



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Melissa de Almeida Melo Maciel Mangueira

Efeito da Terapia Laser de Baixa Intensidade em modelo experimental após lesão do nervo ciático avaliados por meio da espectroscopia Raman

Rio de Janeiro - RJ

2019

Melissa de Almeida Melo Maciel Mangueira

Efeito da Terapia Laser de Baixa Intensidade em modelo experimental após lesão do nervo ciático avaliados por meio da espectroscopia Raman

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Egas Caparelli Moniz de Aragão Dáquer

Coorientador: Prof. Dr. Nilton Maciel Mangueira

Rio de Janeiro - RJ

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M277 Mangueira, Melissa de Almeida Melo Maciel.
Efeito da Terapia Laser de Baixa Intensidade em modelo experimental
após lesão do nervo ciático avaliados por meio da espectroscopia Raman
/ Melissa de Almeida Melo Maciel – 2019.
100 f.

Orientador: Egas Caparelli Moniz de Aragão Dáquer.
Coorientador: Nilton Maciel Mangueira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Nervo ciático - Teses. 2. Nervos Periféricos - Teses. 3. Nervo
Isquiático - Teses. 4. Análise Espectral Raman. I. Dáquer Egas Caparelli
Moniz de Aragão. II. Mangueira, Nilton Maciel. III. Universidade do Estado
do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 612.8

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou
parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Melissa de Almeida Melo Maciel Mangueira

Efeito da Terapia Laser de Baixa Intensidade em modelo experimental após lesão do nervo ciático avaliados por meio da espectroscopia Raman

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 19 de dezembro de 2019.

Orientador: Prof. Dr. Egas Caparelli Moniz de Aragão Dáquer
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Flávio Nigri
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Elington Lannes Simões
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Flávia Castelo Branco Vidal
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Nilton Maciel Mangueira
Universidade Federal do Maranhão

Rio de Janeiro
2019

DEDICATÓRIA

À minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus agradeço pela oportunidade para que tudo isso acontecesse e por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

À Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ, pelo apoio e oportunidade proporcionados.

Quero agradecer ao meu professor orientador, Prof. Dr. Egas Caparelli Moniz de Aragão Dáquer, pelo empenho dedicado à pesquisa.

A meus pais que, apesar de todas as dificuldades, me ajudaram na realização do meu sonho.

A meu esposo Nilton e a nossos filhos Larissa Emily e Matheus, agradeço pelo carinho e apoio - não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Aos meus amigos de trabalho e parceiros de estudo, em especial, à Cristiane, Carina e Cláudia por toda a ajuda e apoio durante esse período tão importante da minha formação acadêmica.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização da minha pesquisa.

Só é verdadeiramente digno da liberdade, bem como a vida, aquele que se empenha em conquistá-la.

Johann Goethe

RESUMO

MANGUEIRA, Melissa de Almeida Melo Maciel. *Efeito da Terapia Laser de Baixa Intensidade em modelo experimental após lesão do nervo ciático avaliados por meio da espectroscopia Raman*. 2019. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Lesões de nervos periféricos podem ocasionar diversos comprometimentos, principalmente morfofuncionais, e o processo de regeneração desse tecido ocorre lentamente. A Terapia Laser de Baixa Intensidade (TLBI) proporciona efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, e, sobretudo, regeneração do tecido nervoso. Objetiva-se avaliar alterações biomoleculares, por meio da Espectroscopia Raman (ER), em modelo experimental de lesão do nervo ciático após terapia laser de baixa intensidade. Foram utilizados 64 ratos da linhagem Wistar, todos submetidos à lesão por esmagamento do nervo ciático direito, divididos em quatro grupos de intervenção (Controle 1, Controle 2, Laser 660 nm e Laser 808 nm), foram subdivididos em duas etapas de tratamento (14 e 21 dias), totalizando oito grupos de oito animais cada. Todos os grupos foram avaliados pelo teste de sensibilidade dolorosa e pelo Índice Funcional do Ciático (IFC), respectivamente nos períodos: pré-operatório; e no primeiro, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro Dia de Pós-operatório (DPO), esse apenas para o grupo 21 dias. Os espectros Raman, foram obtidos em três pontos diferentes do nervo, com resolução espectral de 2 cm^{-1} , na faixa espectral de $1000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, para identificar as características do tecido avaliado. Todos os animais apresentaram déficit sensoriomotor na pata direita após lesão do nervo ciático. Na Análise do Componente Principal (PCA) foi observado a composição bioquímica do nervo, com evidência de esfingolipídios, fosfolipídios, glicoproteínas. Nota-se maior concentração de componentes da bainha de mielina nos grupos tratados com TLBI. O IFC evidenciou que todos os grupos submetidos a lesão do nervo ciático apresentaram prejuízo da marcha, com melhora a partir do 14º DPO, com melhor recuperação para os grupos tratados com laser, principalmente o grupo Laser 660 nm. A espectroscopia Raman foi capaz de identificar a mudança na composição bioquímica dos diferentes grupos, indicando melhores resultados na recuperação após lesão de nervo periférico com TLBI, com aumento de células de Schwann e reconstituição da bainha de mielina.

Palavras-chave: Nervo periférico. Laser. Espectroscopia Raman.

ABSTRACT

MANGUEIRA, Melissa de Almeida Melo Maciel. *Effect of low intensity laser therapy on experimental model after sciatic nerve injury evaluated by Raman spectroscopy*. 2019. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Peripheral nerve injury can cause various impairment, especially morphofunctional, and the regeneration process of this tissue occurs slowly. A low-level laser therapy (LLLT) provides anti-inflammatory, analgesic and especially nerve tissue regeneration effects. The objective of this study was to evaluate biomolecular alterations by means of Raman Spectroscopy (RE) in the experimental model of sciatic nerve injury after low-level laser therapy. Sixty-four Wistar rats, all submitted to right crush injury, were divided into four intervention groups (Control 1, Control 2, laser 660 nm and laser 808 nm), subdivided into two stages (14 and 21 days), totaling eight groups of eight animals each. All groups underwent a painful sensitivity test and the Functional Science Index (IFC), respectively in the periods: preoperative; and on the first, seventh, fourteenth and twenty-first postoperative days (POD), this only for the 21-day group. Raman spectra were captured at three different points of the nerve, with a spectral resolution of 2 cm⁻¹, in the spectral range of 1000-4000 cm⁻¹, to identify the characteristics of the tissue used. All animals include sensory deficit on the right side after sciatic nerve injury. Principal component analysis (PCA) was observed in the biochemical composition of the nerve, with evidence of sphingolipids, phospholipids, glycoproteins. Higher concentration of myelin sheath components is noted in active groups with TLBI. SFI showed that all groups that were submitted to sciatic nerve injury had gait impairment, with improvement only after 14 days, the Laser group 660 nm presenting the best recovery. Raman spectroscopy was capable of identify biochemical changes from different groups, indicating better recovery of peripheral nerve injury after LLLT, with proliferation of Schwann cells and myelin sheath reconstitution.

Keywords: Sciatic nerve. Laser. Raman spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ilustração representando o nervo normal e as três categorias da classificação de Seddon para lesões de nervos periféricos	22
Figura 2 -	Classificação de Sunderland para as lesões nervosas periféricas.....	23
Figura 3 -	Representação esquemática da degeneração Walleriana e regeneração nervosa.....	26
Figura 4 -	Ilustração com a identificação dos diversos comprimento de onda do espectro de luz visível.....	30
Figura 5 -	Esquema de níveis de energia.....	35
Figura 6 -	Esquema de composição e definição dos grupos da pesquisa.	41
Figura 7 -	Processo cirúrgico de lesão do nervo ciático.....	42
Figura 8 -	Ilustração de padronização referencial das medidas do IFC21 na impressão digital das patas traseiras dos ratos na superfície de apoio da passarela de vidro.....	44
Figura 9 -	Ilustração mostrando a aplicação da TLBI. Animal contido manualmente e aplicador laser perpendicular à superfície a ser tratada.....	45
Figura 10 -	Ilustração do processo de coleta dos espectros Raman.....	47
Figura 11 -	Avaliação da marcha dos animais, por meio do IFC, nos grupos tratados por 14 dias (a) e 21 dias (b), com mensurações antes e depois da lesão por compressão do nervo ciático.....	50
Figura 12 -	Impressão digital, sobre a superfície da passarela de vidro, comparando a posição dos artelhos (destaque dos pontos amarelos) entre os grupos controle e tratados com laser com as avaliações pré-operatória e pós-operatórias (1 ^o , 7 ^o , 14 ^o e 21 ^o DPO).....	52
Figura 13 -	Principais bandas/picos espectrais da espectroscopia Raman dos principais componentes bioquímicos presentes no nervo ciático dos grupos tratados por 14 (A) e por 21 dias (B), respectivamente.....	53

Tabela 1 -	Bandas Raman e seus respectivos componentes químicos presentes no nervo ciático, identificados após aplicação do PCA.....	54
Figura 14 -	Principais bandas Raman dos componentes bioquímicos presentes no nervo ciático nos quatro primeiros componentes principais (PC1-PC4, à esquerda) e dos seus respectivos escores (SC1-SC4, à direita).....	57
Figura 15 -	Principais bandas Raman dos componentes bioquímicos presentes no nervo ciático nos últimos quatro componentes principais (PC4-PC8, à esquerda) e dos seus respectivos escores (SC4-SC8, à direita).....	59
Figura 16 -	Correlação da composição bioquímica do nervo ciático resultante dos quatro primeiros componentes principais (PC1-PC4) com a recuperação neurofuncional da marcha dos animais (IFC) mensurada no 14 ^o DPO (à esquerda) e no 21 ^o DPO (à direita).....	60
Figura 17 -	Correlação da composição bioquímica do nervo ciático resultante dos quatro últimos componentes principais (PC5-PC8) com a recuperação neurofuncional da marcha dos animais (IFC) mensurada no 14 ^o DPO (à esquerda) e no 21 ^o DPO (à direita).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS

Ach	Acetilcolina
ATP	Adenosina trifosfato
C	Átomo de carbono
Ca ²⁺	Íon cálcio
CC	Radical orgânico com ligação molecular entre dois átomos de carbono (C=C)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Anima
CH	Radical orgânico de carbono monovalente
CH ₂	Radical orgânico de carbono bivalente
CH ₃	Radical orgânico de carbono tetravalente
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONT1_14	Grupo Controle um - experimento de 14 dias
CONT1_21	Grupo Controle um - experimento de 21 dias
CONT2_14	Grupo Controle dois - experimento de 14 dias
CONT2_21	Grupo Controle dois - experimento de 21 dias
DNA	<i>Desxyribonucleic acid</i>
DPO	Dia de Pós-operatório
ECN	Estudo da condução nervosa
E	Pata lesada
ENMG	Eletroneuromiografia
ER	Espectroscopia Raman
FCN	Fator de Crescimento Nervoso
ICB/USP	Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo
IFC	Índice Funcional do Ciático
IP	Intraperitoneal
IT	<i>Intermediate Toes</i> (distância transversal entre o segundo e o quarto dedos)
L660_14	Grupo Laser de 660 nm - experimento de 14 dias
L660_21	Grupos Laser de 660 nm - experimento de 21 dias
L808_14	Grupos Laser de 808 nm - experimento de 14 dias
L808_21	Grupos Laser de 808 nm - experimento de 21 dias

LACEMA	Laboratório de Cirurgia Experimental do Maranhão
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission Radiaton</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LNP	Lesão do nervo periférico
MEC	Matriz extracelular
-N=N-	Átomo de Nitrogênios
Na+	Íon Sódio
N	Pata Normal
PC	Componente principal
PCA	Análise do componente principal
PL	<i>Print Length</i> (distância longitudinal entre a ponta do dedo mais longo e o calcanhar)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
IRM	Imagem por Ressonância Magnética
S	Átomo Enxofre
SC	Escore do componente
SED	Sensibilidade Exteroceptiva Dolorosa
TLBI	Terapia Laser de Baixa Intensidade
TS	<i>Toe Spread</i> (distância transversal entre o primeiro e o quinto dedos)
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

Cm	Centímetro
cm ⁻¹	Centímetro elevado a menos um (unidade comprimento de onda)
cm ²	Centímetro quadrado
G	Gramma (unidade de massa)
J	Joule (unidade de energia)
J/cm ⁻²	Unidade de densidade de energia ou fluência
Kg	Quilograma (unidade de massa)
Mg	Miligrama (unidade de massa)
ml	Mililitro (unidade de volume)
Mm	Milímetro (unidade de comprimento)
mW	Miliwatt (unidade de potência)
Nm	Nanômetro (unidade de comprimento)
λ	Lambda (comprimento de onda)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	18
1.1	Objetivo geral	18
1.2	Objetivos específicos	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	Neurônios periféricos	19
2.2	Lesão do nervo periférico	20
2.2.1	<u>Conceito</u>	20
2.2.2	<u>Epidemiologia</u>	20
2.2.3	<u>Quadro clínico e classificação</u>	21
2.2.4	<u>Processo de lesão e reparação do nervo periférico</u>	23
2.2.5	<u>Recursos diagnósticos e terapêuticos</u>	27
2.2.6	<u>Prognóstico</u>	29
2.3	Terapia Laser de Baixa Intensidade	29
2.3.1	<u>Conceito</u>	29
2.3.2	<u>Interação da terapia fotodinâmica com o tecido biológico</u>	30
2.3.3	<u>Parâmetros terapêuticos associados</u>	32
2.3.4	<u>Indicações terapêuticas do laser</u>	33
2.4	Espectroscopia Raman (ER)	33
2.4.1	<u>Princípios básicos da ER</u>	34
2.4.2	<u>Vantagens e desvantagens da ER</u>	36
2.4.3	<u>Aplicações da ER em nervos periféricos</u>	36
3	Materiais e métodos	39
3.1	Aspectos éticos	39
3.2	Animais e desenho experimental	39
3.2.1	<u>Amostra</u>	39
3.2.2	<u>Definição dos grupos</u>	40
3.2.3	<u>Procedimentos cirúrgicos</u>	41
3.3	Testes de sensibilidade exteroceptiva dolorosa (SED)	42
3.4	Análise funcional da marcha	43
3.5	Terapia laser de baixa intensidade (TLBI)	44
3.6	Eutanásia	45

3.7	Espectroscopia Raman	45
3.8	Análise estatística	47
4	RESULTADOS	49
5	DISCUSSÕES	63
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXO A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMA.....	89
	ANEXO B – Formato final do 1 ^o artigo científico submetido.....	89

INTRODUÇÃO

Em razão da vulnerabilidade própria dos nervos periféricos, as neuropatias periféricas possuem etiopatologia heterogênea com prevalência de causas traumáticas, mas podem ser decorrentes de outras causas, tais como: infecções, tumores, agentes tóxicos, neuropatias metabólicas e genéticas^{1,2}. A lesão do nervo periférico (LNP) geralmente resulta em perda parcial ou total das funções motoras, sensoriais e autonômicas, levando à incapacidade funcional e invalidez³, caracterizando alterações morfológicas do axônio e da bainha de mielina, ou de ambos^{4,5}.

As LNP são classificadas em: a) neuropraxia - lesão leve com perda motora e sensitiva, com alteração apenas da bainha de mielina; b) axonotmese - perda de continuidade axonal e subsequente degeneração Walleriana do segmento distal, caracterizando variações da função sensitiva, motora e simpática, atrofia e arreflexia; c) neurotme - separação completa do nervo com degeneração Walleriana distal à lesão; a regeneração é de forma aleatória por meio das células de Schwann com desorganização do axônio⁶.

Após a agressão do neurônio, o coto axonal distal sofre o processo de degeneração Walleriana distal à lesão, que resulta no recrutamento de macrófagos e de outras células sanguíneas brancas, que ajudam a eliminar remanescentes de proteínas e lipídios da bainha de mielina. As células de Schwann participam na regeneração neuronal, produzindo células-filhas diferenciadas, que irão ajudar na limpeza dos dentritos axonais e da mielina e, posteriormente, fornecer vias de regeneração dos axônios⁷. Nessa fase, os cotos dos axônios proximais produzem brotos, que se estendem distalmente até seu alvo original⁸.

Muito embora a recuperação funcional após reparo do nervo não seja, em muitos casos, satisfatória, tornam-se essenciais o diagnóstico precoce e a intervenção terapêutica eficaz^{9,10}. Como o prognóstico e a recuperação funcional após LNP dependem da gravidade da lesão, esforços crescentes são dedicados ao desenvolvimento de tratamento efetivo das LNPs com finalidade de melhorar a regeneração tecidual e a recuperação funcional^{11,12,13}.

