanho do volume de interação depende da energia dos elétrons, do número atômico dos átomos da amostra e da densidade da amostra. A interação entre o feixe de elétrons e a amostra resulta na emissão de elétrons secundários, elétrons retroespalhados, elétrons Auger, raios-x, radiação eletromagnética na região do infravermelho, do visível e do ultravioleta e fônons, causando o aquecimento da amostra.

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de altos aumentos (até 300.000 x) e resolução. As imagens fornecidas pelo MEV possuem um caráter virtual, pois o que é visualizado no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons, ao contrário da radiação de luz. O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV. Essa variação de voltagem permite controlar a aceleração dos elétrons. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes dos elétrons atingirem a amostra analisada.

A preparação das amostras depende das características das mesmas: sólidos não condutivos são recobertos por material condutivo, ouro ou carbono, ou o material pode ser embutido em resina, amostras biológicas são desidratadas e recobertas com material condutivo⁷⁰.

OBJETIVO

O capítulo a seguir apresenta as propostas da tese que configuram o objetivo do trabalho.

3) OBJETIVO

O objetivo do estudo é avaliar o potencial regenerativo de terapias para tratamento de neuropatias do sistema nervoso periférico, comparando os efeitos de cada tratamento aplicado em uma determinada lesão. O estudo consiste na compressão do nervo isquiático de ratos *Wistar* com nós de fio de sutura e aplicação de terapias para tratamento da mesma: laser de baixa potência, biomaterial ζ -NERVE® e a associação das duas. A análise dos resultados da microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, juntamente com as características de locomoção dos animais, têm como objetivos específicos:

- Identificar, nas amostras histológicas do experimento, as características da degeneração Walleriana;
- Avaliar os efeitos do laser, do biomaterial e da associação de ambos no processo da degeneração e regeneração tecidual nervosa;
- Comparar grupos de animais tratados e não tratados;
- Analisar as vantagens e desvantagens de cada terapia;
- Eleger uma terapia favorável para a regeneração do tecido nervoso periférico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é descrita a metodologia para obtenção da lesão nervosa causada nos animais, as terapias utilizadas para tratamento, a manipulação do equipamento de laser de baixa potência, a descrição do biomaterial utilizado e dos testes *in vitro*, a obtenção das amostras para estudo histológico dos grupos de animais e a coleta dos dados obtidos com a microscopia óptica e eletrônica de varredura.

4) MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares (IPEN), segundo a numeração 110/12.

4.1) Grupos experimentais

Para este experimento foram utilizados sessenta ratos machos da linhagem *Wistar* com massa corpórea aproximada de 350g provenientes do próprio Biotério do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (IPEN).

Os animais ao atingirem a massa corpórea desejada foram alojados em gaiolas de contenção de polipropileno, agrupados em números de três, ou dois, animais por gaiola correspondendo aos cinco animais de cada grupo em estudo, FIG.5. As gaiolas possuem água e ração *ad libitum*, mantidos em períodos claro/escuro de 12 horas, à temperatura média de 22 ± 2 °C, FIG.6, diminuindo o estresse destes animais⁷¹. Estes animais seguiram regra e regulamentos da FELASA – *Federation of European Laboratory Animal Science Associations*.

FIGURA 5 - animais acomodados na gaiola

FIGURA 6 - gaiolas organizadas nas prateleiras

Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos com 5 animais em cada, TAB.1:

- Grupo 1 (G1) – controle, não foi realizado nenhum tipo de tratamento;
- Grupo 2 (G2) – cirurgia *Sham* ou simulacro, o feixe nervoso foi exposto através de uma incisão e dissecação até sua visualização, porém não foi realizada nenhuma manobra cirúrgica;

- Grupo 3 (G3) – cirurgia com exposição e com compressão do nervo;
- Grupo 4(G4) – cirurgia com compressão do nervo e animais tratados com o biomaterial $\mathfrak{Z}$ -NERVE®;
- Grupo 5 (G5) – cirurgia com compressão do nervo e animais tratados com laserterapia;
- Grupo 6 (G6) – cirurgia como compressão do nervo e animais tratados, simultaneamente, com $\mathfrak{Z}$ -NERVE® e laserterapia.

TABELA 1 – agrupamento dos animais de acordo com a divisão dos grupos experimentais, seu nome e procedimento executado, época da eutanásia

	<u>Nome do grupo</u>	<u>Procedimento cirúrgico</u>	<u>Tratamento</u>	<u>Eutanásia (dias)</u> 15 e 30		<u>Nº total de animais</u>
G 1	Controle	Sem cirurgia	Sem tratamento	5	5	10
G 2	“Sham”	exposição e visualização do feixe nervoso	Sem tratamento posterior	5	5	10
G 3	Neuropraxia ou Compressão	Compressão	Sem tratamento posterior	5	5	10
G 4	Composto	Compressão	Colocação do composto polivitamínico	5	5	10
G 5	Laser	Compressão	Laserterapia	5	5	10
G 6	Composto e Laser	Compressão	Colocação do Composto polivitamínico e aplicação de laser	5	5	10
Total				30	30	60

4.2) Procedimento cirúrgico

Os animais foram previamente anestesiados com ketamina (0,1ml/kg) e xilazina (0,1ml/kg) através de injeção intramuscular. Assepsia com clorexidina 2% foi realizada na região operada (dorso e patas posteriores do animal). Seguindo-se a tricotomia com lâmina apropriada e uma segunda assepsia com clorexidina 2% para remoção de fragmentos de pelo, FIG.7 e 8.

FIGURA 7 – Assepsia com gaze e clorexidina 2% na região a ser incisa

FIGURA 8 – animal pronto para incisão e posicionado na mesa cirúrgica

Para a incisão foi utilizada lâmina de bisturi nº15, FIG.9, da marca Solidor® sendo trocada quando o corte estava deficiente, ou de um animal para outro.

FIGURA 9 – foto da lâmina de bisturi nº 15 da marca Solidor® utilizada no experimento para fazer a incisão no tecido externo do animal.

A incisão foi realizada paralela às fibras do músculo bíceps femoral da coxa direita do animal, expondo assim o nervo isquiático direito. A dissecação foi feita até a exposição do feixe nervoso, FIG.10.

FIGURA 10 – foto da exposição do nervo isquiático da pata direita do animal após incisão e separação do tecido muscular.

Os animais do grupo G2 nomeados como “*Sham*” sofreram o procedimento cirúrgico até esta etapa, na qual ocorre apenas a exposição do nervo. Seguiu-se a sutura do tecido muscular com fio não reabsorvível, sem a manipulação do feixe nervoso. Posteriormente, a síntese do tecido externo foi realizada com fio de sutura mononylon 4.0 da marca Ethicon®.

A partir do grupo G3 em diante, após a dissecação, o nervo ao ser encontrado foi individualizado como mostra a FIG.11.

FIGURA 11 - foto ilustrando a exposição e individualização do nervo isquiático da pata direita do animal

O dano ao tecido nervoso foi induzido por compressão realizada com fio de sutura mononylon 4.0 em três regiões consecutivas, este procedimento teve como finalidade promover um dano ao feixe nervoso (isquiático), FIG.12 e 13.

FIGURA 12 - nervo isquiático individualizado dos tecidos adjacentes

FIGURA 13 – foto da execução do segundo nó cirúrgico 2x2 no nervo dissecado

O procedimento cirúrgico consistiu em realizar a sutura em três pontos consecutivos do mesmo feixe nervoso, com intervalos entre os nós de ~2 mm, FIG.14 e15. Proposta esta baseada no trabalho de B Bennett e Xie (1988), apud Ravi & Bedi, (2004)⁷².

FIGURA 14 – foto A ilustra a execução do terceiro nó cirúrgico no nervo isquiático do animal; a foto B é o maior aumento dos três nós sequenciados com distância de aproximadamente 2mm entre eles.

No grupo G3, nomeado como Neuropraxia, os animais sofreram apenas a compressão descrita no parágrafo anterior e, o procedimento foi concluído com a sutura do tecido externo.

4.3) Terapias

Nos próximos grupos 4, 5 e 6 (G4, G5, G6) os animais sofreram o procedimento cirúrgico descrito anteriormente e ilustrado para grupo G3, mas receberam tratamento em seguida. As propostas terapêuticas foram aplicadas

utilizando o biomaterial no grupo G4, a laserterapia no grupo G5 e a associação do biomaterial e da laserterapia no grupo G6.

4.3.1) Composto Polivitamínico $\mathfrak{U}$ -NERVE®

O biomaterial utilizado é o $\mathfrak{U}$ -NERVE® fornecido pela empresa JHS-Biomaterials, Sabará, Brasil. Este composto polivitamínico como todo material com potencial para uso médico necessita do teste de citotoxicidade para avaliar a biocompatibilidade. O teste *in vitro* deste material foi realizado de acordo com a norma ISO 10993-5, partes 5 e 12, no Centro de Biotecnologia – IPEN.

No grupo G4, após a exposição e compressão do nervo, o biomaterial foi aplicado diretamente na lesão, na região do nervo comprimida pelo fio de sutura. Para isto, o frasco foi aberto e retirada uma quantidade de ~ 0,25g do biomaterial e, este foi inserido ao redor da região lesada tanto por baixo do nervo, FIG.16, como recobrimdo os três nós cirúrgicos confeccionados no nervo, FIG.17; seguindo a sutura dos tecidos profundos e superficiais.

FIGURA 15 –nervo submetido a neuropraxia e o biomaterial sendo adaptado ao redor do nervo na região onde foi causada a lesão

FIGURA 16 - recobrimento total dos nós com $\mathfrak{U}$ -NERVE®

4.3.2) Laserterapia

O equipamento utilizado foi fornecido pela empresa DMC®, *Photon Lase III*, laser vermelho e infravermelho, com registro ANVISA: 80030810014. Possui função luz laser com comprimento de onda entre 630 – 690nm (laser vermelho) e entre 790 – 830nm (laser infravermelho) para bioestimulação nas áreas de odontologia, medicina e fisioterapia, nas quais incluem: alívio de dor

(efeito de analgesia), reparação tecidual (efeito bioestimulador do trofismo celular) e redução de edema e de hiperemia (efeito antiinflamatório, antiedematoso e normalizador circulatório). Características estas fornecidas pelo fabricante. As especificações técnicas estão descritas no ANEXO A.

A irradiação laser foi realizada no ato cirúrgico diretamente no nervo, após a compressão feita com os nós. Após a sutura final a aplicação foi repetida agora sobre o tecido externo.

Segundo a proposta baseada nos estudos de Khadra et al, 2004⁷³, neste trabalho foram utilizados dez dias consecutivos de laserterapia de baixa potência. O estudo foi feito para avaliar o efeito da laserterapia de baixa potência em implantes ósseos; utilizou animais que receberam a terapia por 10 dias e foram acompanhados por 8 semanas. O resultado foi favorável para a osteointegração.

A aplicação do laser foi orientada pela linha de incisão de, aproximadamente, 4 cm (linha vermelha na FIG 17) na pata do animal. A ponta do equipamento era posicionada verticalmente à esta linha a uma distância de 1cm do tecido. A linha de sutura era dividida em 2 regiões (pontos A e B), abrangendo a região operada. A irradiação era feita no ponto A, depois B. Em seguida, acima e abaixo da linha (C e D).

FIGURA 17 – representação da área irradiada na pata do animal que recebeu a terapia com laser. A linha vermelha se refere à incisão e A, B, C e D a localização da ponta do equipamento para a aplicação e entrega da radiação.

A irradiação infravermelha foi de forma pontual em A, B, C e D abrangendo assim a região operada. Segundo as características do equipamento, a fluência é de 140J/ cm² e dose de 4J por ponto por 25 segundos.

Os animais seriam previamente imobilizados em um contensor, mas não foi necessário. Os animais foram manipulados calmamente não gerando estresse a eles, conseguindo assim uma irradiação efetiva, FIG.18. Os grupos G5

e G6 correspondem aos grupos irradiados com laser como determinado pelo fabricante. No próprio equipamento a opção *parestesia* já é preconizada pela empresa.

FIGURA 18 – realizando a aplicação do laser na região operada nos animais do grupo G6 após sutura final do tecido externo

4.3.3) Uso do Composto Polivitamínico 3-*NERVE*® associado ao laser

No grupo G6 as terapias foram associadas, simultaneamente foi realizado a aplicação do laser e a colocação do biomaterial. O nervo foi exposto, a compressão com o fio de sutura foi realizada, a irradiação laser foi feita diretamente na região da lesão, o biomaterial foi colocado envolvendo o nervo, como descrito para o grupo G4 e, em seguida foi feita a sutura por planos. Como as terapias foram associadas, a aplicação do laser se manteve nos dez dias consecutivos, como no grupo G5.

4.4) Avaliação morfológica

A eutanásia dos animais foi realizada com uma sobre dosagem de anestésicos. Foram sacrificados, nos primeiros quinze dias após o procedimento cirúrgico, cinco animais de cada grupo. Isto se repetiu no trigésimo dia, finalizando a eutanásia dos outros trinta animais.

Conforme o tempo proposto de quinze e trinta dias, os tecidos foram dissecados e o fragmento do feixe foi coletado. Este segmento compreendia, aproximadamente, 15mm, sendo 5mm referente a região comprimida pelo fio de sutura, 5mm do segmento distal e 5mm do segmento proximal.

No grupo G1 a coleta do segmento do feixe obedeceu a dimensão proposta de aproximadamente 15 mm do feixe íntegro. No grupo G2 foi feita nova incisão na região operada que ainda apresentava cicatriz, e o material foi coletado. Nos grupos G3, G4, G5 e G6 a remoção do segmento do nervo foi feita juntamente com o fio de sutura que causou dano nervoso, pois este fio de sutura utilizado não é absorvido, FIG19.

FIGURA 19 – dissecação para remoção do fragmento do nervo isquiático do animal envolvendo uma distância de 1 cm a mais tanto do coto proximal e distal

As amostras foram então fixadas em solução de formol tamponado à 10% durante 24 horas, a temperatura ambiente. Posteriormente, o fio de sutura foi removido para não interferir na confecção das lâminas histológicas. Foi feita uma marcação no coto utilizando um nó na extremidade proximal do segmento lesado, apenas como referência de estudos. As amostras foram então processadas de forma rotineira para inclusão em parafina. Os cortes foram feitos no micrótomo da marca Jung e na espessura de 5 μ m, FIG.20. A estrutura para a confecção das lâminas histológicas foi oferecida pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - FO/USP. Para complementar a coleta de dados, cortes transversais foram realizados no Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB -3).

FIGURA 20 – micrótomo da marca JUNG pertencente ao Instituto de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

As imagens das lâminas foram capturadas utilizando o microscópio e a câmera acoplada LEICA DFC 310 FX, transmitidas ao computador da Apple Macintosh.

Foram feitas também imagens das amostras dos seis grupos por microscopia eletrônica de varredura. Foi utilizado o aparelho de microscopia de varredura da marca Philips XL30. As amostras para a MEV foram desidratadas em vácuo e recobertas com ouro, FIG.21, imagens A e B, respectivamente.

FIGURA 21 – imagens das amostras do grupo G3 preparadas para microscopia de varredura. A imagem A representa a amostra desidratada e a B representa as amostras recobertas com ouro.

Os parâmetros analisados foram:

- Quantidade de fibras nervosas;
- Diâmetro das fibras nervosas;
- Integridade do tecido envolvido;
- Destruição e neoformação do tecido nervoso.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados e a discussão sobre os dados obtidos incluindo observação clínica da locomoção dos animais e a análise morfológica sobre a degeneração do tecido nervoso nos seis grupos formados.

5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1) Os animais

No procedimento experimental foram utilizados sessenta ratos, sendo que dez pertenciam ao grupo controle, não receberam nenhum procedimento, e os outros cinquenta ratos sofreram algum tipo de manipulação. Em vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico um animal do grupo *Sham* e um do grupo da neuropraxia morreram. No segundo e no terceiro dia um animal do grupo G5 e um do grupo G6 foram encontrados mortos. E no quinto dia um animal do grupo neuropraxia foi encontrado morto. Considerando-se que não houve intercorrência durante o ato cirúrgico, a provável causa das mortes deve ter sido a depressão do sistema fisiológico do animal devido ao medicamento anestésico associada à injúria do procedimento cirúrgico. Todos os animais retornaram do período de latência anestésica após, aproximadamente, 40 minutos do final da sutura.

Houve a perda de quatro animais após o sexto dia do procedimento cirúrgico, TAB 2. Esses animais pertenciam aos grupos tratados com o composto vitamínico (G4 e G6) e manifestaram abscesso na região da incisão. O biomaterial possui glicose em sua composição e exala um odor que atraía os animais. Estes roeram a sutura mesmo tendo alimentação à vontade, justificando que não era fome. O rompimento da sutura fez com que a ferida cirúrgica abrisse os bordos, houve a contaminação com a saliva do animal, gerando uma resposta inflamatória local com presença de abscesso. Nenhuma medicação foi utilizada como medida profilática ou para combater o abscesso. A decisão foi tomada para não influenciar os resultados histológicos.