Estudos da condução nervosa, eletroneuromiografia (ENMG) constitui padrão ouro para diagnóstico da LNP, pois permitem estabelecer a localização e estimar

gravidade e prognóstico da lesão^{14,15,16,17}. Porém, esses recursos diagnósticos, além de serem caros e de difícil acesso, não avaliam a composição química e nem o comprometimento neuromotor da marcha. Métodos convencionais como manifestações clínicas e exames neurofuncionais também são bem aplicados^{18,19}, por exemplo: o Índice Funcional do Ciático (IFC) mostrou-se eficiente na avaliação neurofuncional da marcha de ratos^{20,21} e tem sido aplicado para mensurar resultados na recuperação funcional do nervo ciático após terapia com LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission Radiation*)^{22,23}.

Mais recentemente, são utilizados marcadores biomoleculares identificados por meio de espectroscopias, dentre elas a Espectroscopia Raman (ER)^{24,25}. A ER constitui um novo método de diagnóstico, como uma técnica analítica adequada para a análise de amostras biológicas, o que permite uma informação precisa sobre as alterações bioquímicas e biomoleculares associadas às doenças, em vários tecidos biológicos de forma não invasiva e não destrutiva^{23,26,27}. Ao incidir o laser sobre o tecido biológico, a ER identifica, por meio da vibração molecular específica²⁸, a composição bioquímica do nervo, tendo, portanto, grande potencial de diagnóstico de alterações químicas e moleculares na avaliação do nervo ciático²³. Desse modo, a ER é aplicada em cirurgias para prevenir LNP durante excisão de tumor, por exemplo, facilitando o reconhecimento do nervo em meio ao tecido^{29,30}.

Dentre as várias opções de tratamento, a TLBI promove efeito bioestimulante na função nervosa decorrente de um fenômeno fotoquímico que desencadeia uma cascata de eventos ao estimular a proteína fotorreceptora. A TLBI estimula atividades biológicas de forma segura e não invasiva^{31,32,33,34}. Mesmo assim, em decorrência da diversidade fisiopatológica das LNPs, não existe consenso sobre o uso da TLBI e nem protocolos padronizados para sua aplicação¹⁰.

Na literatura há vários trabalhos analisando os efeitos da TLBI por meio de histologia e imuno-histoquímica, mas há poucas pesquisas utilizando a ER como meio de análise biomolecular e diagnóstico das LNP. Este estudo propões resolver a hipótese de que após uma LNP tratada com a TLBI, em dois diferentes comprimentos de ondas, existe diferença em relação a ER. Objetiva-se compreender, as alterações bioquímicas presentes na reparação tecidual do nervo ciático, por meio da ER e mensurar a recuperação neurofuncional da marcha dos ratos, por meio do IFC, após lesão por esmagamento com TLBI de 660 nm e 808 nm

(ajustados em potência de energia de 133 J/cm²), nos períodos de 14 e 21 dias de tratamento, respectivamente.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

- a) Identificar a composição bioquímicas do nervo ciático, por meio da espectroscopia Raman, após lesão por esmagamento e tratamento com TLBI com 660 nm e 808 nm.

1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar lesão por axonotmese causada pela compressão do nervo ciático com a pinça Kelly;
- b) Mensurar a recuperação neurofuncional da marcha dos animais por meio do Índice Funcional do Ciático (IFC);
- c) Comparar o IFC entre os períodos de avaliação pré e pós-operatórios.
- d) Identificar os principais componentes bioquímicos presentes no nervo ciático por meio da espectroscopia Raman;
- e) Comparar as alterações biomoleculares associadas à TLBI por meio da análise de componentes principais (PCA);
- f) Correlacionar a composição bioquímica do nervo ciático resultante das análises de componentes principais com a recuperação neurofuncional da marcha dos animais mensurada pelo IFC.
- g) Avaliar os efeitos terapêuticos da TLBI com comprimento de onda de 660 nm (vermelho) e de 808 nm (infravermelho).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Neurônios periféricos

Os nervos têm a forma de cordão composto por feixes de fibras nervosas, geralmente bem vascularizadas, e unem o Sistema Nervoso Central aos órgãos periféricos. Podem ser divididos em cranianos (se fazem a ligação com o encéfalo) ou espinhais (se fazem a ligação com a medula). As regiões do nervo mais dilatadas, compostas principalmente por corpos de neurônios, são denominadas gânglios^{34,36}.

Os neurônios são células excitáveis, que se comunicam entre si ou com estruturas efetoras, como células musculares ou secretoras. Carregam uma “mensagem” por meio de linguagem elétrica, devido à mudança no potencial de membrana, sendo suas excitações motoras ou sensitivas. O neurônio é composto por corpo celular (considerado o centro metabólico do neurônio, é composto por núcleo e citoplasma), dendritos (prolongamentos curtos responsáveis por receber estímulos) e axônio (prolongamento longo e fino que se origina do corpo). As células de Schwann, por sua vez, circundam os axônios, formando a bainha de mielina, responsável por facilitar e acelerar a transmissão elétrica, funcionando como isolante elétrico. A bainha de mielina é composta principalmente por lipídios e proteínas, em especial fosfolipídios. Existem espaços relativamente regulares sem essa bainha, denominados nódulos de Ranvier, responsáveis por facilitar a condução nervosa^{34,37}.

As fibras nervosas podem ser mielinizadas (como a maioria dos nervos periféricos) ou não. Essas fibras são classificadas em tipos A, B e C, correspondendo a fibras de grande, médio e pequeno calibre, respectivamente. As fibras do tipo A representam grandes nervos mielinizados. O tipo B consiste em fibras pré-ganglionares, representantes do sistema nervoso autônomo. O grupo C representa fibras não mielinizadas do sistema nervoso autônomo e algumas responsáveis por impulsos térmicos e dolorosos³⁴.

O nervo periférico é basicamente constituído por células perineurais, fibroblastos, macrófagos e células de Schwann, estas últimas produzem a bainha de

mielina que envolve o neurônio³⁸. Além dessas células, a fibra nervosa (neurônio mais bainha de mielina) possui três camadas de tecido conjuntivo (endoneuro, perineuro e epineuro) e matriz extracelular (MEC). O endoneuro (camada mais interna) possui fibras de colágeno III orientadas longitudinalmente ao axônio; o perineuro (camada média) é constituído de fibras de colágeno I e III com disposição concêntrica formando os fascículos; e o epineuro (camada mais externa), composto de tecido conjuntivo frouxo e fibras colágenas I^{39,40}.

2.2 Lesão do nervo periférico

2.1.1 Conceito

O sistema nervoso periférico é composto pelos neurônios motores, sensoriais e autônomos dos nervos espinhais e cranianos, bem como pelos axônios estendidos que atingem o órgãos-alvo⁴¹, usualmente provocam alterações na estrutura, no metabolismo e na atividade fisiológica do corpo celular neuronal, podendo interromper a inervação distal à lesão⁴².

2.1.2 Epidemiologia

As lesões traumáticas são importantes causas de deficiência motora, que afeta principalmente adultos jovens em idade economicamente ativa, com idade menor de 40 anos^{14,43,44}. Estima-se que cerca de 5% dos pacientes politraumatizados apresentem concomitantemente LNP e lesão de plexo braquial⁴⁵. Grande parte dos conhecimentos sobre essas lesões têm origem nos estudos realizados por médicos nos períodos de guerra, como a segunda guerra mundial⁴⁶.

As LNPs têm diferentes fatores causais, como: tração, esmagamento, alteração isquêmica, lesão por arma branca e fratura de ossos longos, que levam à axoniotmese ou à forma mais grave, neurotmese⁴; essa última envolve a transecção

completa do nervo que resulta na perda da função sensorial e motora no local da lesão⁴⁷. Segundo estudo, as causas mais comuns são acidentes de trânsito, seguido por lesão por objetos cortantes⁴⁸ e violência (como explosões ou ferimento por arma de fogo)⁴⁹. Há também associação entre fraturas de ossos longos com as LNP, como a fratura de úmero com lesão de nervo radial⁵⁰. O tratamento dessas fraturas pode levar a outra importante causa de lesão traumática de nervos periféricos: a iatrogênia durante procedimentos cirúrgicos. Os principais procedimentos relacionados com lesões iatrogênicas são: osteossíntese, osteotomia, artrodese, biópsia de linfonodo no triângulo posterior do pescoço e cirurgia para tratamento de síndrome do túnel do carpo^{44,51}.

Estudos realizados em população pediátrica e adolescentes demonstraram uma prevalência importante, relacionada ao diagnóstico precoce com a prevenção de sequelas motoras a longo prazo^{52,53}, e identificaram como principal causa de lesão traumática de nervo periférico a laceração por vidro ou faca^{52,53,54}. Ainda sobre essa população, as lesões de nervo ciático anteriormente estavam entre as mais comuns devido à técnica incorreta na realização de injeção intramuscular⁵³.

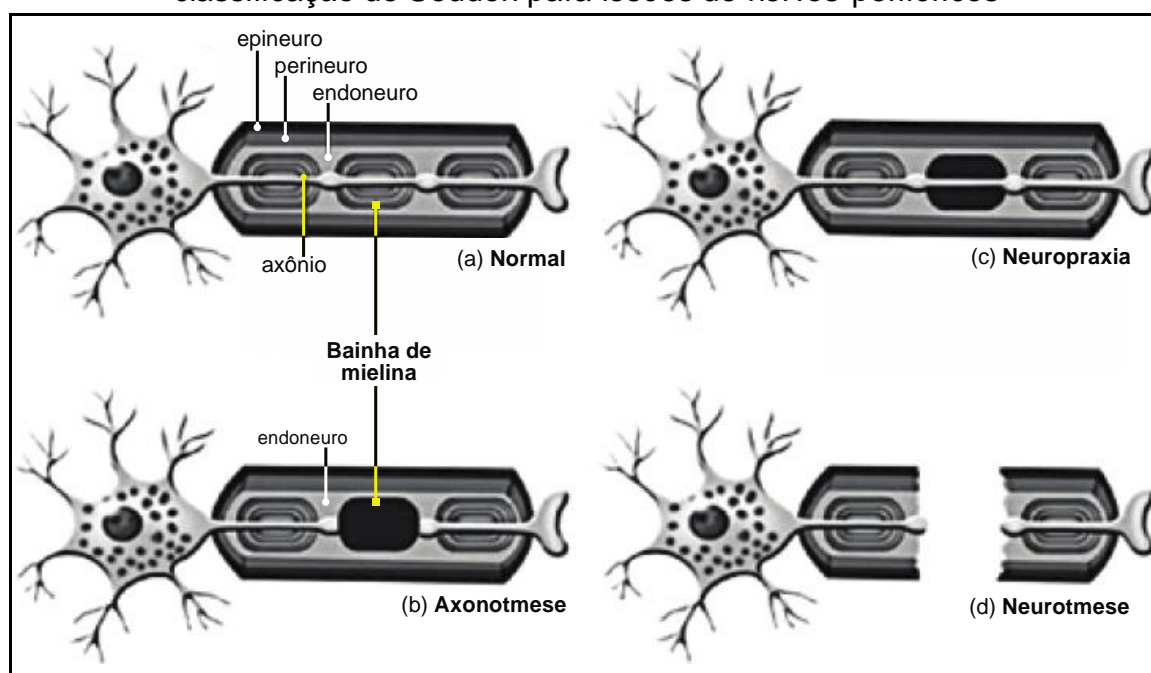
Entre as causas não traumáticas, encontram-se as infecções virais, afecções inflamatórias, exposição a toxinas, distúrbios metabólicos, tumores e algumas neuropatias hereditárias⁵⁵. Os nervos podem ainda sofrer lesões por condições físicas extremas, como exposição ao frio, corrente elétrica e radiação⁵⁶.

2.2.1 Quadro clínico e classificação

As LNPs trazem prejuízos motores, sensoriais e autonômicas, podendo apresentar os seguintes sinais e sintomas: diminuição do tônus e trofismo muscular, restrição da amplitude de movimento articular, contratura, algia, intumescência, parestesia ou hipoestesia, redução da funcionalidade, entre outros^{15,57}. Dentre as manifestações clínicas esperadas a curto e longo prazo, a dor é um dos sintomas mais limitantes, e diferentes lesões de plexo podem evoluir para dor neuropática; outros sintomas são: fraqueza muscular e alterações da sensibilidade distribuída no trajeto do nervo^{36,44}.

A gravidade da lesão é variável, e pode ser classificada, de acordo com a classificação de Seddon, em 3 categorias⁶: neuropraxia, axonotmese e neurotmese (FIGURA 1). Na neuropraxia, o nervo permanece intacto, mas é incapaz de transmitir o impulso nervoso. É considerada a lesão menos grave, pois o tecido conectivo e os axônios permanecem intactos, sendo lesionada apenas a bainha de mielina. Espera-se total recuperação. Na axonotmese, o axônio é lesionado, levando à degeneração Walleriana, mas parte do tecido conectivo permanece íntegro. Espera-se total recuperação, entretanto é menos provável. Já na neurotmese, o nervo perde sua continuidade anatômica, com perda do tecido conectivo. É a lesão mais grave, sendo a recuperação difícil, mesmo com intervenção cirúrgica^{15,58}.

Figura 1 - Ilustração representando o nervo normal e as três categorias da classificação de Seddon para lesões de nervos periféricos

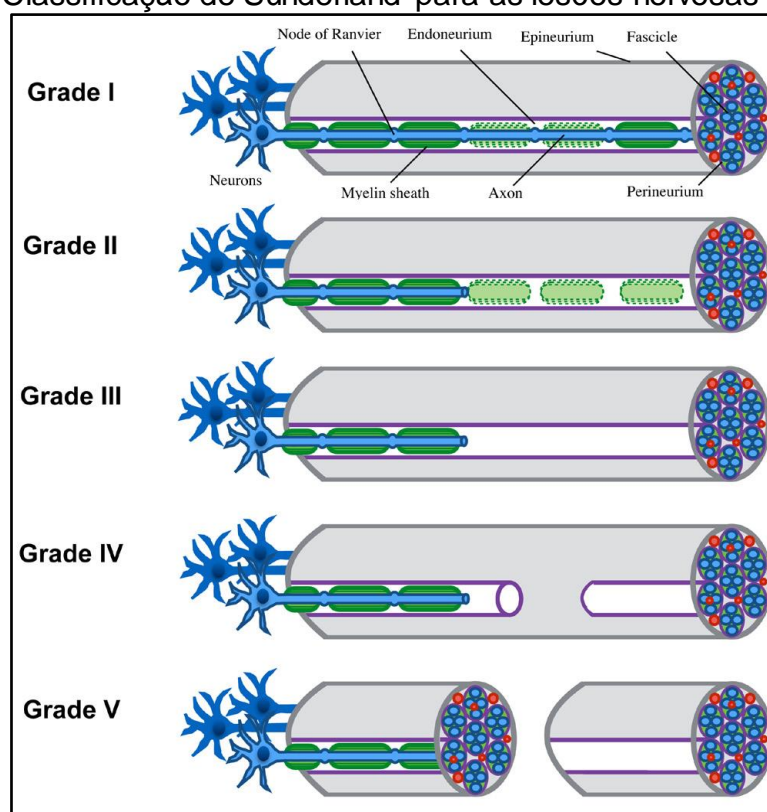


Legenda: (a) Neurônio normal mostrando suas camadas preservadas; (b) Lesão por axonotmese, com lesão da bainha de mielina e interrupção da condução do impulso nervoso; (c) neuropraxia; e, (d) neurotmese¹⁴.

Outro método de classificação dividiu os traumas de nervo periférico em 5 categorias – o método de Sunderland⁵⁹ (FIGURA 2). Trata-se de um método que melhor avalia a integridade do tecido conectivo ao redor da lesão, sendo mais útil para estimar o prognóstico. No Grau I, ocorre alterações morfológicas da bainha de mielina ou desmielinização segmentar, que corresponde à neuropraxia. Clinicamente, a lesão está associada à deficiência motora e sensorial, podendo

apresentar dor neuropata. O Grau II, III e IV equivalem à axonotmese, com perda da continuidade e desmielinização do axônio (Grau II), danos do endoneuro (Grau III), e com danos no perineuro (Grau IV), conferindo um distúrbio fascicular. Por fim, o Grau V de Sunderland equivale à neurotmese da classificação de Seddon^{17,46,60}. Posteriormente, o Grau VI foi proposto por outros autores⁶¹, e corresponde à presença de diferentes graus de lesão ao longo do mesmo nervo, consistindo em uma mistura das outras categorias de lesão^{2,17}.