TABELA 2 – Número de animais por grupo de acordo com a evolução cronológica do experimento

Grupos	0-14º dias	15º dia eutanásia	16º-29º dias	30º dia eutanásia
G1	10	5	5	5
G2	9	4	5	5
G3	9	4	5	5
G4	7	3	4	4
G5	9	4	5	5
G6	8	4	4	4

5.1.1) Locomoção dos animais

Os animais do grupo controle G1 não apresentaram nenhuma alteração na locomoção. Os animais do grupo Sham G2 foram colocados na gaiola após o procedimento cirúrgico para se recuperarem da latência anestésica e não apresentaram nenhuma alteração na locomoção. Os animais pertencentes ao grupo da neuropraxia G3, após o ato cirúrgico, foram colocados em gaiolas para a recuperação também. Todos os animais desse grupo claudicaram a pata direita ao se locomoverem, como mostra a FIG.22.

FIGURA 22 – foto de animal do grupo G3 com comprometimento motor da pata direita logo após o ato cirúrgico

Após uma lesão de compressão em um feixe do sistema nervoso periférico, alterações sensitivas quanto motoras podem ocorrer. O nervo periférico possui um sistema de microtúbulos e microfilamentos que se interligam entre as camadas do nervo e transportam nutrientes do núcleo até a periferia. Seus vasos encontram-se distribuídos em várias camadas da estrutura do nervo, e são interligados através de numerosas anastomoses⁷⁴.

A transmissão do impulso nervoso, bem como o transporte axonal requer um suprimento de energia contínua proporcionado pelos microvasos intraneurais. No epineuro, vasos orientados longitudinalmente exibem um padrão característico, ou seja, os vasos estão presentes em todas as camadas do epineuro e nas camadas profundas do nervo. A importância da vascularização dos nervos periféricos se deve ao fato dos axônios dos nervos periféricos serem vulneráveis à isquemia pela grande distância que existe entre o corpo neuronal e a extensão do axônio⁷⁵. Então, a compressão com os nós do fio de sutura

impediram, além da transmissão do impulso elétrico, a continuidade da estrutura, comprometendo a motricidade da pata, caracterizando a neurotme. se.

Deste grupo G3 com nove animais, ao final dos trinta dias, um animal recuperou o movimento da pata direita sem receber nenhuma terapia de tratamento. Isso foi possível porque como a lesão foi apenas compressiva e, como os nós foram manuais, a compressão feita neste animal não foi suficiente para impedir a transmissão do impulso nervoso.

Os animais pertencentes aos grupos tratados com laser grupo G5 foram gradualmente, com o passar dos dias, demonstrando uma melhora ao marchar. O comprometimento temporário de locomoção começou a apresentar melhoras a partir do quarto dia para alguns animais, sendo que até o 18º dia todos os animais do G5 apresentavam uma marcha normal dentro da gaiola. A irradiação laser age nas mitocôndrias induzindo alterações sobre a homeostasia celular, pois alguns componentes da cadeia respiratória (citocromos, flavinas e desidrogenase) são capazes de absorver luz de determinado comprimento de onda. Assim, esta absorção resulta em aumento da síntese de ATP, afetando os níveis de hidrogênio celular e ativando o gradiente iônico⁷⁶. Além disso, age na redução do processo inflamatório e propicia uma menor degeneração da bainha de mielina, favorecendo a regeneração⁷⁷.

Os animais pertencentes aos grupos que utilizaram o biomaterial grupo G4 foram melhorando os movimentos de locomoção a partir do quinto dia apresentando normalidade até o décimo sexto dia. Os animais do grupo G6 que associou as terapias começaram a movimentar a pata a partir do quinto dia, e todos deixaram de claudicar até o décimo sexto dia.

Assim, para a análise da locomoção as duas terapias, separadamente, ou em conjunto, foram efetivas e aproximadamente equivalentes ao final dos trinta dias do experimento.

5.2) Análise morfológica

A análise histológica dos seis grupos foi feita em animais eutanasiados nos tempos de quinze e trinta dias. Para a coleta do material a ser estudado, um fragmento do nervo lesado foi removido e, a partir dele, foram processadas para cada grupo pelo menos duas lâminas histológicas viáveis. O segmento envolve o coto proximal, a região da lesão e o coto distal como mostra a FIG.23.

FIGURA 23 – esquema para ilustrar o fragmento removido para a análise histológica

Nos animais eutanasiados após quinze dias, cortes longitudinais foram feitos para todos os grupos. Na análise histológica foi analisada a integridade das fibras, sua organização, neoformação, a presença de células inflamatórias e componentes sanguíneos, assim como a destruição dessas fibras.

Nos animais eutanasiados após trinta dias, cortes longitudinais foram feitos para comparação e análise da evolução dos processos de degeneração e regeneração do nervo e, na análise histológica transversal dos grupos foram consideradas estruturas como:

- fascículos nervosos
- epineuro,
- endoneuro e
- perineuro

Essas estruturas foram determinadas como parâmetros de integridade, baseadas no estudo de Yoshimoto M⁷⁸.

As células envolvidas no processo inflamatório e as características do tecido existente foram definidas para caracterizar o momento do evento, tanto na análise de quinze, como de trinta dias completos.

5.2.1) Histologia do grupo G1 - Controle

Os animais pertencentes a este grupo foram considerados parâmetros de normalidade. Tanto os cortes histológicos observados por microscopia óptica, como a microscopia eletrônica de varredura, caracterizam a estrutura no padrão normal e, não diferem em relação ao tempo de quinze ou trinta dias de eutanásia.

Cada feixe de fibras é constituído por axônios, os quais são envolvidos por uma camada delgada de tecido conjuntivo chamado endoneuro. O tecido conjuntivo que o constitui é formado por fibras colágenas do tipo I em maiores proporções e tipo III em menores, além de possuir uma rede vascular. O perineuro é constituído por tecido conjuntivo denso e reveste os fascículos. É constituído por duas camadas: a externa tipo I e a interna tipo III. O epineuro reveste todo o nervo e também é formado por duas camadas constituídas de fibras colágenas tipo I e III, além de fibrócitos e fibroblastos, vasos de maior calibre⁷⁹.

Por microscopia óptica foi identificado o perineuro, que constitui um tecido conjuntivo com achatamento das células epiteliais (núcleo com coloração roxa e achatado) e presença de fibras colágenas entre elas, identificadas por filamentos rosa ao longo da imagem como mostra a seta vermelha da FIG.24.

FIGURA 24 - imagem de microscopia óptica de um corte longitudinal do grupo G1 revelando feixe íntegro, onde se observa a continuidade das fibras e feixes com a presença de vasos sanguíneos íntegros no mesmo sentido.

O epineuro, como mostra a imagem A da FIG.25 da microscopia eletrônica de varredura, com seus vasos penetra entre fascículos. Cada fascículo é denominado de perineuro e compreende o tecido conjuntivo denso ordenado com células epiteliais lamelares ou achatadas, que formam várias camadas entre esse tecido conjuntivo e fibras nervosas, imagem B da FIG.25.

FIGURA 25 – Imagem A - fragmento do nervo isquiático de rato como parâmetro de normalidade, com perineuro íntegro, sob MEV. Imagem B mostra a parte interna com visão longitudinal dos fascículos do nervo isquiático do grupo de animais preservados. Os fascículos possuem um envoltório de tecido conjuntivo rico em vasos denominado de epineuro.

5.2.2) Histologia do grupo G2 - Sham

As características deste grupo G2 são idênticas as do grupo controle G1. A análise foi feita no feixe nervoso e não nos tecidos adjacentes, por isso as características são as mesmas sem nenhuma alteração celular, pois o mesmo não sofreu nenhuma lesão. É bem provável que se fosse analisado o tecido ao redor do nervo, devido a dissecação, um processo de reparação estivesse presente, FIG.26. Porém, encontra-se tecido muscular e adiposo rodeando o feixe íntegro. Estas estruturas estão presentes no tecido adjacente ao isquiático da pata do animal na região acessada cirurgicamente.

FIGURA 26 – Imagem da amostra do grupo G2 após 15 dias do procedimento cirúrgico. Há tecido muscular (TM) e tecido adiposo (TA) ao redor do feixe íntegro

5.2.3) Histologia do grupo G3 - Neuropraxia

Considerando a classificação das neuropatias segundo Seddon⁸⁰, foi observado que a lesão causada nos animais deste grupo não foi unicamente a neuropraxia como o grupo foi chamado. A neuropraxia é considerada uma injúria de primeiro grau na qual ocorre uma interrupção temporária da condução nervosa, sem a perda da continuidade da estrutura axonal. Porém, neste grupo houve com o passar dos dias a interrupção parcial da estrutura nervosa. Quando ocorre unicamente a neuropraxia espera-se recuperação, em seres humanos, da função neurosensora dentro de 3 a 6 semanas. A outra lesão dessa classificação é a axonometesis. Esta é uma injúria de segundo grau com completa obstrução do fluxo axoplasmático e degeneração do segmento distal do nervo, mas sem interrupção do endoneuro, perineuro ou epineuro. Para que haja a reparação nervosa é necessário que a lesão ocorra do ponto da injúria até o terminal receptor. Enfim, a última é a neurometesis que corresponde a injúria de terceiro ao quinto grau. O conteúdo do tronco nervoso é rompido em vários graus.