Figura 2 - Classificação de Sunderland para as lesões nervosas periféricas²



2.2.2 Processo de lesão e reparação do nervo periférico

Um dano severo no axônio leva à interrupção de sua integridade e conseqüentemente de sua função. Quando ocorre esse dano, há alterações no corpo celular, na porção proximal e distal à lesão⁶². Em um estudo realizado sobre as características funcionais e morfológicas do nervo ciático e seu processo de degeneração e regeneração, observaram-se que existem duas fases de

degeneração: a precoce e a rápida. Depois de 1h de lesão, observa-se perda da continuidade dos axônios e da bainha de mielina. Com 3h de lesão, há espessamento do coto distal e fagócitos no epineuro; 6h de lesão, edema no local do trauma. Já na fase chamada de degeneração rápida, os axônios do coto proximal degeneram de maneira retrógrada até chegarem no próximo nódulo de Ranvier, perto do local da lesão, criando uma pequena área de degeneração. As fibras distais à lesão sofrem degeneração em 1 ou 3 dias após a transecção do nervo, por meio de um processo conhecido como degeneração Walleriana⁸.

A degeneração Walleriana é um processo que ocorre quando uma fibra nervosa é esmagada ou seccionada, no qual a parte do axônio separada do corpo celular degenera distalmente à lesão^{63,64}. Essas alterações acontecem pelo aumento da pressão de fluido no endoneuro e mudanças nas moléculas que compõem o tecido conectivo do nervo⁶⁵. Macrófagos e células de Schwann fagocitam as fibras do coto distal, inicialmente, e o coto proximal produzirá brotos colaterais que irão crescer e seguir substâncias tróficas produzidas pelo órgão denervado⁶⁶. Na fase inicial, os macrófagos são ativados para fagocitar os cotos distais dos axônios e da bainha de mielina, principalmente devido à ação da liberação de cálcio (Ca^{2+}) e sódio (Na^+). Concomitantemente, neuropeptídios são liberados pelos axônios danificados, induzindo à vasodilatação intraneural que recruta monócitos da circulação e, juntamente com as células de Schwann, passam a ajudar na eliminação desses restos celulares².

O segmento proximal sinaliza a lesão para o corpo celular por meio de síntese proteica, aumentando o volume do nervo. A revascularização acompanha o processo de crescimento axonal^{2,64}. Durante os dois primeiros dias, há vazamento do fluido presente no nervo com edema e desaparecimento das neurofibrilas do segmento distal. Por volta do terceiro ao oitavo dia, ocorre a fagocitose supracitada, e, em seguida, as células de Schwann trabalham na tentativa de mielinizar o espaço entre os dois segmentos do nervo⁵⁰.

Durante a regeneração, múltiplos fatores trabalham em conjunto, como macrófagos, proliferação das células de Schwann, endoneuro e revascularização, aumentando a síntese de interleucina-1 e, conseqüentemente, do Fator de Crescimento Nervoso (FCN), auxiliando na remielinização^{2,67}.

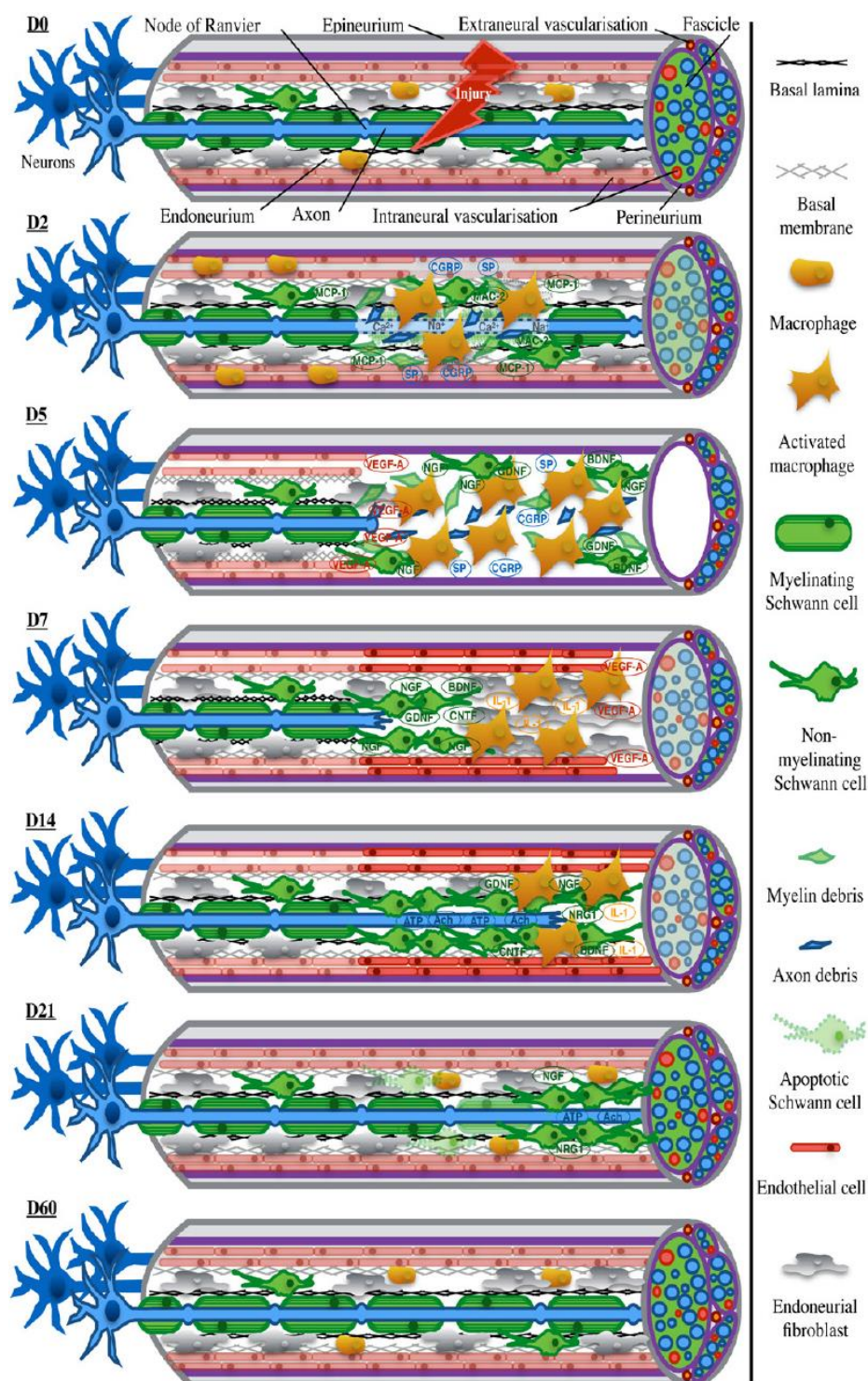
Para outros autores, primeiro ocorre aumento do volume do corpo celular, em seguida há um deslocamento do núcleo para a periferia, depois uma dispersão dos

corpúsculos de Nissl, e esses se decompõem em finas massas granulares chamadas de Cromatólise, também conhecida como reação retrógrada ou reação axonal. Entre o 3º e o 5º dia de lesão, os macrófagos se acumulam no coto distal para realizar a remoção dos restos mielínicos em degeneração e, mais tarde, células de Schwann se proliferam para também desempenhar o papel de fagocitose⁶².

A proliferação de células de Schwann no coto distal ocorre em 3 dias após a agressão axonal. Essa proliferação está associada com a produção de algumas substâncias difusas que podem atrair os axônios em crescimento. Mecanismos de orientação e regulação do crescimento axonal são conhecidos como Neurotropismo ou Quimiotaxia⁶⁸. Os brotos ou “sprouts” axonais são prolongamentos com extrusão inicial da bainha de mielina. Em seguida essas células são estimuladas a proliferarem e a dividirem-se, no máximo, em 3 dias após a lesão, alinhando-se dentro do tubo de lâmina basal para formar as bandas de Büngner, que mais tarde irão fornecer um caminho para as fibras do nervo em regeneração; esses brotos caminham dentro das bandas, atingindo os tubos do endoneuro do segmento distal e, posteriormente, a fibra muscular³⁸. Oxigênio e nutrientes fornecidos por neovasos são necessários para a formação das “bandas de Büngner”, etapa essa que ocorre até o décimo quarto dia de lesão. Entre a 2ª e 3ª semana de lesão ocorre a liberação de adenosina trifosfato (ATP) e acetilcolina (Ach) pelos axônios, permitindo sua autoestimulação. Dois meses após a lesão, a estrutura do nervo é quase normal, embora algumas fibras nervosas ainda tenham uma camada fina de mielina² (FIGURA 3).

Como já relatado anteriormente, a regeneração envolve um mecanismo complexo, com vários sinais celulares e moleculares, que inicia após a lesão, e continua de forma lenta e muitas vezes incompleta. A resposta do corpo celular próximo à lesão, do axônio em regeneração e de sua capacidade para encontrar o caminho em um complexo ambiente celular e molecular, dependem das alterações que ocorrem no segmento do nervo distal cronicamente desnervado e do órgão alvo⁶³.

Figura 3 - Representação esquemática da degeneração Walleriana e regeneração nervosa²



Legenda: (D0) Lesão do nervo, as células circundantes (células de Schwann e fibroblastos endoneuriais) são imediatamente danificadas e morrem por apoptose. (D2) dois dias após a lesão, os axônios degeneram, principalmente devido à ação da liberação de Ca^{2+} e Na^{+} . (D5) Cinco dias após a lesão, os neuropeptídeos liberados por axônios danificados, induzem o inchaço dos vasos sanguíneos intraneurais. Essa vasodilatação, estimula o recrutamento de macrófagos e células de Schwann. (D7) Sete dias após a lesão, os macrófagos fagocitam os restos axonais e da bainha de mielina lesionada e liberam o fator

de crescimento endotelial vascular, levando à formação de neovasos. (D14) Quatorze dias de lesão, ao mesmo tempo, as células Schwann intactas secretam fator de crescimento nervoso que estimula a formação de novas células Schwann. O oxigênio e os nutrientes fornecidos pelos neovasos são necessários para a formação de "bandas de Büngner" que formam um guia físico para o rebrotamento axonal. (D14-21) De quatorze à vinte e um dias após a lesão, ocorre a liberação de adenosina trifosfato (ATP) e acetilcolina (Ach) pelos axônios permite sua auto-estimulação. (D60) Dois meses após a lesão, a aparência geral do nervo é quase normal, embora algumas fibras nervosas ainda possuam uma fina bainha de mielina.

2.2.3 Recursos diagnósticos e terapêuticos

O padrão-ouro do diagnóstico de lesão de nervo periférico são a ENMG e os estudos da condução nervosa (ECN), que permitem estabelecer a localização, estimar gravidade e prognóstico da lesão. A ENMG avalia o potencial de ação da unidade motora. A presença de ondas agudas positivas ou de fibrilação indica disfunção neurológica aguda e está presente de 10 a 14 dias após a lesão¹⁵. Por este motivo, a realização precoce do exame pode estar associada a resultados falso-negativos. O ECN avalia a velocidade de condução nervosa, o que auxilia no diagnóstico de degeneração axonal, devido a processos desmielinizantes¹⁴.

A ultrassonografia é um exame barato e de fácil acesso, podendo ser utilizada para avaliar edema, compressão e integridade do nervo. Outros parâmetros também são avaliados, como a vascularização e a área transversal do nervo. A desvantagem desse exame é ser operador-dependente^{15,17}.

A IRM é útil para avaliação dos tecidos moles ao redor do nervo, bem como para presença de processos expansivos que exerçam efeitos compressivos no seu trajeto¹⁵. O uso de IRM ainda não está completamente estabelecido na literatura. O exame evidência a captação de hipersinal na fase aguda da lesão e posterior normalização do sinal com o processo de regeneração. Entretanto, são necessários mais estudos para comprovar a fase em que a mudança de sinal ocorre e qual o tempo decorrido da lesão e a obtenção da imagem¹⁶.

O tratamento das LNPs consiste em conservador ou cirúrgico. O conservador está relacionado ao controle da dor, por meio de analgesia adequada, com utilização de anti-inflamatórios não esteroides. Pode-se também lançar mão, no controle da dor neuropática, do uso dos antidepressivos tricíclicos, gabapentina, pregabalina, inibidores da receptação seletiva da serotonina ou noradrenalina. É importante,

também, a prevenção de novas lesões ou continuação de uma lesão em andamento (compressiva). Exercícios para melhorar força muscular são úteis para reduzir a perda da função motora¹⁵.

Frequentemente o paciente tem sua capacidade física reduzida devido à diminuição da sensibilidade e motricidade, reduzindo também a utilização de uma região que ainda possui potencial funcional. Com isso, a técnica de *biofeedback* eletromiográfico, que consiste no uso de um dispositivo que transforma a atividade elétrica muscular em recursos audiovisuais, auxiliando no cumprimento de metas durante a reabilitação, é empregada. Ainda faltam estudos para estabelecer essa técnica no tratamento de pacientes com lesão de nervos periféricos⁶⁹.

O tratamento cirúrgico consiste basicamente em reestabelecer a continuidade do nervo⁴⁹. Pode ser realizada de duas formas: por meio da coaptação de cada segmento do nervo ou por meio de enxerto. Os melhores resultados são obtidos pela recoaptação sem tensão excessiva na linha de sutura, pois se ocorrer a tensão, pode gerar isquemia, com proliferação de tecido conectivo e formação de cicatriz que impede a regeneração do axônio⁷⁰.

Em um estudo com 132 pacientes, definiu-se quatro fatores relacionados a resultados desfavoráveis após enxerto de nervo mediano: idade superior a 54 anos de idade, lesão próxima ao cotovelo, comprimento do enxerto maior que 7cm e cirurgia adiada por mais de 23 meses⁷¹. Entretanto, segundo outros autores, não há relação entre o tempo após a lesão e o desfecho cirúrgico⁴⁸. O tratamento cirúrgico deve ser prontamente instituído nos casos de lesão nervosa por laceração, na qual a anastomose possa ser realizada, e na síndrome compartimental aguda, na qual a incisão para alívio da pressão no compartimento contribui para diminuir o efeito compressivo sobre o nervo¹⁵.

Em uma técnica promissora, que ainda está em desenvolvimento, utiliza-se enxertos de nervo descelularizados. Um artigo de revisão concluiu que essa técnica possui resultados semelhantes ao autoenxerto tradicional, mas ainda necessita de mais estudos⁷². Todavia, já existe comercialização de enxertos oriundos da engenharia de tecidos, carecendo também de mais evidência científica⁷³.

2.2.4 Prognóstico

Saber o prognóstico da lesão é essencial para definir o tratamento, seja ele conservador ou cirúrgico. Os principais fatores que estimam a evolução da lesão são: tipo de lesão (como na classificação de Seddon ou Sunderland), grau de desmielinização, extensão da perda de axônio, distância entre a lesão e o músculo e o mais importante fator é o tempo entre a lesão e o reparo - quanto maior o tempo, pior o processo de reabilitação de lesão⁷⁴. Após perda da bainha de mielina, as células de Schwann tendem a remielinizar as áreas lesionadas. Geralmente, pacientes com neuropraxia tem uma boa recuperação em 2 a 3 meses. O grau da perda axonal tem um forte impacto no prognóstico, pois lacerações com perda mínima têm uma boa capacidade de reinervação. Lacerações nervosas próximas ao músculo possuem melhor prognóstico do que aquelas onde o trauma é mais distante⁷⁵.

A morte neuronal também está relacionada a fatores como idade, raça, privação de fator trófico e/ou da síntese dos agentes neurotóxicos causados pela desconexão e ações anti-inflamatórias (agentes)⁷⁶. A causa da lesão é outro fator determinante no prognóstico, pois após um reparo de um nervo seccionado é muito melhor do que um nervo amplamente destruído por queimaduras, projétil ou septicemia⁶³.

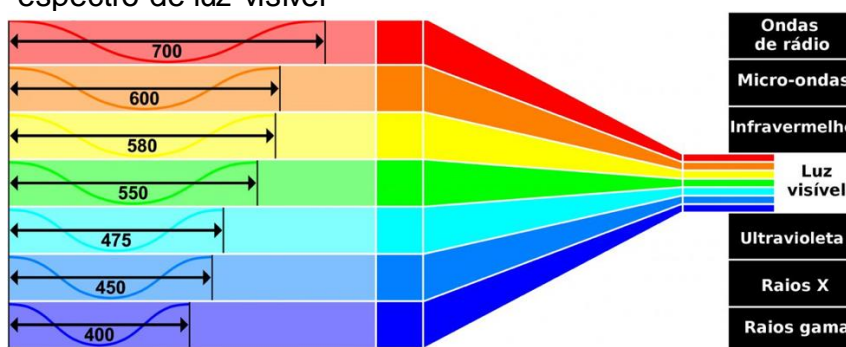
2.3 **Terapia Laser de Baixa Intensidade**

2.3.1 Conceito

O laser é uma amplificação de luz por irradiação eletromagnética não cumulativa⁷⁷. A identificação dada a cada tipo de laser é de acordo com o material utilizado dentro da cavidade óptica, na qual este sofrerá o processo de lasing, e seu comprimento de onda (λ) é dado em nanômetro (nm). O laser também tem dispositivos que podem emitir luz de forma contínua ou pulsada com duração

variada, dependendo da área que se pretende atingir^{78,79}. O espectro de luz visível para humanos varia de 390 a 700 nm (FIGURA 4). Os comprimentos de onda abaixo desse valor representam a luz ultravioleta; valores acima desse espectro representam a luz infravermelha e não são detectados pela retina³⁴. A quantidade de energia aplicada é chamada de fluência e é traduzida por J/cm²; é importante saber que a absorção de luz é diretamente proporcional ao comprimento de onda (λ)^{78,79}.

Figura 4 - Ilustração com a identificação dos diversos comprimento de onda do espectro de luz visível⁸⁰



A fotobiomodulação consiste no uso de energia luminosa, como laser, LED (*Light Emitting Diode*), terapias com ultravioleta (UV) A, UV-B e infravermelho, do espectro visível ao infravermelho, para gerar reações fotoquímicas e fotofísicas em diferentes tecidos^{34,81}. A TLBI é baseada em um fenômeno da Fotoquímica, utilizando um discreto comprimento de onda de luz para desencadear uma cascata de eventos ao estimular uma proteína capaz de absorver a energia luminosa, conhecida como proteína fotoreceptora³².

2.3.2 Interação da terapia fotodinâmica com o tecido biológico

Os efeitos benéficos da TLBI estão relacionados à rapidez do processo de reparação do tecido, ao aumento da formação do tecido de granulação, à contração da ferida, ao processo inflamatório e com efeito analgésico. Em relação aos efeitos bioquímicos, está relacionada com a liberação de substâncias endógenas (histamina, serotonina, bradicinina) que incitam a síntese de ATP e impedem a produção das prostaglandinas, além de favorecerem o funcionamento da bomba de

sódio e potássio; a energia que resta é utilizada para corrigir a funcionalidade celular e tecidual, de acordo com a genética e a fisiologia do tecido saudável, proporcionando uma reparação do tecido mais resistente⁸².

Dentro da TLBI existem dois espectros de luz, um visível, geralmente vermelho, e outro infravermelho. A absorção dessa radiação visível é feita por um sistema biológico que causa uma reação fotoquímica. Já a radiação no espectro infravermelho resulta em rotações e vibrações moleculares, assim não causando mudanças químicas nas moléculas. Diante da comprovação que ambas as radiações se mostram benéficas e que diferem nas propriedades de interação molecular, existem teorias que explicam tais efeitos luz⁷⁹.

Estes efeitos são divididos em bioquímicos (capacidade de liberar substâncias e modificar reações enzimáticas), bioelétricos (manutenção do potencial elétrico das células, pelo aumento de trifosfato de adenosina - ATP e da eficiência da bomba de sódio e potássio) e bioenergéticos (normaliza e mantém o aporte energético dentro do contingente físico). Estes vão atuar a nível celular a fim de promover um aumento no metabolismo, na maturação e no recrutamento de fibroblastos, aumentando a reabsorção de fibrina e o tecido de granulação, diminuindo as reações químicas dos mediadores inflamatórios. Estes efeitos são divididos em curto prazo, segundos ou minutos após a aplicação, e em longo prazo, horas ou dias após a aplicação¹⁰.

De acordo com o comprimento de onda do laser, situado na faixa do visível a infravermelho, podem ocorrer diferentes eventos celulares. Os efeitos antiálgicos, bioestimulantes de trofismo celular, anti-inflamatório e normalizador circulatório podem ser esperados nos estágios iniciais, pois inibição do aparecimento de fatores quimiotáticos a síntese das prostaglandinas. Entretanto, a interação da luz laser com a matéria viva é bastante complexa, porque a energia que é depositada nos tecidos pode sofrer absorção, reflexão, difusão e transmissão, podendo ainda esses efeitos ser propagada para tecidos vizinhos, que não necessitam de tratamento²³.

A base molecular que justificaria a efetividade da laserterapia sobre a regeneração nervosa ainda não está clara. Mas esse tratamento promove nas lesões periféricas uma recuperação funcional significativa, aumenta a quantidade de tecido conectivo (colágeno), aumenta o número de fibroblasto no local da lesão e o de axônios mielinizados acelerando a condução nervosa, acelera a cura, induz uma

recuperação mais rápida do trofismo muscular e atua tanto na regeneração quanto na prevenção da degeneração das fibras nervosas^{31,33}.

2.3.3 Parâmetros terapêuticos associados

Um estudo de revisão realizado sobre o tratamento da fascíte plantar concluiu que a TLBI teve resultados satisfatórios para analgesia a curto prazo, mas carece de estudos que avaliem o desfecho a longo prazo⁸³. A fotobiomodulação realizada antes do exercício físico resultou em melhora do desempenho de atletas de vôlei, na diminuição da fadiga muscular e na redução do aumento esperado de lactato sérico⁸⁴. A TLBI possui ação inibitória direta sobre nociceptores, contribuindo para redução da dor aguda e crônica⁸⁵, além de ajudar na regeneração do tecido ao promover maior expressão de fibras colágenas e elásticas durante cicatrização⁸⁶.

A TLBI é utilizada no tratamento de LNP. Em modelos animais com lesão incompleta do nervo, a terapia se mostrou útil ao promover efeito protetivo imediato que aumenta a função do nervo acometido, reduz a formação de cicatriz no local da lesão, acelera o crescimento do axônio e a remielinização. A recuperação é mais rápida nos animais submetidos a TLBI do que no grupo controle^{87,88}. Nas lesões completas, após anastomose dos segmentos do nervo ciático previamente seccionados em modelos animais, o uso da TLBI no pós-operatório aumenta o processo regenerativo⁸⁹. O mecanismo de ação é baseado na absorção da luz pelas proteínas fotorreceptores, alterando a síntese de ATP na mitocôndria por meio da aceleração da cadeia transportadora de elétrons, modulando reações celulares e melhorando a função^{90,91,92,93,94,95,96,97,98,99}.

Estudos experimentais realizados em ratos evidenciaram que, após axonotmese, a recuperação funcional do membro acometido ocorre em 12 dias¹⁰⁰. A recuperação funcional dos nervos periféricos foi observada tanto com o espectro vermelho como com o infravermelho. Um estudo que analisou o IFC após axonotmese por esmagamento observou melhora de índice com aplicação de TLBI (660 nm; 26,3 mW; 7,6 J) durante 20 dias consecutivos após cirurgia¹⁰¹. Entretanto, outro estudo encontrou melhora somente nos primeiros 14 dias de pós-operatório, com aplicação de TLBI (660 nm; 30 mW; 0,6 J) durante 20 dias⁹⁹. Takhtfooladi

encontrou melhora tanto com 14 quanto com 21 dias de terapia (685 nm; 15 mW; 3 J) após cirurgia²². Pesquisas que utilizaram o espectro infravermelho (830 nm; 40 mW; 2,77 J e 808 nm; 170 mW) também evidenciaram melhora na funcionalidade^{4,102}, além do alívio da dor crônica utilizando laser 830 nm; 30 mW¹⁰³.

2.3.4 Indicações terapêuticas do laser

A TLBI é utilizada principalmente em lesões osteomusculares, alívio da dor e cicatrização de feridas, e hoje discute-se também sua ação imunomoduladora, ao reduzir a concentração de citocinas pró-inflamatórias^{34,90}.

Após extensa revisão de literatura, a recomendação para pacientes jovens e saudáveis é: fonte de luz como laser e/ou LED; dose de 20 a 60 J em pequenos grupos musculares, como bíceps braquial ou tríceps sural; 60 a 300 J em grandes grupos musculares, como quadríceps ou isquiotibiais; potência de 50 a 200 mW por diodo (sonda única) ou 10 a 35 mW por diodo em grupos de sondas, sendo que a potência total do aparelho não pode causar efeitos térmicos; comprimento de onda 640 nm (vermelho) a 950 nm (infravermelho); modo pulsátil ou contínuo; duração da irradiação mínima de 30 segundos por sítio com contato direto entre a sonda e a pele, com discreta pressão⁸¹.

2.4 **Espectroscopia Raman (ER)**

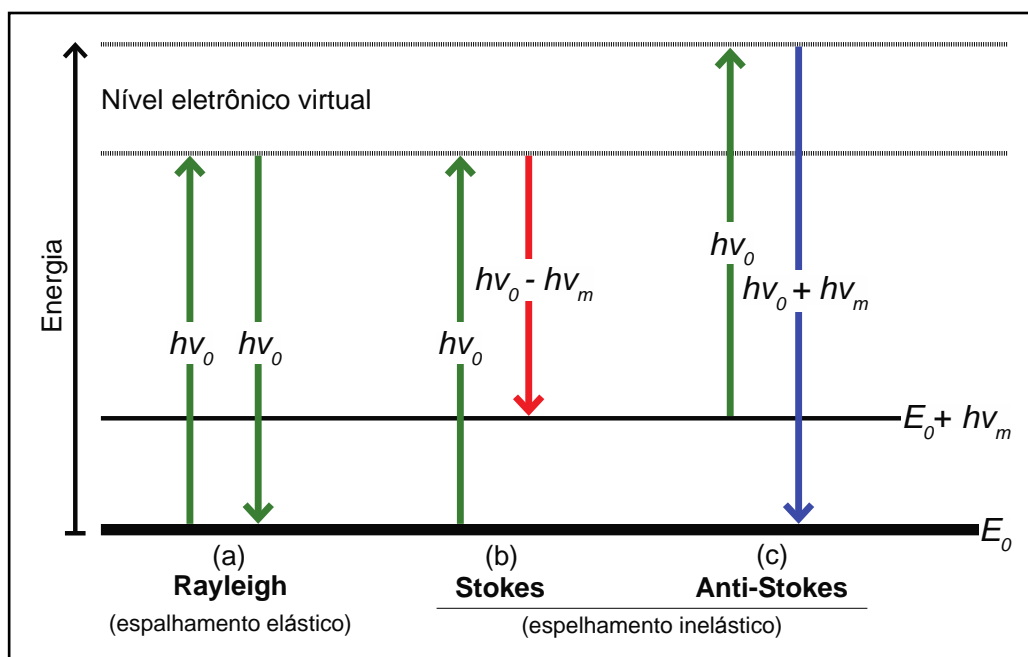
O efeito Raman foi descrito inicialmente na década de 1920 por Chandrashekhara Venkata Raman, um físico indiano, após descobrir o fenômeno de dispersão inelástica da luz ao iluminar um líquido de benzeno com uma lâmpada de mercúrio, conferindo o prêmio Nobel de Física de 1930 ao pesquisador. Este fenômeno justificaria a mudança no comprimento de onda em uma pequena parte de radiação dispersa pelas moléculas, com frequência diferente do feixe incidente^{104,105}. A ER analisa a vibração das moléculas após utilização da luz dispersa para estimar a composição química da molécula, estrutura, simetria, ligação e ambiente

eletrônico^{28,106}. É utilizado em estudos na medicina (como na avaliação de processos ateroscleróticos ou em estudos para diagnóstico de neoplasias), biologia, química, arqueologia, estudo forense, mineração, metais e outros condutores, indústria farmacêutica, entre outros^{105, 107,108,109}.

2.4.1 Princípios básicos da ER

A irradiação de uma molécula por uma luz monocromática resulta em dispersão elástica e inelástica. Na dispersão elástica, não há mudança na frequência da emissão de fótons, no comprimento de onda ou em sua frequência. Na dispersão inelástica, a vibração molecular ganha ou perde energia^{105,110}.

Ao incidir uma onda eletromagnética, como a luz, sob a superfície de um meio (orgânico ou inorgânico), ela pode ser espalhada ou absorvida. Quando absorvida, uma parte da radiação é absorvida na forma de calor e a outra é retransmitida na forma de luz espalhada. A maior fração da luz espalhada tem a mesma frequência da luz incidente, conhecida como espalhamento elástico ou Rayleigh, e a menor fração remanescente possui frequências diferentes da luz incidente, conhecida como espalhamento inelástico ou efeito Raman. No efeito Raman, quando a frequência da luz espalhada é menor do que a frequência da luz incidente (fótons de menor energia) chamamos de Stokes; e quando é maior (fóton de maior energia) chamamos de anti-Stokes^{26,111,112}, conforme demonstrado no Diagrama de Jablonski (FIGURA 5).

Figura 5 - Esquema de níveis de energia²⁶

Legenda: Esquema de níveis de energia mostrando em (a) as linhas do espalhamento elástico (Rayleigh); em (b) e (c) o espalhamento inelástico ou efeito Raman (Stokes e anti-Stokes). E_0 = nível eletrônico no estado fundamental; $h\nu_0$ = energia vibracional; $h\nu_m$ = nível vibracional molecular.

Esse fenômeno pode ocorrer de três formas distintas: a) a luz pode interagir com a molécula resultando em uma troca de energia igual a zero ($h\nu_0 = 0$), frequência da luz incidente igual a da luz dispersa (dispersão de Rayleigh); b) a molécula ganha energia vibracional do fóton, fazendo com que a frequência da luz dispersa seja menor que a da luz incidente ($h\nu_0 - h\nu_m$), efeito chamado de dispersão Raman Stokes; c) a energia resultante é da vibração molecular ($h\nu_m$), ou seja, o fóton ganhou energia vibracional da molécula, fazendo com que a frequência da luz dispersa seja maior do que a da luz incidente ($h\nu_0 + h\nu_m$), efeito conhecido como dispersão Raman anti-Stokes^{105,107,113}.

A ER é composta por uma fonte de luz, filtro, monocromador, suporte da amostra e detector. Basicamente, diz-se que uma molécula é ativa ao Raman quando ocorre mudança na polaridade e simetria durante a vibração. Grupos funcionais como ligação entre Carbonos ($-C=C-$), Nitrogênios ($-N=N-$) e dissulfetos ($-S=S-$) possuem grande mudança na sua polarização, resultando em forte sinal na análise Raman^{105,107,114}.

2.4.2 Vantagens e desvantagens da ER

As principais vantagens da ER são: a sua simples operação, o fornecimento de informação espectral e de multicomponentes, o poder de não destrutivo, a sua sensibilidade na detecção de componentes mínimos do tecido, a boa resolução espacial e classificação detalhada da composição do tecido. O laser Raman possui resolução estimada inferior a $1\mu\text{m}$ e tempo de leitura de segundos a minutos, dependendo da peça analisada. Pode ser utilizado para substâncias sólidas, líquidas ou gasosas e, como praticamente não há uma preparação especial para a amostra, também na análise de substâncias voláteis. Como desvantagem, pode-se citar que é inadequado na avaliação de tecidos que emitam muita fluorescência, requer análise complexa de dados e a possibilidade de o calor do laser influenciar sua avaliação^{105,108,115}.

2.4.3 Aplicações da ER em nervos periféricos

A ER é utilizada também em cirurgias para prevenir LNP durante excisão de tumor, por exemplo, facilitando o reconhecimento do nervo em meio ao tecido^{29,30}. Este método é capaz de diferenciar a estrutura molecular de nervos mielinizados dos não mielinizados. Nos nervos dotados de bainha de mielina, a faixa de vibração de CH_2 ($2,850$ e $2,885\text{ cm}^{-1}$) foi maior que a faixa de vibração de CH_3 ($2,932\text{ cm}^{-1}$). A primeira representa principalmente conteúdo lipídico, enquanto o CH_3 representa o grupo metil, encontrado principalmente nas proteínas. A bainha de mielina é composta principalmente por esfingomielina, cerebrofosfolípido e fosfatidiletanolamina. Conclui-se que nervos mielinizados são representados na análise Raman pela composição lipídica da bainha de mielina. Nos nervos não mielinizados, ocorre o contrário. A faixa de vibração maior é composta por CH_3 , indicando uma contribuição importante das proteínas presentes nos axônios e células gliais. Importante contribuição também nos nervos não mielinizados ocorreu na faixa de $1,589\text{ cm}^{-1}$, atribuída a guanina e adenina presentes nas moléculas de DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico) dessas células³⁰. Outro

estudo identificou a faixa de 2895 cm^{-1} como pertencendo à quase totalidade das fibras nervosas mielinizadas, representando a molécula de CH_2 assimétrica, enquanto que a faixa de 2931 cm^{-1} foi identificada nas amostras de nervos periféricos, tecido conectivo e músculo esquelético, representando a molécula CH_3 simétrica²⁹.