Na análise dos cortes longitudinais após quinze dias observa-se a região dos três nós consecutivos, FIG.27. A descontinuidade das estruturas do nervo compromete o impulso nervoso e, justifica a interrupção da propagação do estímulo elétrico e a dificuldade de locomoção dos animais.

Nas imagens da FIG.27 a seta indica os locais onde foram dados os nós. Espaços vazios na estrutura caracterizam a degeneração do feixe. O epineuro apresenta-se sem continuidade nas imagens A, B e C, sendo que na última imagem a maior destruição ao redor da lesão e abaixo dela caracteriza o coto distal.

FIGURA 27 – Imagens obtidas por microscopia óptica de uma amostra do grupo G3 na eutanásia de 15 dias. As imagens A, B, C revelam a descontinuidade do feixe devido a lesão causada pelos três nós consecutivos (indicados pelas setas). O coto proximal (A) se apresenta com espaços entre os fascículos, o distal (C) apresenta espaços vazios de degeneração.

Nenhuma terapia foi realizada neste grupo G3. Nas imagens histológicas observa-se a degeneração da estrutura do nervo ao se completar os trinta dias. A degeneração atinge tanto o coto proximal como o distal.

A compressão feita pelo fio de sutura ocasiona o estreitamento do feixe nervoso nesta região. A presença de infiltrado inflamatório é acompanhada pela degeneração do tecido referente ao epineuro, descontinuidade das fibras nervosas e invaginação de tecido conjuntivo. Esta é indicada pela seta na imagem A da FIG.28. Na imagem B da FIG.28, o corte transversal em maior aumento revela a destruição dos fascículos no coto distal e ao redor dele, a presença intenso infiltrado inflamatório consequente da manipulação.

FIGURA 28 – Imagens de microscopia óptica das amostras do grupo G3 com eutanásia de trinta dias. A imagem A é um corte longitudinal da área da lesão (seta preta) demonstrando a destruição e a descontinuidade das fibras nervosas, a imagem B é um corte transversal do coto distal com desorganização dos fascículos e infiltrado inflamatório. O perineuro está desorganizado em ambas as imagens.

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura revelam nas amostras do coto proximal na eutanásia de quinze dias, um estreitamento da estrutura do nervo onde a lesão foi causada (indicada pela seta), mas não há o rompimento total da camada externa do feixe, apenas uma desorganização das fibras.

Na amostra do coto distal com eutanásia de quinze dias houve a destruição do epineuro, imagem B da FIG.29, indicada pela seta. Com trinta dias a amostra apresenta uma descontinuidade do epineuro do coto proximal, imagem C, e o coto distal apresenta destruição da camada externa e a descontinuidade parcial de fibras internas, imagem D da FIG.29. Fato este que compromete o impulso nervoso, justificando a dificuldade motora dos animais.

FIGURA 29 – imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostra do grupo G3 revelando nas imagens A e B a destruição da camada externa (seta) do coto proximal e distal respectivamente, em animal eutanasiado após quinze dias; sendo as imagens C e D a destruição da camada externa (seta) também dos cotos proximal e distal em animais eutanasiados após trinta dias.

5.2.4) Histologia do grupo G4 – Composto Polivitamínico $\mathfrak{U}$ -NERVE®

O composto polivitamínico $\mathfrak{U}$ -Nerve® é um biomaterial que segundo a empresa oferece uma tríade de fatores que modulam a degeneração: oferecem energias para a neoformação, protegem o tecido dos danos do processo inflamatório e controlam esse processo.

Esse material foi submetido ao teste de citotoxicidade *in vitro* de acordo com a norma ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices partes 5 e 12⁸¹, no departamento de Biotecnologia do IPEN – USP, sob orientação da Profa Olga Zacuco Higa. A citotoxicidade foi avaliada por meio de metodologia quantitativa, FIG 30.

FIGURA 30 – gráfico da citotoxicidade do composto polivitamínico $\mathfrak{Z}$ -NERVE®

As amostras histológicas do grupo G4 apresentaram da região distal para a proximal uma desorganização do tecido ao longo do feixe, com intenso infiltrado inflamatório ao redor da lesão (I) como pode ser observado por microscopia óptica, FIG.31.

O tecido nervoso possui fascículos organizados e mais bem definidos quanto mais próximo do coto proximal. O coto distal demonstra uma desorganização com espaços vazios entre os fascículos caracterizando a degeneração Walleriana. Porém, ao redor da lesão há vasos sanguíneos e tecido inflamatório que caracterizam uma atividade de neoformação.

Figura 31 – Microscopia óptica da amostra do grupo G4. A imagem **A** ilustra o coto proximal e a seta indica a área do primeiro nó, a imagem **B** indica com a seta a área do segundo nó e, a imagem **C** a desorganização do coto distal. O infiltrado inflamatório (I) está presente em todos os cortes.

Em maior aumento, FIG.32, as estruturas evidenciadas na amostra do grupo G4 são:

- presença abundante de vasos sanguíneos (V),
- áreas com diversidade de células em diferenciação indicando a capacidade de regeneração do tecido (NEO),
- o aspecto rosado identifica o tecido conjuntivo que circunscreve as regiões separadas pelo nó (TC),
- no coto distal áreas com espaços vazios caracterizam a degeneração (VAZIO).
- fascículos orientados começam a se definir como indicam as setas em vermelho

FIGURA 32 – Imagem em microscopia óptica do grupo G4 da região da lesão causada pelo primeiro nó, referente ao coto proximal. Há espaços vazios (VAZIO) caracterizando a degeneração, presença de vasos sanguíneos (V), área de neoformação (NEO) iniciando uma organização das fibras (setas vermelhas) e, com coloração rosada o tecido conjuntivo (TC)

Na fase inicial do processo inflamatório o biomaterial age no controle do processo inflamatório agudo, o tecido reacional é abundante, mas a degeneração é controlada quando comparada com o grupo G3, permitindo a presença e a diferenciação de novas células propícias a regeneração. Propriedade essa favorecida pela capacidade do composto polivitamínico de modular o estresse oxidativo agudo após trauma cirúrgico⁸². Na imagem A, FIG.33 , observa-se

regiões neoformadas em processo de diferenciação celular ao longo do coto proximal, e na imagem B o coto distal ainda com regiões degeneradas mas com reorganização do tecido ao longo do feixe.

FIGURA 33 – microscopia óptica de amostra do grupo G4 com eutanásia de 30 dias, A imagem A representa o coto proximal e a imagem B o coto distal.

Na análise das amostras do grupo G4, por microscopia eletrônica de varredura é observado o coto distal, na eutanásia de quinze dias, com a camada externa destruída, com fascículos aparentes, imagem B, FIG.34. Com trinta dias após o procedimento cirúrgico a camada externa está mais organizada e contínua, imagem D, FIG.34, com células em potencial de neoformação.

FIGURA 34 – imagens das amostras em microscopia eletrônica de varredura do grupo G4. As setas brancas indicam a região dos nós, as setas pretas os cotos. Imagens A e B são imagens de eutanásia de quinze dias sendo que o coto distal apresenta desorganização da camada externa; as imagens C e D são das amostras com eutanásia de trinta dias, com destruição do epineuro no coto proximal na imagem C e características de regeneração do coto distal em D, pois a camada externa da estrutura apresenta-se com continuidade.

5.2.5) Histologia do grupo G5 - Laser

A terapia a laser de baixa intensidade é um método aceito pela Food and Drug Administration (FDA) para algumas aplicações na fisioterapia. É utilizada por ter o efeito de biomodulação e, com ele efeitos de analgesia e de reparo tecidual⁸³.

Na FIG.35 são apresentadas imagens de microscopia óptica da amostra do grupo G5 com eutanásia de quinze dias, abrangendo a região dos três nós, tanto do coto distal quanto proximal. Um tecido mais organizado está presente quando comparado com a mesma fase do grupo G4: há a presença de tecido inflamatório ao redor da lesão e de fibras colágenas delimitando bem as regiões dos nós.

FIGURA 35 – corte histológico do grupo G5. A imagem **A** representa o coto proximal e a região do primeiro nó, a imagem **B** representa a região do segundo nó e, a imagem **C** representa o coto distal com maior desorganização do feixe. Em todas as imagens **A**, **B** e **C** um tecido inflamatório abundante circunscreve as três regiões da lesão.