Os principais conteúdos dos tecidos adjacentes aos nervos periféricos são o tecido adiposo, músculo esquelético, vasos sanguíneos e tecido conectivo fibroso. Um estudo analisou os tecidos adjacentes dos nervos femoral, vago e plexo celíaco, concluindo que a faixa Raman foi semelhante entre essas amostras. A ER do tecido adiposo evidenciou faixa de vibração principalmente entre $1,074$, $1,080$, $1,126$, $1,260$, $1,297$, $1,441$, $1,665$, $1,764$, $2,855$, $2,899$ e $2,936\text{ cm}^{-1}$, sendo semelhante ao nervo mielinizado, com a faixa de CH_2 com maior intensidade de vibração que a faixa CH_3 . As principais diferenças encontradas entre o tecido adiposo e o nervo mielinizado foi a faixa de $1,665\text{ cm}^{-1}$ do conteúdo proteico da bainha de mielina e o pico de CH_2 assimétrico que ocorreu no tecido adiposo³⁰.

As principais faixas encontradas no tecido conectivo foram $1,006$, $1,034$, $1,247$, $1,454$, $1,662$, $2,887$ e $2,947\text{ cm}^{-1}$, consistindo principalmente de colágeno tipo I. Os vasos sanguíneos e músculo esquelético evidenciaram faixas entre $1,006$, $1,128$, $1,311$, $1,450$, $1,589$, $1,664$, $2,883$ e $2,935\text{ cm}^{-1}$, sendo semelhantes. A faixa de vibração de CH_2 dos nervos periféricos, mielinizados ou não, foi mais intensa que a encontrada nos tecidos adjacentes³⁰.

A maioria dos tumores cerebrais são gliomas, diagnosticados por exames de imagens (tomografia, ressonância e eletroencefalograma), e para sua excisão cirúrgica o desafio maior é identificar com precisão a área tumoral para não deixar parte do tumor e nem retirar tecido nervoso circunvizinho²⁹. Neste contexto, pesquisa in vivo com camundongos, a ER diagnosticou tumores cerebrais metastáticos. Associada a microscopia de força atômica, a ER foi capaz de identificar alterações bioquímicas e mecânicas específicas de tecido tumoral cerebral, constituindo-se em ferramenta potencial preditiva de câncer¹⁷⁸.

A espectroscopia Raman (ER) é uma ferramenta de diagnóstico cada vez mais aplicada na área da saúde. A interação molecular vibracional, decorrente da perda ou do ganho de energia dos fótons incidentes em uma amostra biológica, identificam a composição molecular com precisão e, desta forma, contribuem para diagnosticar doenças nos diversos sistemas orgânicos³⁰. No sistema nervoso, por exemplo, a ER

mostrou-se eficiente na identificação dos principais componentes biomoleculares do nervos periféricos e potencial biomarcador de células cancerígenas de tumor cerebral, assim como, na prevenção de lesão do nervo periférico, durante excisão cirúrgica de tumor, facilitando o reconhecimento do nervo em meio aos demais tecidos²⁹.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Pesquisa experimental realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental do Maranhão (LACEMA), da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), em conformidade com as premissas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a devida aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMA), parecer nº 23115.005396/2016-65 (**ANEXO A**).

3.2 Animais e desenho experimental

3.2.1 Amostra

O cálculo amostral dos animais da pesquisa foi realizado no software G*Power 3.1 *for mac*, por meio de análise de poder, com duas extremidades e tamanho do efeito $|\rho|$ de 0,5, probabilidade de erro de 0,05 e poder de 0,95 ($1-\beta$ probabilidade de erro). A partir destas informações, o sistema calculou um total de 60 animais^{116,117}. Foram utilizados então 64 ratos da linhagem *Wistar*, fêmeas, com sete semanas de vida, retiradas do biotério central da UFMA. Todos os procedimentos cirúrgicos e terapêuticos previstos na pesquisa foram realizados no LACEMA/UFMA do Hospital Universitário/UFMA, local onde os ratos permaneceram acomodados durante todo o experimento em gaiolas, com quatro animais em cada, com ração comercial e água *ad libitum*, em salas climatizadas com temperatura controlada (22-23°) e com ciclos de luz de 12 horas. Com o objetivo de se adaptarem às condições ambientais e alimentares, os animais foram alimentados e treinados por um período de sete dias antes do início do experimento.

3.2.2 Definição dos grupos

Os animais foram separados aleatoriamente (FIGURA 6), de acordo com o tempo do experimento, em duas etapas: de 14 dias de tratamento (CONT1_14; CONT2_14; L660_14 e L808_14) e de 21 dias tratamento (CONT1_21; CONT2_21; L660_21 e L808_21), sendo cada etapa composta de quatro grupos, como descrito abaixo:

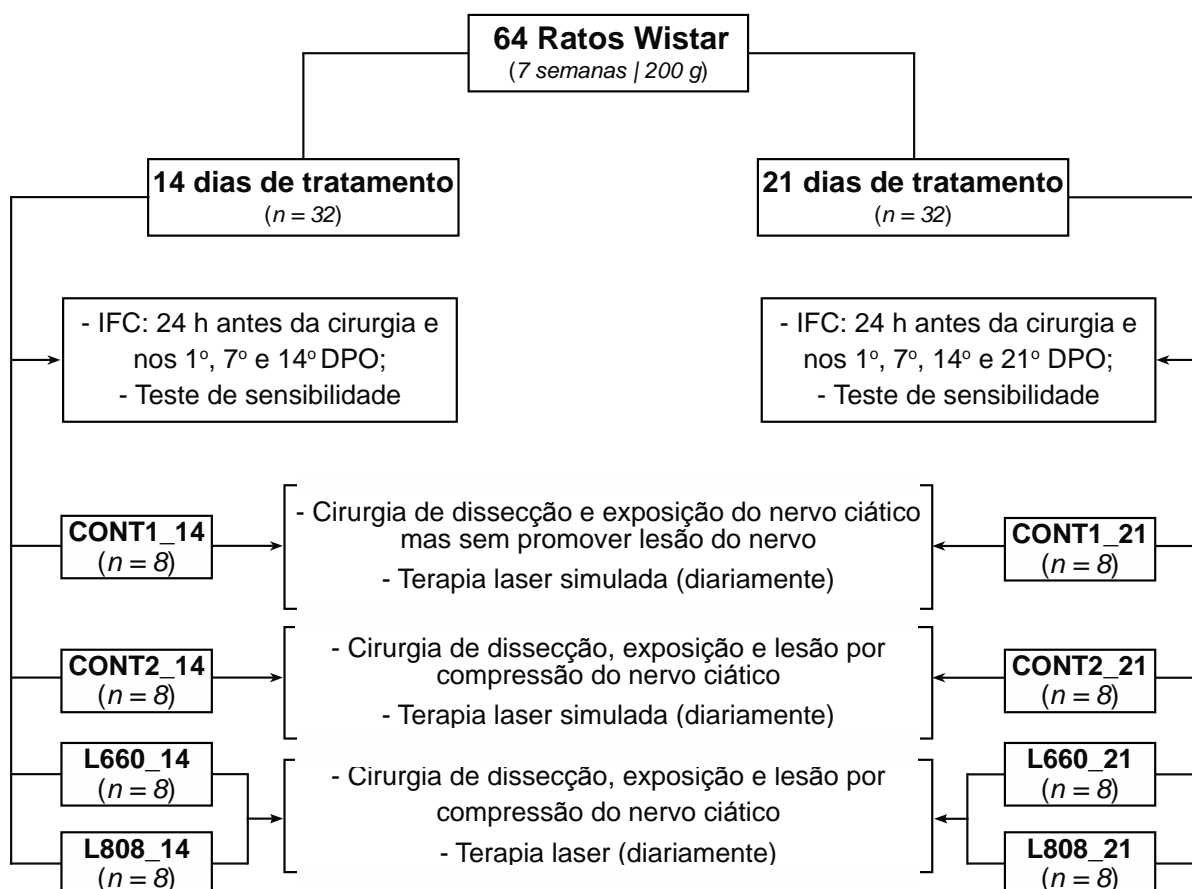
a) **Grupos controles sem lesão (CONT1_14 e CONT1_21)**: oito animais em cada grupo; todos os animais foram submetidos ao processo cirúrgico de dissecação e exposição do nervo ciático, porém não houve lesão por esmagamento do nervo. Foi simulada a TLBI (aparelho laser desligado), com a mesma forma de aplicação e tempo da irradiação dos grupos tratados com laser.

b) **Grupos controles com lesão (CONT2_14 e CONT2_21)** - oito animais em cada grupo; todos os animais foram submetidos ao processo cirúrgico de dissecação, exposição do nervo ciático e lesão do nervo ciático por esmagamento. Foi simulada a TLBI (aparelho laser desligado), com a mesma forma de aplicação e tempo da irradiação dos grupos tratados com laser.

c) **Grupos laser de 660 nm (L660_14 e L660_21)** – oito animais em cada grupo; todos os animais foram submetidos ao processo cirúrgico de dissecação, exposição do nervo ciático e lesão do nervo ciático por esmagamento. Foi aplicada a TLBI diariamente com laser de 660 nm por 14 e 21 dias, respectivamente.

d) **Grupos laser de 808 nm (L808_14 e L808_21)** – oito animais em cada grupo; todos os animais foram submetidos ao processo cirúrgico de dissecação, exposição do nervo ciático e lesão do nervo ciático por esmagamento. Foi aplicada a TLBI diariamente com laser de 808 nm por 14 e 21 dias, respectivamente.

Figura 6 - Esquema de composição e definição dos grupos da pesquisa

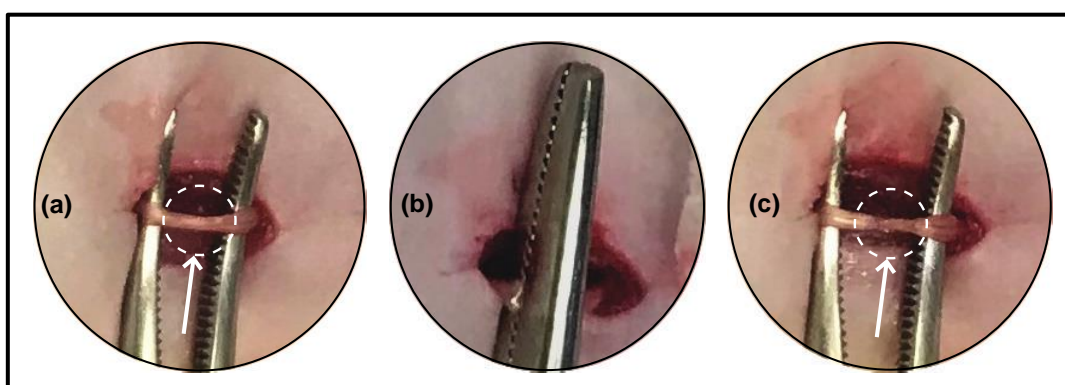


3.2.3 Procedimentos cirúrgicos

Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para exposição do nervo ciático, mas apenas os grupos controles “CONT1_14” e “CONT1_21” não sofreram lesão no nervo. Os animais foram anestesiados com agulha de injeção subcutânea (25 x 5 mm), pela via intraperitoneal (IP) e de acordo com o protocolo modificado Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo (ICB/USP)¹¹⁸. Foram aplicados a associação de quetamina 10% (90 mg/Kg) com xilazina 2% (10 mg/kg) na dose de 0,1 ml/ 100 g de peso corporal por via IP. A contenção do animal realizou-se pelo dorso e a anestesia foi injetada na cavidade peritoneal, entre os órgãos abdominais, na metade posterior do abdome. A indução anestésica foi confirmada por meio do reflexo da cauda e da córnea, bem como por mudanças nas frequências cardíacas e respiratórias. Em seguida, foi realizada

epilação da face póstero-lateral da coxa direita e o animal foi posicionado em decúbito ventral na mesa cirúrgica, sendo realizada a antissepsia adequada do campo operatório. Utilizando um campo fenestrado estéril, o nervo ciático foi identificado e exposto, através de incisão de pele na face posterior da pata traseira à direita (0,5 cm atrás da diáfise femoral e 1 cm acima do joelho) e difusão da musculatura posterior (ísquiotibiais) da pata direita. Na sequência, foi aplicada, com pinça hemostática Kelly reta modelo 16 cm, uma força compressiva de 6 N¹⁹ por 30 segundos para esmagamento do nervo, causando axonotmese (FIGURA 7). O nervo ciático foi lesado a 1 cm acima do joelho. Após todos os procedimentos cirúrgicos, a ferida operatória foi suturada e o animal recolocado na gaiola em repouso, com água contendo analgésico *ad libitum*.

Figura 7 - Processo cirúrgico de lesão do nervo ciático



Legenda: Foi dividido em três etapas: (a) seta mostra o nervo íntegro; (b) compressão com a pinça Kelly de 6 N por 30 s; e (c) seta indica a lesão por axonotmese vista no nervo após a compressão.

3.3 Testes de sensibilidade exteroceptiva dolorosa (SED)

O teste de sensibilidade exteroceptiva foi utilizado para determinar a sensibilidade dolorosa entre os grupos. Em cada animal avaliou-se o limiar de retirada da pata traseira ao estímulo mecânico de compressão com a pinça *Adson* dente de rato entre os pododáctilos, nas avaliações pré e pós-operatória. As respostas ao estímulo álgico foram classificadas em quatro tipos diferentes: a) anestesia – quando não houve nenhuma reação à dor; b) hipoestesia grave – pequenos movimentos de retirada da pata; c) hipoestesia moderada – movimentos

de retirada da pata lentificados e, d) normoestesia – retirada brusca da pata em reação ao estímulo álgico.

3.4 Análise funcional da marcha

Para análise funcional da marcha utilizou-se o cálculo do IFC, método quantitativo da condição funcional do nervo ciático por meio da análise das impressões das pegadas das patas traseiras dos animais sobre a superfície de apoio²¹. Os animais foram treinados a caminharem em uma passarela de vidro de 43 cm de comprimento por 8 cm de largura com um espelho posicionado abaixo da passarela com 45° de inclinação. As medidas do IFC foram feitas no grupo de 14 e 21 dias, no pré-operatório (24h antes da lesão) e nos respectivos dias pós-operatório (DPO): primeiro (1° DPO), sétimo (7° DPO), décimo quarto (14° DPO) e vigésimo primeiro (21° DPO). As imagens das pegadas foram capturadas por um celular na horizontal em vista anterior e posicionado perpendicular ao espelho. Nas impressões digitais captadas das patas traseiras (FIGURA 8), foram mensurados: a) o comprimento da pegada (distância longitudinal entre a ponta do 3° pododáctilo e o calcanhar); b) a abertura total dos dedos (distância transversal entre o 1° e o 5° pododáctilos); e c) a abertura dos dedos intermediários (distância transversal entre o 2° e o 4° pododáctilos). Como o IFC é um índice negativo, utilizou-se a fórmula modificada de Bain²¹:

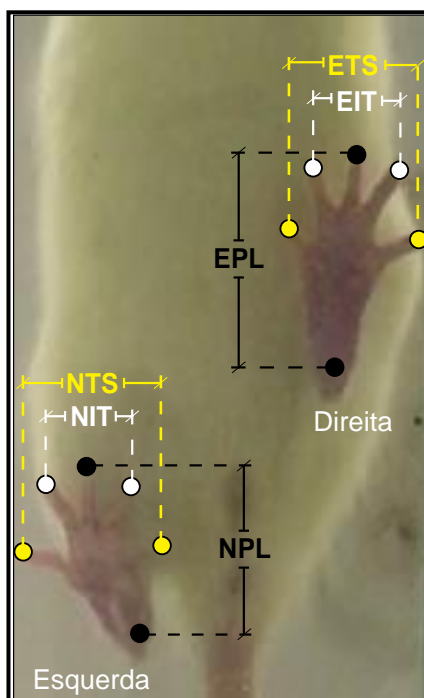
$$IFC = \left\{ \left[(-38,3 \times \left(\frac{EPL-NPL}{NPL} \right)) \right] + \left[(109,5 \times \left(\frac{ETS-NTS}{NTS} \right)) \right] + \left[(13,3 \times \left(\frac{EIT-NIT}{NIT} \right)) \right] - 8,8 \right\}$$

Na fórmula modificada de Bain, os parâmetros medidos nas impressões tanto das patas normais (N) como das operadas (E) eram o comprimento da pegada (PL, de *print length*, ou distância longitudinal entre a ponta do dedo mais longo e o calcanhar), a abertura total dos dedos (TS, de *toe spread*, ou distância transversal entre o primeiro e o quinto dedos) e a abertura dos dedos intermediários (IT, de *intermediate toes*, ou distância transversal entre o segundo e o quarto dedos).

Classifica-se como marcha normal ou sem alteração, o IFC igual ou próximo de zero; e o IFC comprometido total ou com ausência da marcha, valores próximos

ou igual a -100; ou seja, valores de IFC entre zero e -100 mostraram graus variados de comprometimento da marcha, sendo que quanto mais distante de zero, maior é o prejuízo biomecânico da marcha.

Figura 8 - Ilustração de padronização referencial das medidas do IFC²¹ na impressão digital das patas traseiras dos ratos na superfície de apoio da passarela de vidro

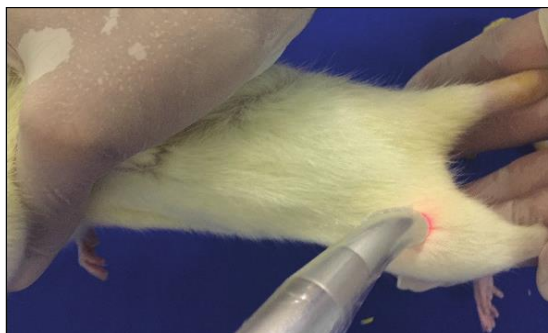


3.5 Terapia laser de baixa intensidade (TLBI)

A TLBI foi aplicada diariamente, começando no primeiro dia de pós-operatório, em modo contínuo. Utilizou-se um equipamento laser modelo TF Premier Plus (MMO Optics, São Carlos, SP, Brasil), com dois aplicadores lasers, sendo um no infravermelho (808 nm \pm 10 nm de GaAlAs e potência de 150 mW) e outro no vermelho (660 nm \pm 10 nm de InGaAlP e potência de 100 mW). Ambos os lasers foram ajustados com a mesma potência (100 mW) para irradiar densidade de energia de 133 J.cm⁻², com feixe de saída de 0,03 cm². O segmento do nervo foi irradiado em três pontos distantes um centímetro entre si, por 30 segundos cada, totalizando energia de 12 J (4 J em cada ponto). A TLBI foi aplicada de forma pontual e em contato direto com a pata posterior direita (área da lesão cirúrgica),

perpendicular à superfície. O animal foi contido manualmente no dorso pela pesquisadora durante a aplicação do laser (FIGURA 9).

Figura 9 - Ilustração mostrando a aplicação da TLBI. Animal contido manualmente e aplicador laser perpendicular à superfície a ser tratada



3.6 Eutanásia

A eutanásia ocorreu no último dia de cada etapa da pesquisa, em ambiente silencioso, realizado por equipe treinada, de forma individual e isolada dos demais animais. Os animais foram anestesiados para remoção da pata traseira direita com a coluna vertebral do animal, com o animal ainda anestesiado, foi aplicada uma subdose de 0,2 ml/ 100 g da associação de quetamina 10% (90 mg/kg) com xilazina 2% (10 mg/kg) intraperitoneal. A confirmação da morte do animal se deu pela observação dos sinais de apnéia, assistolia, palidez das mucosas e ausência de reflexo corneal. As carcaças foram colocadas em saco plástico branco, devidamente identificado e congelado em freezer até serem entregues para posterior incineração pela empresa de coleta seletiva de resíduos biológicos da unidade.

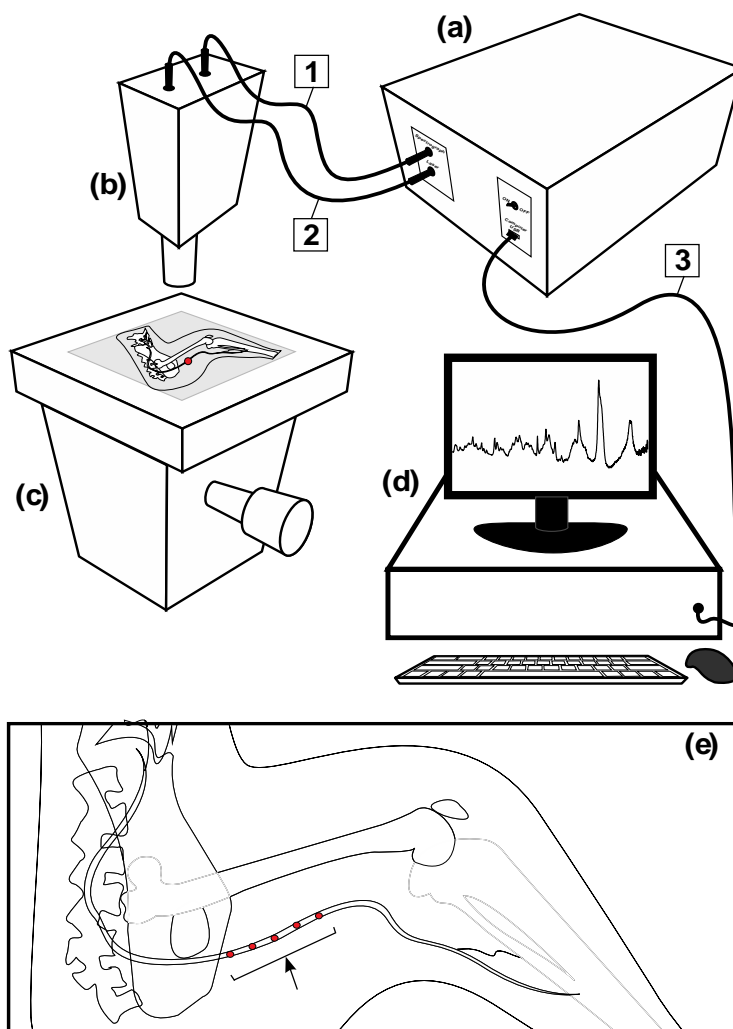
3.7 Espectroscopia Raman

Foi utilizado um espectrômetro (Dimension P1, Lambda Solutions, Inc., MA, EUA) com uma probe Raman para excitação da amostra e coleta dos espectros

Raman. A pata traseira dos ratos foi posicionada em suporte de modo a permitir a irradiação Raman perpendicular ao segmento do nervo ciático lesado em cinco pontos distintos, distantes 1 cm entre eles (FIGURA 10). Utilizou-se aparelho de espectroscopia do Laboratório Vibracional da Universidade Anhembi Morumbi, campus de São José dos Campos/SP. O sinal coletado foi com resolução espectral de cerca de 2 cm^{-1} , potência na ponta da probe Raman de 250 mW e faixa espectral de $800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$, onde características bioquímicas mais relevantes do tecido nervoso foram identificada^{25,120}. O tempo de exposição para cada coleta foi de 3 segundos com 10 espectros acumulados. Os dados, foram inicialmente armazenados e analisados em um computador notebook com o software RamanSoft, versão 1.7 (Lambda Solutions, Inc., MA, EUA).

Após coleta e armazenamento, os espectros Raman foram processados no software Matlab (v. 2007, The Mathworks Inc., Natick, MA, EUA), de onde foi removida a fluorescência de fundo e subtraído o polinômio de ordem 7^a com a rotina MultiPolygon¹²¹. Após identificação dos principais componentes químicos presentes no nervo ciático, os espectros foram submetidos a análise de componentes principais (PCA) para identificar as diferenças bioquímicas presentes entre os grupos pesquisados (CONT1 e CONT2 com os grupos L660 e L808). A média dos espectros Raman de todos os grupos foram plotados e os parâmetros espectrais relacionados ao tecido nervoso e alterações moleculares induzidas pelo laser, extraídas do conjunto de dados usando PCA. Aplicou-se estatística analítica aos dados filtrados.

Figura 10 - Ilustração do processo de coleta dos espectros Raman



Legenda: O espectrômetro Raman (a) conectado com a probe Raman (b); A fibra óptica (1) irradia com laser a amostra (4) no suporte (c); o espalhamento Raman é capturado por (a) por meio da fibra óptica (2). O espectro resultante é enviado ao computador pelo USB (3). A imagem ampliada da amostra (e) destacando os cinco pontos de irradiação do Raman (5).

3.8 Análise estatística

Os dados coletados das impressões digitais nas pegadas dos ratos, por meio do IFC, foram processados e analisados por meio do software SPSS (*IBM SPSS Statistics for Mac, version 25*, Armonk, NY, 2017) e os espectros Raman obtidos nos nervos ciáticos estudados foram processados e analisados em planilhas do Excel (*Microsoft Excel for Mac version 15.26*, 2016), no Matlab (*The Mathworks Inc., Natick, MA, EUA, 2007*) e no SPSS. Além do tratamento estatístico descritivo

(frequências, médias e desvios padrão), foram aplicados os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levine para verificar, respectivamente, a distribuição de normalidade e a homogeneidade dos dados. Nos dados com distribuição normal, foram realizadas inferências com os testes de análise de variância - ANOVA *one-way* (comparou as médias entre dois ou mais grupos); o pós-teste de Tukey-Kramer (identificou os grupos que com diferenças quando havia significância estatística na ANOVA); e o Coeficiente de correlação de Pearson (avaliou o grau de associação entre duas variáveis). Para os dados sem distribuição normal, foram aplicados os testes: Kruskal-Wallis (comparou médias entre dois ou mais grupos); o pós-teste de Dunn's (identificou quais grupos foram diferentes quando havia significância estatística no teste de Kruskal-Wallis); e, o Coeficiente de Spearman's (avaliou o grau de associação entre duas variáveis). Como hipótese de nulidade foi adotado $p < 0,05$.

Os espectros Raman das amostras foram pré-processados para remoção da fluorescência de fundo e subtraído o polinômio de ordem 7^a com a rotina MultiPolygon¹²¹ na plataforma do Matlab, filtragem do ruído de alta frequência (“*smoothing*”) e normalização pela banda Raman mais intensa, caso necessário. Foi aplicada análise de componentes principais (PCA) no processamento dos espectros Raman para reconhecimento de padrões e análise discriminante, de modo a identificar características e diferenças bioquímicas entre os grupos pesquisados. Foram extraídos os componentes principais até que não apresentasse mais relevância biomolecular para o estudo do nervo ciático, ou seja, predominância de ruídos nos espectros.

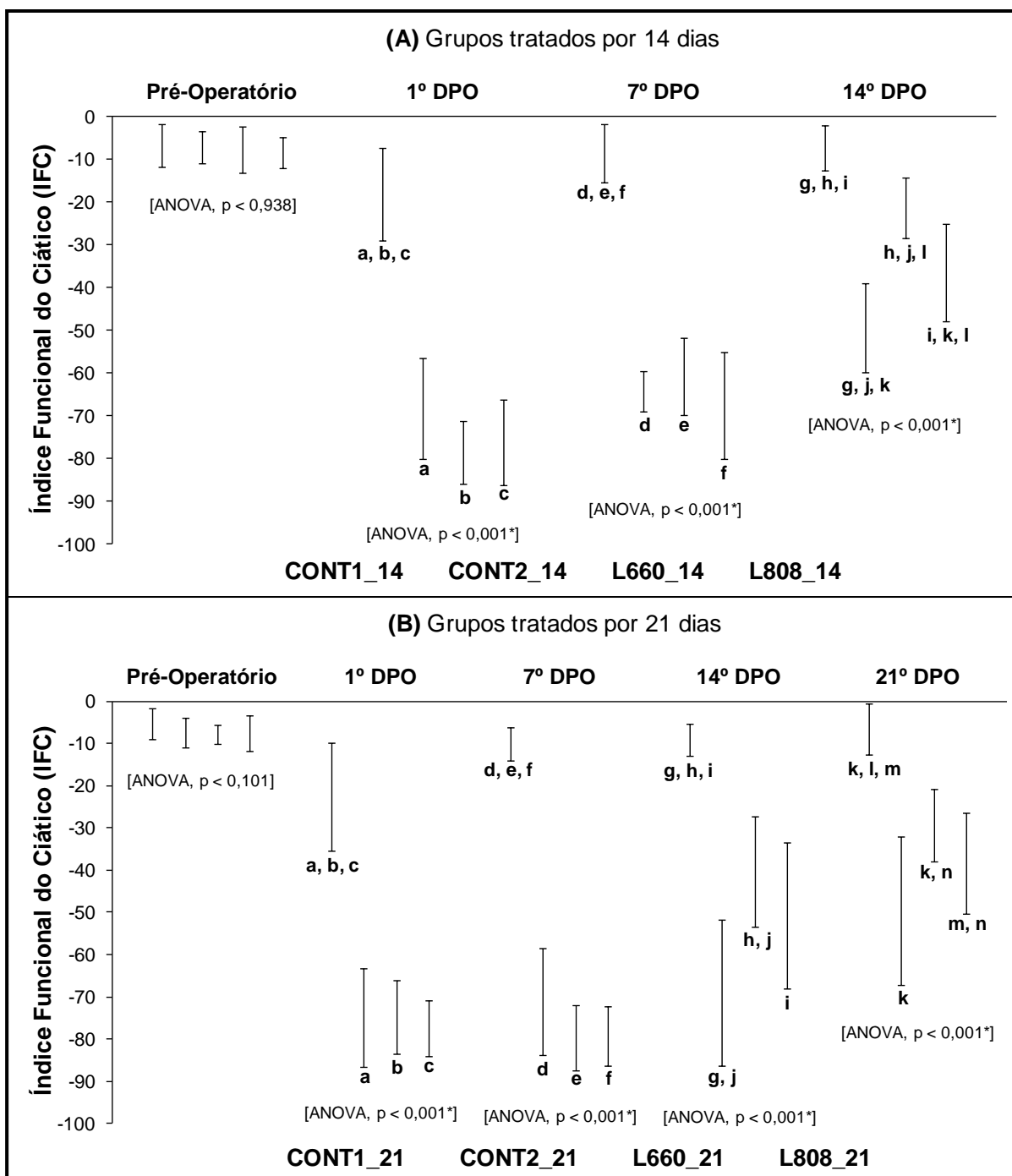
4 RESULTADOS

A compressão do nervo ciático com a pinça Kelly foi suficiente para causar lesão na bainha de mielina do tipo axonotmese, conforme classificação de Sendon; para avaliar o déficit sensitivo foi utilizado a avaliação da SED. Antes dos procedimentos cirúrgicos de lesão do nervo, todos os 64 animais pesquisados tiveram a SED preservada (normoestesia). Nos 1^o, 7^o, 14^o e 21^o DPO, os grupos controles sem lesão (CONT1_14 e CONT1_21) não apresentaram alteração da SED, mesmo tendo sido submetidos à cirurgia de exposição do nervo. A maioria (93,7%) dos animais submetidos à lesão do nervo (CONT2_14, CONT2_21, L660_14, L660_21, L808_14 e L808_21), nas primeiras 24 horas após a cirurgia (1^o DPO), apresentou SED ausente (anestesia), e os demais (6,3%) tiveram apenas discretos esboços de movimentos de retirada da pata (hipoestesia grave). No 7^o DPO, a SED foi classificada como hipoestesia moderada e, a partir do 14^o DPO, observou-se recuperação total da SED (normoestesia).

O IFC, no período pré-operatório, não teve diferenças estatísticas entre os grupos tratados por 14 dias (ANOVA, $p < 0,938$) e nem por 21 dias (ANOVA, $p < 0,101$), mostrando que havia homogeneidade entre os grupos pesquisados. Além disso, a motricidade neurofuncional da marcha manteve-se preservada (IFC próximo de zero) nesse período inicial. De modo geral, o IFC foi semelhante tanto nos grupos tratados por 14 dias (FIGURA 11, A) como nos tratados por 21 dias (FIGURA 11, B).

No 1^o DPO, os grupos CONT1_14 e CONT1_21 apresentaram discreto comprometimento da marcha associado ao stress do procedimento cirúrgico e à reação inflamatória decorrente da exposição cirúrgica do nervo, bem como diferença estatística significativa (ANOVA, $p < 0,001$; Tukey, $p < 0,001$) em relação aos demais grupos que apresentaram grave comprometimento da marcha. Já os grupos lesados apresentaram severo comprometimento da marcha nas primeiras 24 horas pós-cirurgia. A partir do 7^o DPO, o IFC retornou aos valores iniciais (Pré-Operatório) de normalidade nos grupos controles sem lesão, sugerindo recuperação funcional da marcha. Enquanto os grupos com lesão apresentaram diferença significativa (ANOVA, $P < 0,001$; Tukey, $p < 0,001$) e discreta melhora (FIGURA 11, A) ou mesmo piora da marcha (FIGURA 11, B) no 7^o DPO.