Na região entre os nós a presença abundante de vasos sanguíneos revela um potencial regenerativo do tecido lesado, FIG 36.

As imagens revelam uma organização do tecido com característica de neoformação das fibras, no sentido longitudinal. A região onde foi causada a lesão demonstra um tecido neoformado fechando quase que por completo a região comprimida pelo nó.

FIGURA 36 - imagem de microscopia óptica do grupo G5. Em maior aumento a histologia desta amostra demonstra a neoformação na região intermediária da lesão referente ao segundo nó.

No corte longitudinal os fascículos se apresentam definidos, FIG.37, como mostra a seta vermelha.

FIGURA 37 – imagem de microscopia de luz de um corte longitudinal do grupo G5 após 30 dias do procedimento onde os feixes revelam uma organização e direcionamento das fibras revelando a sua neoformação. A região onde foi dado o nó se apresenta com fechamento total.

Na microscopia eletrônica de varredura das amostras do grupo G5, após 15 dias do procedimento cirúrgico, os cotos proximal e distal apresentam uma desorganização ainda da camada externa que envolve o feixe. Nas amostras de 30 dias há uma continuidade do epineuro e a proteção da estrutura do feixe.

FIGURA 38– Imagens de microscopia eletrônica de varredura de uma estrutura do grupo G5. A imagem A e B são fotos sequenciadas envolvendo o coto proximal em A, o segmento intermediário e o segundo nó. Na figura B temos o coto distal. As imagens C e D se referem a microscopia eletrônica de varredura de um segmento do grupo G5 após 30 dias da cirurgia. A imagem C apresenta a continuidade da camada externa exibindo apenas uma área marcada pela região do nó. Já a imagem D demonstra uma pequena área de rompimento do perineuro, mas uma integridade da estrutura.

A radiação emitida pelo laser terapêutico afeta os processos metabólicos das células-alvo, produzindo efeitos bioestimulantes que resultam na ocorrência de eventos celulares e vasculares, interferindo diretamente no processo de reparo⁸⁴.

Os efeitos biomoduladores da laserterapia são^{85, 86}.

- influência na modulação de certos tipos celulares no processo de cicatrização;
- aumento da atividade mitótica, no número de fibroblastos, na síntese de colágeno e na neovascularização dos tecidos lesados;
- maior velocidade de reparo tecidual;
- aumento da proliferação celular e da vascularização;
- diminuição expressiva no número de células inflamatórias com um tecido de granulação mais organizado.

Sabe-se que a terapia é utilizada para estimular a regeneração e acelerar a reparação tecidual, neste caso do trabalho, a reparação ou modulação do nervo periférico, mas existem diferenças de protocolos de uso: radiação contínua ou pulsátil, dias subsequentes ou alternados, potência do laser. Em geral as publicações cujo tratamento utilizou o laser de emissão contínua apresentaram resultados positivos na regeneração nervosa periférica.

O aparelho utilizado neste experimento já apresenta o item “parestesia” determinado e, como foi descrito em materiais e métodos a radiação entregue foi tipo infravermelha.

Segundo o estudo de Gonçalves *et al.*⁸⁷ os efeitos da irradiação do laser 830 nm na regeneração do nervo isquiático de ratos, quando submetidos a esmagamento do feixe, apresentam a redução do processo inflamatório, juntamente com menor degeneração da bainha de mielina e menos infiltrado inflamatório. Estudos⁸⁸ que utilizaram o laser de baixa intensidade na regeneração de lesão nervosa periférica apresentam variação na densidade de energia de 0,086 J até 105 J; foram feitos em células isoladas e em experimentação em animais. Dentre os relatos avaliados como benéficos, pode-se observar uma “janela terapêutica” que varia de 0,6 J a 28,8 J⁸⁹.

Apesar disso, existem diversos estudos que utilizam o comprimento de onda de 660nm como revela o estudo de Reis *et AL*, que utilizaram (26,3 mW, 0,63 cm², 2,54 J) na recuperação do nervo isquiático de ratos após neurotome; os grupos foram tratados por 20 dias consecutivos, com densidade de energia de 4 J/cm² por 3 pontos na incisão cirúrgica, encontrando melhora significativa na avaliação morfométrica⁹⁰.

Uma consideração que justifica o uso do comprimento de onda deste trabalho surge a partir do conceito da produção de adenosina trifosfato (ATP). Nas células animais, os controles de gradiente de sódio e potássio controla o transporte de açúcares e aminoácidos, tornando as células nervosas e musculares eletricamente excitáveis. A possibilidade de a célula ter maior aporte energético durante o processo de reparação pode estar ligada à melhor resposta observada no uso do laser 660 nm, já que uma mitocôndria absorve seletivamente nesse comprimento de onda⁹¹.

A interação da luz laser com as biomoléculas depende de vários parâmetros físicos, sendo evidente a relação entre o comprimento de onda e a resposta biológica. As vias de ativação propostas para o laser de baixa intensidade levam em conta, majoritariamente, a sua ação sobre os cromóforos situados na mitocôndria e na membrana celular. A radiação vermelha apresenta uma ação preferencial na mitocôndria e a infravermelha sobre os cromóforos da membrana celular⁹².

Os resultados obtidos neste trabalho mostram uma organização do tecido nervoso nas amostras dos animais eutanasiados com quinze ou trinta dias.

5.2.6) Histologia do grupo G6 – laser e composto polivitamínico associados

Os resultados com a associação das terapias são ilustradas nas figuras abaixo, FIG.39. O grupo G6 apresentou as propriedades da laserterapia e do biomaterial associadas.

As imagens tomadas são do coto proximal para distal, ou seja, da imagem A para C. A seta preta indica a área do nó. Na imagem A referente ao coto proximal observa-se uma ilha de neoformação indicada pela seta vermelha, o tecido conjuntivo delimitando os cotos e um tecido inflamatório com abundantes vasos sanguíneos revela o potencial regenerativo desse tecido. A imagem B referente ao coto intermediário apresenta áreas vazias caracterizando a degeneração. Já o coto distal ilustrado pela imagem C apresenta características da degeneração com espaços vazios e desorganizados, ilha de neoformação indicado pela seta vermelha e espaços vazios que se referem tanto a artefatos de técnica durante a confecção da lâmina e características de degeneração.

A capacidade do tecido de se regenerar é revelada pela quantidade de vasos sanguíneos e pela organização linear dos fascículos.

FIGURA 39 - Imagem de microscopia óptica de cortes referentes à amostra do grupo G6 que sofreram eutanásia com 15 dias. As imagens A, B e C são sequenciadas e se referem aos nós (seta preta) do coto proximal para distal, o tecido inflamatório (TI) presente na região das lesões, ilhas de neoformação indicadas pela seta vermelha

Próximo ao coto proximal é possível observar em maior aumento tecido em neoformação caracterizando a regeneração do nervo, FIG.40. Abundante presença de vasos sanguíneos e um tecido conjuntivo espesso, com coloração rósea. Ilustram o potencial regenerativo do tecido.

FIGURA 40 - Imagem de microscopia óptica de uma amostra do grupo G6, com a presença de inúmeros vasos sanguíneos e tecido conjuntivo espesso corado em rosa

Na FIG.41 são apresentadas imagens de microscopia óptica de uma amostra do grupo G6 após trinta dias do experimento. A imagem A, em maior

aumento a imagem B, revelam o potencial regenerativo com a presença dos fascículos organizados e com “ilhas” de neoformação.

FIGURA 41 – Cortes referentes a eutanásia de 30 dias. Imagens A e B revelam ilhas de neoformação, onde em A a lesão já se apresenta com as fibras organizadas fechando a área vazia da degeneração e a imagem B as ilhas de neoformação se apresentam bem definidas.

Por microscopia eletrônica de varredura nas amostras desse grupo, os cotos proximais se apresentam preservados nas amostras de quinze e trinta dias, imagens A e C da FIG.42, aparentemente se apresentam preservados ou em processo de regeneração, mas os cotos distais, imagens B e D da FIG.42 apresentam áreas rompidas do epineuro, caracterizando a reorganização da camada externa do feixe.

Na avaliação por microscopia óptica de uma amostra deste grupo após trinta dias do início do experimento, o corte transversal do nervo demonstra que o coto proximal possui espaços vazios que correspondem a artefatos de técnica, mas há espaços que revelam a reorganização dos fascículos. O tecido conjuntivo delimita o epineuro e circunda a estrutura. Ao redor dos feixes, novas formações em formato de “ilhas” estão presentes, seta vermelha FIG.43.