Figura 11 - Avaliação da marcha dos animais, por meio do IFC, nos grupos tratados por 14 dias (A) e 21 dias (B), com mensurações antes e depois da lesão por compressão do nervo ciático



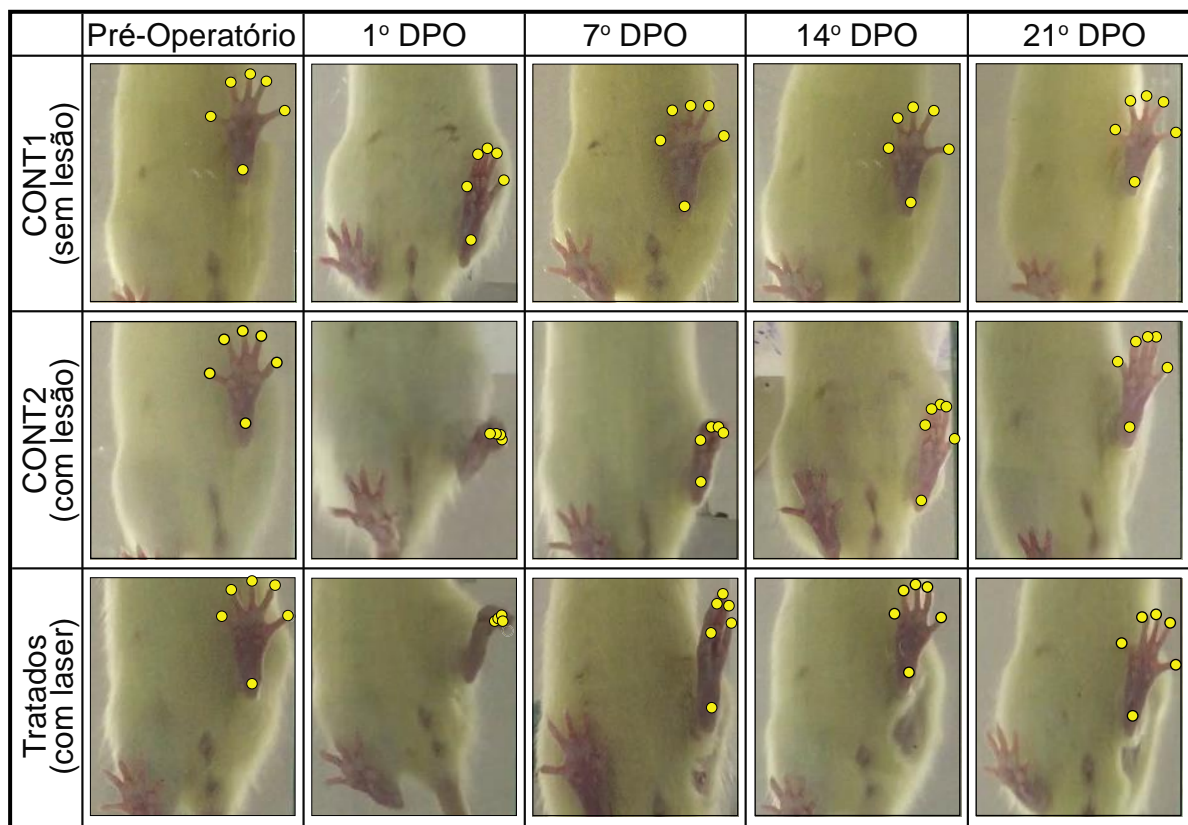
Legenda: As letras minúsculas (acima da barra de desvio padrão) identificam os grupos com diferenças estatísticas significantes entre si após testes ANOVA e Turkey.

Somente a partir do 14º DPO observou-se redução do IFC com consequente recuperação da marcha entre os animais tratados com laser (L660 e L808), sendo mais evidente (ANOVA, $P < 0,001$; Tukey, $p < 0,001$) nos grupos L660_14 (FIGURA

11, A) e L660_21 (FIGURA 11, B). O CONT1 (14 e 21 dias de tratamento) manteve a recuperação da marcha e as diferenças estatísticas com os demais grupos. Já os grupos CONT2_14 e CONT2_21 (lesados e sem tratamento) não apresentaram melhora da marcha. No 21º DPO (FIGURA 11, B), o IFC mostrou recuperação funcional da marcha ainda melhor, porém não retornando aos valores normais iniciais. Na comparação entre os tratados com laser, os grupos tratados com laser 660 nm (L660_14 e L660_21) apresentaram melhores resultados de IFC (ANOVA, $p < 0,001$; Tukey, $p < 0,001$) do que os tratados com laser 808 nm (L808_14 e L808_21), mostrando-se ser mais eficaz na reabilitação da funcionalidade da marcha.

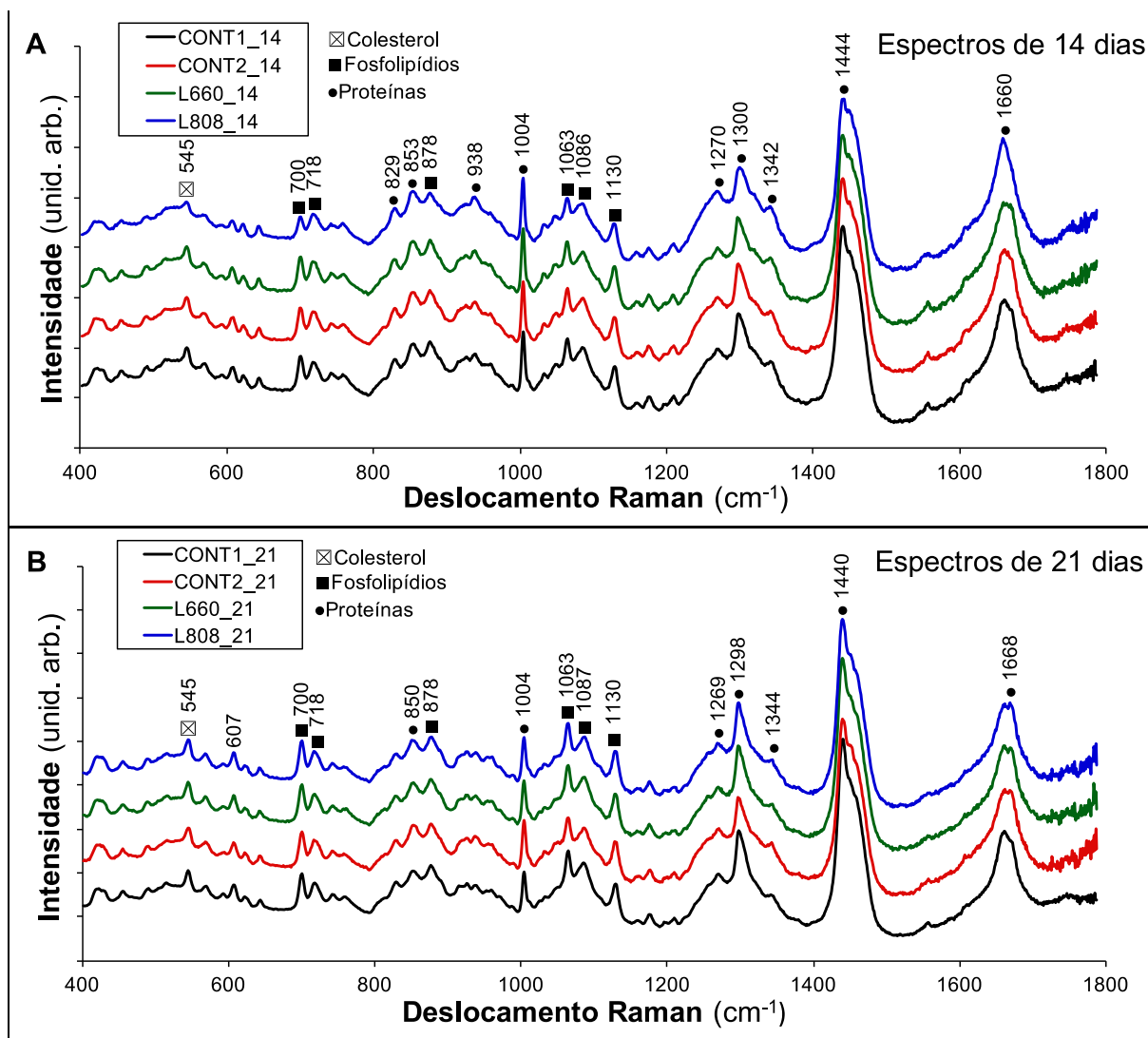
A evolução da recuperação da motricidade neurofuncional da marcha ficou mais evidente quando se analisou as impressões das patas na superfície de vidro da passarela (FIGURA 12). No pré-operatório, todos os grupos mostraram pegadas dos animais bem definidas, pododáctilo abertos e distantes entre si e apoio total na superfície. Os grupos não lesionados (CONT1) tiveram, apenas no 1º DPO, discreta dificuldade na fase de apoio da marcha, com os pododáctilos mais próximos, como consequência do procedimento cirúrgico de exposição do nervo. Nos demais dias, o CONT1 reestabeleceu a marcha plenamente. Já os grupos com lesão do nervo e sem tratamento com laser (CONT2) mostraram evolução lenta e discreta recuperação da marcha, sendo totalmente sem contato com a superfície no 1º e 7º DPO, discreto apoio da pata no 14º DPO e somente no 21º DPO houve melhor capacidade de deambulação com apoio parcial, embora os pododáctilos ainda estivessem bastante retraídos. Os demais grupos (lesão do nervo e tratados com TLBI) tiveram severo comprometimento da marcha no 1º DPO, totalmente sem apoio da pata na superfície, apoio ainda parcial e deambulação com dificuldade no 7º DPO e reestabeleceu a biomecânica normal da marcha a partir do 14º DPO, sendo o 21º DPO o melhor resultado.

Figura 12 - Impressão digital, sobre a superfície da passarela de vidro, comparando a posição dos artelhos (destaque dos pontos amarelos) entre os grupos controle e tratados com laser com as avaliações pré-operatória e pós-operatórias (1^o, 7^o, 14^o e 21^o DPO)



A ER identificou os principais picos Raman presentes no nervo ciático, e são compatíveis com os componentes biomoleculares característicos da bainha de mielina do nervo (FIGURA 13), tais como lipídios e proteínas. Os lipídios predominantes foram colesterol ($423-607\text{ cm}^{-1}$)^{122,123}, esfingolipídios e fosfolipídios ($700-729\text{ cm}^{-1}$; 878 cm^{-1} ; $1030-1130\text{ cm}^{-1}$)^{122,124,125,126,127,128,129,130,131} e proteínas ($815-855\text{ cm}^{-1}$; 938 cm^{-1} ; 1004 cm^{-1} ; $1225-1680\text{ cm}^{-1}$)^{127,128,132,133,134}. Por inspeção visual, ao observar a FIGURA 13, percebe-se que praticamente não há diferenças espectrais entre os grupos tratados (CONT1, CONT2, L660 e L808) e nem ao comparar os grupos pelo tempo de tratamento com 14 e com 21 dias.

Figura 13 - Principais bandas/picos espectrais da espectroscopia Raman dos principais componentes bioquímicos presentes no nervo ciático dos grupos tratados por 14 (A) e por 21 dias (B), respectivamente



No entanto, ao se aplicar a análise exploratória mais detalhada com regressão linear, por meio de análises multivariada de componentes principais (PCA), as bandas Raman mostraram com mais precisão e acurácia as características espectrais dos principais componentes bioquímicos do tecido nervoso periférico mielinizado (TABELA 1). O PCA foi aplicado para extrair as principais diferenças bioquímicas do nervo ciático induzidas pela TLBI entre os grupos pesquisados. Desse modo, foi possível estimar as alterações biomoleculares do tecido nervoso e correlacionar com a TLBI. As bandas espectrais foram obtidas nos oito primeiros escores dos componentes principais.

Tabela 1 – Bandas Raman e seus respectivos componentes químicos presentes no nervo ciático, identificados após aplicação do PCA (continua)

Deslocamento Raman (cm ⁻¹)		Atribuições e estruturas moleculares
Literatura	Este estudo	
418; 538; 546	423 ^c ; 532 ^b ; 545 ^{b,c} ; 546 ^a	Colesterol ester (lipídios) ^{122,123}
606; 607; 608	607 ^b	Glicerol ¹²² ; Modificação do anel fenil ¹³⁵
642	642 ^f	C-C Tirosina (proteína) ^{127,132,136}
700; 702	699 ^h ; 700 ^{a,b,c} ; 703 ^g	ν (C-S) <i>trans</i> (aminoácido metionina) ¹²⁸ ; Colesterol ester ¹²²
718; 719	714 ^f ; 718 ^{a,c}	Esfingomielina, fosfatidilcolina ¹²² ; Fosfolipídios (colina) ^{126,130} ; Vibração do grupo colina N ⁺ (CH ₃) ₃ característico de fosfolipídios; Fosfatidilcolina ¹³⁷
755-760	759 ^d ; 762 ^h ; 763 ^e	Proteína (triptofano) ^{122,138,139} ; Grupo etanolamina; Fosfatiletanolamia ¹²² ; Ácido nucléico (pirimidina) ¹²⁸
815; 817; 828-831; 840; 850- 855; 859	815 ^f ; 829; 832 ^f ; 835 ^g ; 853 ^a ; 856 ^b ; 857 ^f	Tirosina, prolina e glicogênio ^{128,133} ; O-P-O Prolina, hidroxiprolina, tirosina ^{127,132} ; C-C Prolina (colágeno); Prolina (base proteica da mielina) ¹³⁴ ; Tirosina ^{138,140}
875-877	875 ^f ; 878 ^a	N ⁺ (CH ₃) ₃ (grupo colina) Fosfolipídios; Fosfatidilcolina, esfingomielina ¹²² ; ν (C-S) Hidroxiprolina (proteína) ¹⁴¹ ; Tirosina, lipídios, carboidratos, colágeno ¹²⁶
900-1350; 928-940; 955-975	900 ^d ; 904 ^f ; 922 ^f ; 938 ^b ; 939 ^f ; 942 ^h ; 945 ^e ; 975 ^c	C-C Prolina (colágeno) ^{133,136} ; Fosfodiéster (absorção devido colágeno e glicogênio) ¹⁴² ; ν (C-C) Prolina, hidroxiprolina (colágeno) ^{126,127,134,138,140}
1000-1006	1003 ^{f,g} ; 1004 ^{a,b,c,d,e} ; 1006 ^h ; 1007 ^g	C-C Fenilalanina (proteína) ^{127,128,131,132,141,143,144,145}
1030-1130; 1075-1090	1062 ^{e,g} ; 1065 ^{a,b} ; 1079 ^{c,f} ; 1087 ^a	C-C Lipídios ^{124,125,127,129,130,131} ; Ácidos graxos; Ácido palmítico ¹²² ; ν PO ₂ ⁻ Fosfolipídios ¹⁴⁶ ; ν_1 CO ₃ ²⁻ ; ν_3 PO ₄ ³⁻ ; ν (C-C) Estrutura de lipídios ¹²⁷
1126-1127; 1131	1126 ^f ; 1127 ^g ; 1131 ^{b,c}	ν (C-C) Lipídios ^{122,127,147} ; ν (C-N) Proteínas ^{124,132}
1225-1280	1244 ^f ; 1262 ^h ; 1263 ^e ; 1265 ^c ; 1270 ^d ; 1271 ^a ; 1273 ^f	Amida III, α -helix, colágeno (proteína) ^{127,148,149} ν (CN), δ (NH) + ν (PO ₂ ⁻) Vibração proteína (amida III) ^{145,150}
1296-1299; 1310-1315	1296 ^g ; 1298 ^b ; 1299 ^a ; 1306 ^c ; 1307 ^f	Lipídeos, fosfolipídios, CH ₂ colágeno, proteína, amida III ^{122,133,136,151}
1338-1340	1330 ^d ; 1339 ^f ; 1342 ^{a,b} ; 1344 ^c	CH ₃ Proteína ^{124,131,136,152} ; δ (CH) Proteínas (vibração residual) ¹²⁴ ; Triptofano ¹²⁷
1375 ^b ; 1381 ^f ; 1379; 1403; 1436-1441; 1465-1473	1403 ^e ; 1428 ^f ; 1435 ^e ; 1436 ^g ; 1437 ^h ; 1439 ^b ; 1440 ^f ; 1441 ^a ; 1465 ^c ; 1468 ^f	δ (CH ₂) Ácido graxos, triglicerídeos (lipídios) ^{145,150,153} ; Fosfolipídios ¹⁵⁴ ; Colesterol e banda de ácido graxo ¹²²
1645-1680	1650 ^b ; 1653 ^f ;	C=C Amida I (proteína) ^{122,133,146,155,156} ; C=O colágeno

1660^c; 1662^a,
1674^c (elastina) 130,131

LEGENDA: a, b, c, d, e, f, e g corresponde aos picos Raman encontrados nos escores dos componentes principais: a = PC1; b = PC2; c = PC3; d = PC4; e = PC5; f = PC6; g = PC7; e h = PC8, respectivamente.