FIGURA 42 – imagens de microscopia eletrônica de varredura com amostras do grupo G6. As setas brancas indicam a região dos nós, sendo que a imagem A representa a integridade do epineuro do coto proximal de uma amostra que sofreu eutanásia com quinze dias; a imagem B é referente ao coto distal da mesma amostra que apresenta o epineuro com áreas de descontinuidade; a imagem C representa o coto proximal da amostra deste grupo, com áreas de integridade e descontinuidade do epineuro na eutanásia de trinta dias; a imagem D desta amostra apresenta o epineuro com características de áreas de descontinuidade e reparo do coto distal na eutanásia de trinta dias.

FIGURA 43 – imagem de microscopia óptica da amostra do grupo G6 após trinta dias do procedimento cirúrgico. A imagem é um corte transversal próximo ao coto proximal com a presença de vasos sanguíneos e fascículos em reorganização. Ilhas de neoformação são identificadas pelas setas vermelhas.

As terapias utilizadas concomitantemente tiveram como resultados:

- o coto distal apresenta uma desorganização menos evidente quando comparada ao grupo da neuropraxia unicamente, tanto na amostra da eutanásia em quinze dias como em trinta dias;
- o tecido inflamatório ao redor da lesão se apresentou mais acentuado quando comparado ao grupo que utilizou apenas o laser, mas menos intenso quando comparado ao grupo que utilizou o biomaterial;
- as estruturas (epineuro, endoneuro, perineuro, fascículos) do tecido nervoso observadas em microscopia óptica se apresentam mais íntegras quando comparadas ao grupo que utilizou apenas o composto polivitamínico, ou o grupo que sofreu apenas a neuropraxia sem tratamento.

A associação das terapias estimulou células para a neoformação, propriedade está exacerbada pelo biomaterial, mas ao mesmo tempo não permitiu uma resposta inflamatória aguda tão intensa de acordo com os princípios da laserterapia que modula a reação inflamatória.

5.3) DIMENSÃO DA ÁREA DA DEGENERAÇÃO OU REGENERAÇÃO

Utilizando a microscopia óptica foram coletadas três medidas lineares na região do processo de regeneração do tecido que envolve a lesão, no sentido transversal ao nervo. Os dados foram coletados das amostras histológicas dos grupos G3, G4, G5 e G6 pelo programa *Image Pró-Plus*. As medidas são valores para quantificar a área tecidual neoformada envolvida no processo da lesão após os trinta dias desde o início do experimento, FIG.44.

FIGURA 44 – Esquema para visualização da tomada das três medidas transversais e consecutivas no mesmo fragmento

A imagem de microscopia óptica, FIG.45, corresponde a um corte longitudinal do grupo G4 que exemplifica a obtenção das medidas deste parâmetro para todos os grupos analisados, FIG.46. Os resultados são apresentados na TAB.3.

FIGURA 45 – imagem de microscopia óptica de uma amostra do grupo G4. Os traços em preto são as distâncias medidas entre as duas extremidades da lesão referente a um corte longitudinal.

TABELA 3 – valores obtidos de três distâncias, em μm , entre as extremidades de uma mesma amostra de cada grupo tratado

	G3	G4	G5	G6
Distância 1	1600	1895	920	930
Distância 2	235	1360	1250	2165
Distância 3	1225	2515	2360	1760
Distância média	1020	1923	1510	1618
Desvio padrão	575	471	615	514

FIGURA 46 – Gráfico da distância média transversal de uma mesma amostra de cada grupo para quantificar a região da regeneração do tecido nervoso na região da lesão. Os dados das medidas e desvio padrão estão na TABELA 3.

As terapias utilizadas como tratamentos dos grupos G4, G5 e G6, demonstram a formação de um tecido de reparação e regeneração maior quando comparadas ao grupo G3. Isso ocorre pela presença do tecido reacional modulado pelas terapias, pois estimulam a presença de novas células quando comparado ao grupo G3. Porém, o grupo G4 é o que apresenta maior medida da área, isto porque o processo inflamatório inicial é agudo e as células são atraídas para o local. O grupo G5, que recebeu a aplicação de laser, apresenta um valor próximo e menor quando comparado ao grupo G4 que utilizou o composto

polivitamínico, pois o efeito da luz no tecido estimulou a neoformação e reduziu o processo inflamatório inicial.

A menor medida obtida é referente ao grupo G3, pois o não tratamento da lesão favorece a degeneração do tecido nervoso periférico; o biomaterial no grupo G4 exacerba a proliferação celular para a posterior neoformação e, o laser no grupo G5 controla o processo inflamatório inicial para permitir que as células possam se regenerar. A associação das terapias no grupo G6 demonstra o estímulo e proliferação celular, concomitantemente, com o controle do processo inflamatório inicial, fornecendo uma medida intermediária entre os grupos G4 e G5.

As medidas adicionais do desvio padrão informam que as distâncias observadas no grupo G4 revelam menor amplitude quando comparadas às medidas dos demais grupos.

CONCLUSÕES

Neste capítulo são apresentadas as conclusões referentes ao trabalho desenvolvido

6) CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que:

- houve a interrupção do impulso nervoso na lesão causada pelos nós. A degeneração Walleriana esteve presente, descaracterizando o dano como só neuropraxia, mas como neurotmeose mas sem secção dos cotos e com a presença do perineuro;
- composto polivitamínico $\tilde{\text{U}}$ -NERVE® estimula e intensifica o processo inflamatório inicial, com potencial de atração celular. Nos primeiros quinze dias há a presença de um infiltrado inflamatório abundante e ao final dos trinta dias há um número maior de células em diferenciação . Propicia, então, uma quantidade maior de tecido neoformado em organização;
- o laser de baixa potência, nas condições deste trabalho, propicia tanto nos cortes histológicos de quinze e trinta dias uma regeneração contínua e progressiva, com infiltrado inflamatório reduzido e com um tecido organizado durante o processo regenerativo;
- as terapias laser e composto vitamínico associadas apresentam nos primeiros quinze dias uma organização maior do que o grupo G4 que utilizou só o composto, e menor do que o grupo G5 que só utilizou laser. Devido ao estímulo do biomaterial, células de neoformação são mais evidentes tanto nos grupos de quinze, como no de trinta dias, quando comparados com o grupo só com laser. A neoformação foi estimulada, aumentando a quantidade de células em diferenciação, mas devido a ação do laser não houve a desorganização intensa inicial;
- a degeneração Walleriana quando biomodulada favorece a regeneração nervosa em nervos periféricos.

O não tratamento das lesões nervosas comprometerá o prognóstico favorável, originando danos que podem ser permanentes.

Todas as terapias utilizadas mostram a capacidade de modular a degeneração Walleriana e favorecer a regeneração. O potencial de regeneração nervosa é mais vantajoso quando há a associação das terapias, pois o laser

favorece a modulação do processo inflamatório e o composto polivitamínico 3-*NERVE*® estimula a captação de novas células. Ambos favorecem condições de diferenciação celular e neoformação.

ANEXOS

ANEXO A

Especificações Técnicas do aparelho de Laser III DMC®:

- Emissor visível (laser vermelho)
Comprimento de onda: 660-690nm
Potência Real do Emissor: 100mW
Dose 1J (Joule) Fluência 35J/cm²
Dose 2J (Joule) Fluência 70J/cm²
Dose 4J (Joule) Fluência 140J/cm²
Meio Ativo: InGaAlP
- Emissor invisível (laser infravermelho)
Comprimento de onda: 790-830nm
Potência Real do Emissor: 100mW
Dose 1J (Joule) Fluência 35J/cm²
Dose 2J (Joule) Fluência 70J/cm²
Dose 4J (Joule) Fluência 140J/cm²
Meio Ativo: GaAlAs

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ CORADAZZI, L. F.; JUNIOR, E. M.; CAMARINI, E. T.; CARVALHO, P. S. P. Parestesia do nervo lingual durante exodontia de terceiros molares inferiores – relato de caso clínico. **JBC**, v.18 p.35-37, 1999.
 - ² NARI, H. FILHO; GONÇALVES E.S.; RIBEIRO P.D. JR – Acidentes e complicações em exodontias - **Revista Biodonto publicações científicas**- vol 1, número 4 – 2004
 - ³ EPEIBAUN, E - **Tratamento de deficiência neurosensorial por laser de baixa intensidade e sua associação à acupuntura a laser** – dissertação para título de mestrado no Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares – USP – 2007.
 - ⁴ BETONI JUNIOR, W; ESTEVES, J. C.; QUEIROZ, T. P. - Lateralização de nervo alveolar inferior - compreendendo e desmistificando a técnica cirúrgica – **Implant News**;9(3):376, 2012.
 - ⁵ ALLEGRETE C. E. **Eficácia da articaína, da lidocaína e da mepivacaína associadas a epinefrina em pacientes com pulpite irreversível em molares mandibulares** – tese de doutorado apresentada na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – 2012.
 - ⁶ ALVES, F. R.; COUTINHO, M. S.; GONÇALVES, L. S. - Endodontic-Related Facial Paresthesia: **Systematic Review J Can Dent Assoc**; 80:e13, 2014.
 - ⁷ Fonte: www.wikipedia.org – **Parestesia**- acessado em dezembro de 2012.
 - ⁸ Fonte: www.anatpat.unicamp.br – **Histologia**-acesso em fevereiro de 2015
 - ⁹ SALLES, M. B.- **Micro elementos funcionais alterando a Biologia do Polímero de poliuretana de mamona em enxertos ósseos – estudo desenvolvido em cães**. Apresentação para título de mestre no Instituto Ciências Biológicas – USP – 2001
 - ¹⁰ Microscopia On line - Sistema Nervoso - **www.icb.usp.br** – acesso em março de 2015
 - ¹¹ GUYTON, ARTHUR C.; HALL, JO - **Tratado de Fisiologia Médica - 12ª Ed.** – Editora Elsevier - 2011
 - ¹² POPOVIC MR, THRASHER TA. Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering. **New York: Informa Healthcare**; p. 1056-65, 2004.
 - ¹³ TEJADA-SIMON MV, HONG J, RIVIERA et AL. Reactivity pattern and cytokine of T cells primed by myelin peptides in MS and healthy individuals. **Eur J Immunol** ; 31: 907-917, 2001.

-
- ¹⁴ DONAT JR, WISNIEWSKY HM. The spatio-temporal pattern of Wallerian degeneration in mammalian peripheral nerves. **Brain Res**;53:41-53.1973.
- ¹⁵ MONTEIRO M, R; KANDATRAVICIUS L; LEITE J,P; O papel das proteínas do citoesqueleto na fisiologia celular normal e em condições patológicas – **J Epilepsy and Clinic Neurophysiology**; 17(1): 17-23, 2011.
- ¹⁶ CHIMELI , L. Neuropatias genéticas na infância. **Arquivo Neuropsiquiátrico** 54 (3); 510-518, 1996.
- ¹⁷ PARK BS et al; Jung JHydrogen sulfide is essential for Schwann cell responses to peripheral nerve injury - **J Neurochem**;132(2):230-42, Jan 2015.
- ¹⁸ LEVY, Beatriz de Freitas Azevedo. **Efeitos das células de schwann cultivadas e tratadas com o pedf no trofismo de neurônios medulares cultivados e na recuperação motora de ratos submetidos ao trauma contuso da medula espinal pelo impactor**. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Comportamento) - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- ¹⁹ JUNQUEIRA L, C.; CARNEIRO J – **Histologia Básica** – 12ª edição, cap 4, Editora Guanabara Koogan – 2013
- ²⁰ KROGH, P. H. J.; WORTHINGTON, P.; DAVIS, W. H.; KELLER, E. E. Does the risk of complication make transpositioning the inferior alveolar nerve in conjunction with implant placement a “last resort” surgical procedure? **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.9 p.249-254, 1994.
- ²¹ SHIN YH et al Adenosine 5'-triphosphate (ATP) inhibits schwann cell demyelination during Wallerian degeneration. **Cell Mol Neurobiol**;34(3):361-8, Apr 2014.
- ²² DUBOVÝ P; JANCÁLEK R; KUBEK Trole of inflammation and cytokines in peripheral nerve regeneration, **Inte Rev Neurobiol**, 108: 173-206, 2013
- ²³ CRONE, C; KRARUP, C, **Neurophysiological approach to disorders of peripheral nerve**, Vol 115, Pages 81–114, 2013.
- ²⁴ SILVA P.G.C – **Estudo do trato protocerebral de caranguejos *Ucides cordatus* após degeneração: análise morfo-funcional das células recrutadas** – dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – 2010.
- ²⁵ GEORGE E B et al Axotomy induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion specific channels. **J Neurosci**, 15: 6445-52, 1995.

-
- ²⁶ CARRILHO PE, BARBOSA ER. Progressive supranuclear palsy in a sample of Brazilian population: clinical features of 16 patients. **Arq Neuropsiquiatria**, 60:917-922, 2002.
- ²⁷ DONOFF R B; GUARANILCK W – The application Microneurosugery to Oral – neurologic problems – **J Oral Maxillofac Sug**, 40(3): 156-9, 1982.
- ²⁸ GRANT G A, GODICKIN R, KLIOT M, Evolution and Surgical management peripheral nerve problems. **Neurosugery**, 44(4): 825-40, 1999.
- ²⁹ BORIN, Andrei et al. Influence of cyclic AMP on facial nerve regeneration in rats. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 5, p. 675-683, 2008.
- ³⁰ ZANON, R. G. et al. Expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I) no sistema nervoso central: plasticidade sináptica e regeneração. **Columna**, v. 9, n. 2, p. 193-198, 2010.
- ³¹ COSTA, M. P. et al. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortop Bras**, v. 14, n. 1, p. 25-9, 2006.
- ³² BENOWITZ, L. I.; PERRONE-BIZZOZERO, N I. The expression of GAP-43 in relation to neuronal growth and plasticity: when, where, how, and why?. **Progress in brain research**, v. 89, p. 69-87, 1991.
- ³³ ENDO, C. et al. A laserterapia de baixa intensidade acelera a regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortop Bras**, v. 16, n. 5, p. 305-10, 2008.
- ³⁴ NADIA, L. M.; COLOMÉI C., G., et al. "Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone." **Ciência rural** 38.9,p 2529-2534, 2008.
- ³⁵ SEVERO M, S; Fisiologia do trauma e da compressão à medula espinhal de cães e gatos – **Revista Medicina Veterinária editada pelo Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco** – vol 1(2) – 2007.
- ³⁶ TOLEDO, G.L. - **Enxerto com tubo de polietileno poroso preenchido com gordura autóloga no reparo de nervo periférico: uma nova proposta** – tese de mestrado da Faculdade de Odontologia de Bauru em 2011.
- ³⁷ PACHIONI, C. A. S., MAZZER, N., BARBIERI, C. H., FAZAN, V. P. S., PADOVANI, C. R., MORO, C. A., & SILVA, C. A. A. D.. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. **Acta Ortop Bras**, 14(4), 203-7 (2006).
- ³⁸ RASO,M; VILELA, V et al. "Uma nova pinça regulável para a produção de lesões por esmagamento do nervo ciático do rato"; **Acta ortop. bras** 17.4 (2009): 236-238.

-
- ³⁹ GUEDERT, D. G. **Avaliação das repercussões do exercício físico sobre a regeneração nervosa de ratos Wistar submetidos a axonotmese do nervo isquiático**. Diss. Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.
- ⁴⁰ COLLI, BENEDICTO OSCAR, AND C. G. CARLOTTI JÚNIOR. "Aspectos gerais das lesões traumáticas agudas nos nervos periféricos." **Arq Bras Neurocirurg** 12: 171-200,1993.
- ⁴¹ NUNEZ, S; RIBEIRO, M S; segundo, Aguinaldo. **Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**. Vol1, cap 5; ed Elsevier Brasil, 2012.
- ⁴² RIBEIRO M. S, ZECELL D.M, Laser de Baixa Intensidade - **A Odontologia e o Laser** v1; p 217, 2004.
- ⁴³ <http://www.nupen.com.br> – **Laser infravermelho** -acessado em fev de 2014
- ⁴⁴ MESTER E, SZENDE B, GARTNER P. The effect of laser beams on the growth of hair in mice. **Radiobiol Radiother (Berl)**; 9(5):621-6, 1968.
- ⁴⁵ ROELANDTS R. The history of phototherapy: something new under the sun? **J Am Acad Dermatol.**; 46(6):926-30, 2002.
- ⁴⁶ SUTHERLAND JC. Biological effects of polychromatic light. **Photochem Photobiol.**; 76(2):164-70, 2002.
- ⁴⁷ COTRAN R, KUMAR V,COLLINS T. **Robbins Patologia estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro , Editora Guanabara Koogan , p 1251, 2000.
- ⁴⁸ KARU T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. **J Photochem Photobiol B.**; 3(4):638-40, 1989.
- ⁴⁹ HASHMI JAVAD T et al. PM R.- Role of Low-Level Laser **Therapy in Neurorehabilitation** ; 2(12 Suppl 2): S292–S305,2010.
- ⁵⁰ KARU T.I, AFANAS'EVA N.. Cytochrome c oxidase as the primary photoacceptor upon laser exposure of cultured cells to visible and near IR-range light. **Dokl Akad Nauk.** 342(5):693-5, 1995.
- ⁵¹ ANDERS, J J.; SALOPEK, M. Meningeal cells increase in vitro astrocytic gap junctional communication as measured by fluorescence recovery after laser photobleaching. **Journal of neurocytology**, v. 18, n. 2, p. 257-264, 1989.
- ⁵² WANG T, ZHANG X, LI JJ. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. **Int Immunopharmacol.** 2(11):1509-20, 2002.

-
- ⁵³ BAICHWAL VR, BAEUERLE PA. Activate NF-kappa B or die? **Curr Biol.**; 7(2):R94-6, 1997.
- ⁵⁴ D'ANGIO CT, FINKELSTEIN JN. Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. **Mol Genet Metab.**; 71(1-2):371-80, 2000.
- ⁵⁵ LI N, KARIN M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? **FASEB J.**; 13(10):1137-43, 1999.
- ⁵⁶ REMES, A.; WILLIAMS, D. F. Immune response in biocompatibility. **Biomaterials**, v. 13, n. 11, p. 731-743, 1992.
- ⁵⁷ PARK J, LAKES R S **Biomaterials – An Introduction. Springer** 3ª edição; p 2, 2007.
- ⁵⁸ WILLIAMS DF- On the nature of biomaterials- **Biomateriais** 30, 5897-5909, 2009.
- ⁵⁹ GÁLIA C A, et al “Uso de enxerto homólogo e heterólogo em diáfase femoral de ratos: comparação entre enxerto ósseo congelado e liofilizado” **Revista Brasileira de Ortopedia e Traumatologia**, vol15, março de 2005.
- ⁶⁰ ÓREFICE R. L, PEREIRA M.M, MANSUR H. S. – **Biomateriais** – edição 1, 2012
- ⁶¹ MORAES, P C et al. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. **Acta Cir Bras** v. 19, 2004.
- ⁶² AVÉS, E. P., et al. "Coating of Ti-6Al-4V alloy with hydroxyapatite by using sol-gel method and its application to non-cemented femoral stem." **Cerâmica** 54.332, 476-479, 2008.
- ⁶³ Biomateriais - <http://biofabris.com.br/pt/biomateriais> - acesso abril de 2015.
- ⁶⁴ ROGERO, SIZUE OTA, et al. "Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias." **Materials Research** 6.3: 317-320, 2003.
- ⁶⁵ INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-5 Biological Evaluation of medical devices- Part 5 – **Tests for in vitro cytotoxicity - Geneva: Organization Standardization**, 2009.
- ⁶⁶ ROGERO, Sizue Ota et al . Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res. São Carlos**, v. 6, n. 3, p. 317-320, June 2003 .

-
- ⁶⁷ BRESSIANI A.H., BRESSIANI J. C., YOSHIMOTO M., SALLES M. B. – Avaliação histológica da regeneração nervosa – **Brazilian Journal of Health** – vol1 (1) p 10-21 - 2010.
- ⁶⁸ ALLEGRINI JR, S. ; FANGHANEL, J. ; RUMPEL, E. ; KAUSCHKE, E. ; KÖNIG JUNIOR, B. . Interaction between smooth titanium implants and new bone formation in the rabbit s tibia. **Annals of Anatomy** , Alemanha, v. 188, n.2, p. 143-151, 2006.
- ⁶⁹ SALLES, M. B.- **Avaliação do estresse oxidativo agudo após trauma cirúrgico realizado em tecido ósseo de ratos Wistar**. Diss. Universidade de São Paulo, 2007.
- ⁷⁰ DEDAVID, Berenice Anina; GOMES, Carmem Isse; MACHADO, Giovanna. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. **EDIPUCRS**, 2007.
- ⁷¹ ALLEGRINI JUNIOR S., YOSHIMOTO M., SALLES M. B., ALLEGRINI M.R. F., PISTARINI L. C. Y., BRAGA F. J. C, BRESSIANI A. H . A.- Evaluation of bone tissue reaction in laser beamed implants - **Applied Surface Science** 307; 503–512, 2014 .
- ⁷² RAVI, R.; BEDI,A. NFkB in câncer – a friend turned foe. **Drug. Resistance Uptades.**, v.7, p. 53-67, 2004.
- ⁷³ KHADRA M., RONOLD H.J.; LYNGSTADAAS S.P.; ELLING- SEM J.E.; HAANAES H.R.. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. **Clin Oral Implants Res**, 15(3): 325-32, 2004.
- ⁷⁴ PACHIONI, C. A. S., MAZZER, N., BARBIERI, C. H., FAZAN, V. P. S., PADOVANI, C. R., MORO, C. A., & SILVA. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. **Acta ortop bras**, 14(4), 203-7, 2006.
- ⁷⁵ DE ABREU, M. F., FAGUNDES, D. S. Ação da irradiação laser de baixa frequência (Illt) sobre os mecanismos celulares envolvidos na reparação de tecido nervoso periférico. **Revista científica Faema**, 2(2), 80-96, 2011.
- ⁷⁶ ENDO, CRISTINA. **Estudo dos efeitos do tratamento com laser num modelo experimental de lesão nervosa por esmagamento do nervo ciático em ratos**. Diss. Universidade de São Paulo, 2002.
- ⁷⁷ OLIVEIRA, F. B., PEREIRA, V. M. D., TRINDADE, A. P. N. T. D., SHIMANO, A. C., GABRIEL, R. E. C. D., & BORGES. Action of therapeutic laser and ultrasound in peripheral nerve regeneration. **Acta ortopedica brasileira**, 20(2), 98-103, 2012.

⁷⁸YOSHIMOTO, M. **Manual Cirúrgico da Lateralização do Nervo Alveolar Inferior** – Editora Santos -vol1- cap10- p 93-106, 2013.

⁷⁹ ROCHA T, CARLOS J. "Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogenese". **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**: 44-48, 2004.

⁸⁰ SEDDON H.J. Three types of nerve injury. **Brain**, 66: 247-288, 1943

⁸¹ International Standard ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices. Parts 5: Tests for in vitro cytotoxicity - **Geneva: International Organization for Standardization**: 2009.

⁸² KOMIVES, E, Funtional Consequences of intrinsic Disorder in the NFKB – IKB interation, **Biophysical Journal**, volume 100, Issue 3 , Supplement 1, 2, p 5a february 2011.

⁸³ RIBEIRO, Martha Simões; ZECELL, Denise Maria. Laser de baixa intensidade. Gutknecht N, Eduardo CP. **A odontologia e o laser, a atuação do laser na especialidade odontológica**, v. 1, p. 217-40, 2004.

⁸⁴ LINS, R. D. A. U., DANTAS, E. M., LUCENA, K. C. R., CATÃO, M. H. C. V., GRANVILLE-GARCIA, A. F., & CARVALHO NETO, L. G. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. **Anais brasileiros de dermatologia**, 85(6), 849-855, 2010.

⁸⁵ YU W. The effects of photo-irradiation on the secretion of Tgf and pdgf from fibroblast in vitro. **Lasers surg med suppl.**;6:8, 1994.

⁸⁶ JÚNIOR, A. R., OLIVEIRA, R. D., FARIAS, R. E., ANDRADE, L. D., & AARESTRUP, f. M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **An bras dermatol**, 81(2), 150-6, 2006.

⁸⁷ GONÇALVES RB, MARQUES JC, MONTE-RASO VV, ZAMARIOLI A, CARVALHO LC. Efeitos da aplicação do laser de baixa potência na regeneração do nervo isquiático de ratos. **Fisioter pesq**;17:(1)34-9, 2010.

⁸⁸ ANDRAUS, R. A. C., BARBIERI, C. H., & MAZZER, N. A irradiação local com o laser de baixa potência acelera a regeneração do nervo fibular de ratos. **Acta ortop. Bras**, 18(3), 152-157, 2010.

⁸⁹ BARBOSA, R. I., MARCOLINO, A. M., GUIRRO, R. R. D. J., MAZZER, N., BARBIERI, C. H., & FONSECA. Efeito do laser de baixa intensidade (660 nm) na regeneração do nervo isquiático lesado em ratos. **Fisioter pesq**, 17(4), 294-299, 2010.

-
- ⁹⁰ REIS FA, BELCHIOR ACG, NICOLAU RA, FONSECA TS, CARVALHO PTC. Efeito da terapia com laser de arsenieto de gálio e alumínio (660nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotome seguida de anastomose epineural: análise funcional. **Rev bras fisioter**;12(3):215-21, 2005.
- ⁹¹ MANTEIFEL VM, KARU Ti. Structure of mitochondria and activity of their respiratory chain in successive generations of yeast cells exposed to he-ne laser light. **Izv akad nauk ser biol.**;32:556-66, 2005
- ⁹² AMAT A, RIGAU J, WAYNANT RW, ILEV IK, ANDERS JJ. The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: a hypothesis of mechanism. **J photochem photobiol** ;82(2):152-60; 2006.