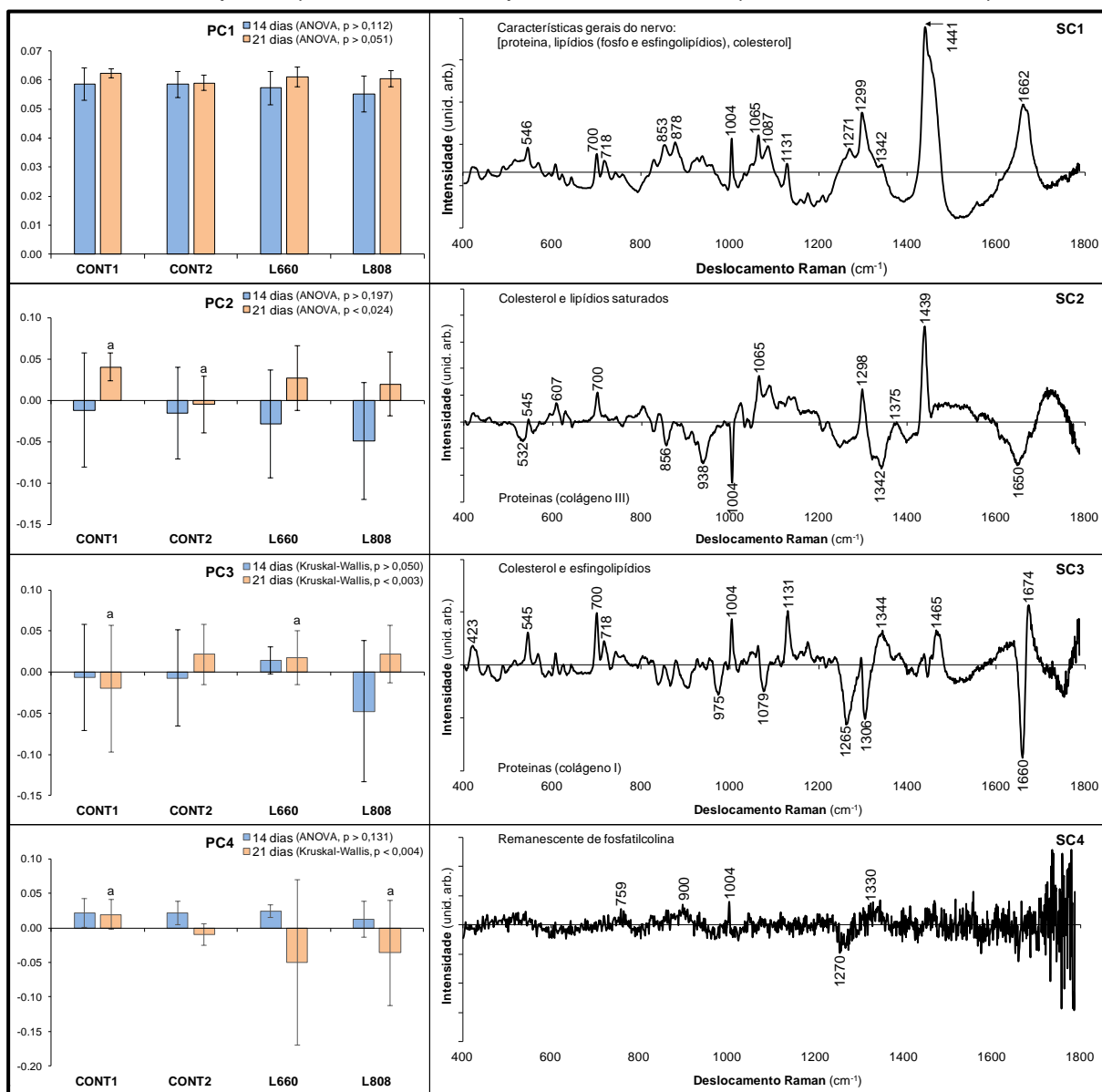
Os principais componentes bioquímicos da bainha de mielina do nervo ciático encontrados foram lipídios, principalmente esfingolipídios (718, 1065 e 1440 cm⁻¹) e fosfolipídios (718, 1085 e 1298 cm⁻¹)^{25,120,122,128,136,157}. As características espectrais apresentadas nos quatro primeiros PCs (FIGURA 14) mostraram bandas Raman dos principais atribuídos aos nervos periféricos mielinizados. As bandas Raman atribuídas às características gerais do nervo ciático (FIGURA 14, SC1) foi composta basicamente de lipídios (fosfolipídios, esfingolipídios e colesterol) e proteínas^{122,126}. Esfingolipídios (particularmente esfingomielina) foram vistos em 718, 1065, 1299, 1441 e 1662 cm⁻¹^{122,123}, colesterol visto em 546, 700, 1441 e 1671 cm⁻¹^{122,123,150,153}, e fosfolipídios (fosfatidilcolina) em 718, 1065, 1087, 1299 e 1441 cm⁻¹^{126,130,137,146} e de proteínas (principalmente colágeno) em 853, 878, 1004, 1342 e 1662 cm⁻¹^{126,127,134,138,140,150,153}. O PC1 mostrou a estrutura química principal do nervo, mas não apresentou diferença estatística entre os grupos (ANOVA, p > 0,112) (FIGURA 14, PC1), mesmo assim foi possível observar que os grupos tratados com laser apresentaram melhor recuperação da bainha de mielina com maior quantidade de lipídios e proteína.

O segundo escore (FIGURA 14, SC2) apresentou características espectrais positivas de colesterol e lipídios saturados em 545, 607, 700, 1065, 1298, 1439 cm⁻¹^{122,123,124,127,130,158,159} e características negativas de proteínas básicas da mielina (prolina / colágeno III) em 856, 938, 1004, 1342 e 1650 cm⁻¹^{127,134,138,140}. Neste escore, houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA, p < 0,024), sendo significativa a intensidade positiva do CONT1_21 versus a intensidade negativa do CONT2_21 tratados por 21 dias (Tukey, p < 0,018). Isto mostra que o CONT1 manteve a constituição lipídica da bainha de mielina preservada, e o CONT2 apresenta característica de proteínas (principalmente colágeno III) remanescentes do nervo ciático lesado.

O terceiro escore (FIGURA 14, SC3) manteve características espectrais semelhantes ao SC2, com picos positivos atribuídos principalmente ao colesterol em 421, 545, 700 e 1439 cm⁻¹^{122,123,146,153} e esfingolipídios em 718, 1131, 1465 cm⁻¹^{122,126,130}, e picos negativos de proteínas, principalmente colágeno I, em 975, 1265,

1306 e 1660 cm^{-1} ^{127,134,148,149,155,156}. O SC3 (FIGURA 14, PC3) apresentou diferenças significativas entre os grupos (Kruskal Wallis, $p < 0,0034$), sendo que as diferenças ocorreram entre o CONT1_21 e L660_21 (Dunn's, $p < 0,001$). De fato, o grupo L660_21 apresentou maior escore do que os demais grupos, e as características positivas do Score 3, relacionadas principalmente ao colesterol e esfingolípídios, sugerem que a irradiação laser no vermelho (660 nm) aumentou a reparação do tecido nervoso quando comparado ao grupo controle não lesado. Já o quarto escore (FIGURA 14, SC4) apresentou remanescentes de proteína (triptofano e fenilalanina) 759, 900, 1004, 1330 ^{131,132,136,138,144} com diferenças significativas entre os grupos (KRUSKAL-WALLIS, $p < 0,0044$), sendo o pico positivo do CONT1_21 diferente do pico negativo L808_21 (Dunn's, $p < 0,001$) (FIGURA 14, PC4). Mesmo com diferença estatística, pode-se afirmar que os picos Raman do SC4 não indicam informações espectrais relevantes para descrever em detalhes.

Figura 14 - Principais bandas Raman dos componentes bioquímicos presentes no nervo ciático nos quatro primeiros componentes principais (PC1-PC4, à esquerda) e dos seus respectivos escores (SC1-SC4, à direita)



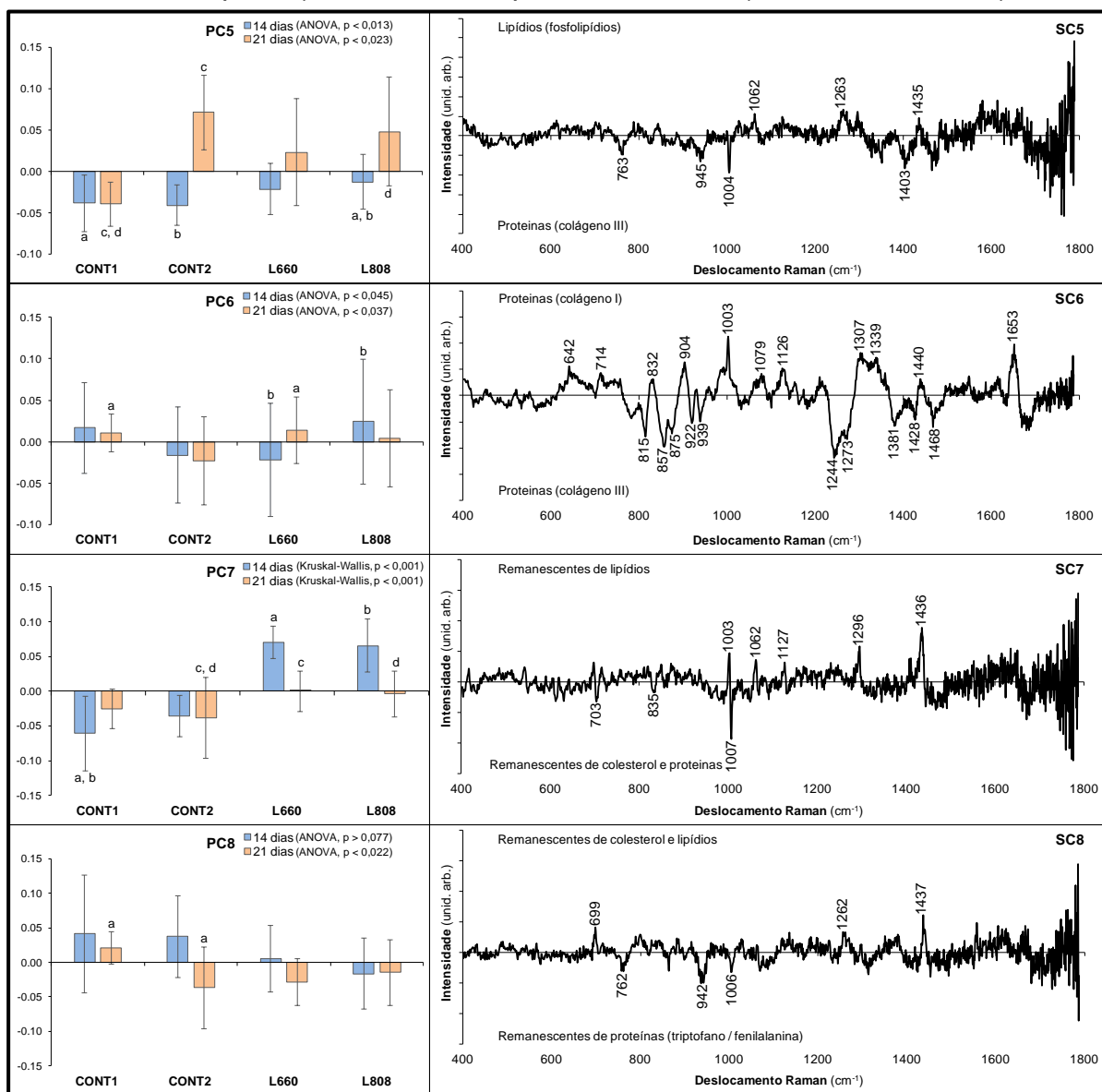
Legenda: A letra "a" acima da barra de desvio padrão nos PC's identificam os grupos com diferenças estatísticas significantes entre si após testes ANOVA ou Kruskal-Wallis para 14 e 21 dias de tratamento.

Os últimos quatro componentes principais (PC5-PC8) ratificaram a composição biomolecular básica atribuída aos nervos periféricos mielinizados, diretamente associados ao tecido de reparação da bainha de mielina após lesão por esmagamento e TLBI (FIGURA 15). A banda Raman (picos positivos) do quinto escore (FIGURA 15, SC5) mostrou a presença dos componentes moleculares compatíveis com os fosfolípídios (lípidios básicos presentes na bainha de mielina) nas posições 1062, 1263 e 1435 cm^{-1} 124,125,127,129,130,131,133,138, enquanto que os picos

negativos 763, 945, 1004, 1403 cm^{-1} ^{131,136,138,139,144,150,153} foram atribuídos à presença de proteínas e aminoácidos (colágeno III / triptofano / prolina). O PC5 (FIGURA 15, SC5) apresentou diferença estatística entre os grupos pesquisados (ANOVA, $p < 0,004$) e essas diferenças foram encontradas entre os grupos CONT1_14 e L808_14 (TUKEY, $p < 0,029$), CONT1_21 com o CONT2_21 e com L808_21 (TUKEY, $p < 0,0265$). Já a característica espectral observada no sexto escore (FIGURA 15, SC6) foi predominante de proteínas (colágenos I e III), sendo os picos positivos atribuídos ao colágeno I nas posições 642, 832, 904, 1003, 1126, 1339, 1440, 1653 ^{124,127,128,131,132,133,136,142,145,152,158,159} e negativos (colágeno III) em 815, 857, 939, 1244, 1273, 1428, 1468 ^{127,128,132,133,134,148,149}. Também se observa diferença estatística entre os grupos (ANOVA, $p < 0,037$), no PC6 (FIGURA 15, PC6); entre os grupos CONT1_21 e L660_21 (TUKEY, $p < 0,0373$); e entre os grupos tratados com laser L660_14 e L808_14 (TUKEY, $p < 0,045$).

Nos dois últimos escores (FIGURA 15, SC7-SC8), os componentes bioquímicos identificados constituem remanescentes atribuídos a composição química da bainha de mielina. O sétimo escore (FIGURA 15, SC7) retorna aos padrões anteriores, apresentando bandas Raman nas posições positivas 1003, 1062, 1262 e 1436 cm^{-1} ^{124,126,127,131,132,143,148,149,150} compatíveis com características remanescentes de lipídios e negativas em 703 e 835 cm^{-1} ^{122,127,128,133} remanescentes de colesterol e proteínas. O PC7 (FIGURA 15, PC7) mostrou que apenas os grupos controles (CONT1_21 e CONT2_21), tratados por 21 dias, foram diferentes (KRUSKAL-WALLIS, $p < 0,0001$), sendo que o CONT1_14 foi diferente do L660_14 (Dunn's, $p < 0,0001$) e do L808_14 (Dunn's, $p < 0,0001$) e o CONT2_21 foi diferente do L660_21 (Dunn's, $p < 0,0001$) e do L808_21 (Dunn's, $p < 0,0001$), respectivamente. No último escore (FIGURA 15, SC8), observaram-se poucos lipídios (colesterol e fosfolipídios) restantes da bainha de mielina nos picos positivos 699, 1262 e 1437 cm^{-1} ^{122,146,150,154,158,159} e, nos picos negativos, poucas proteínas (triptofano) em 762, 942 e 1006 cm^{-1} ^{134,136,138,139,128,141,145}. No PC8 (FIGURA 15, PC8), observaram-se ainda diferença significativa (ANOVA, $p < 0,022$) entre os grupos controles de 21 dias de tratamento (Tukey, $p < 0,0189$).

Figura 15 - Principais bandas Raman dos componentes bioquímicos presentes no nervo ciático nos últimos quatro componentes principais (PC4-PC8, à esquerda) e dos seus respectivos escores (SC4-SC8, à direita)

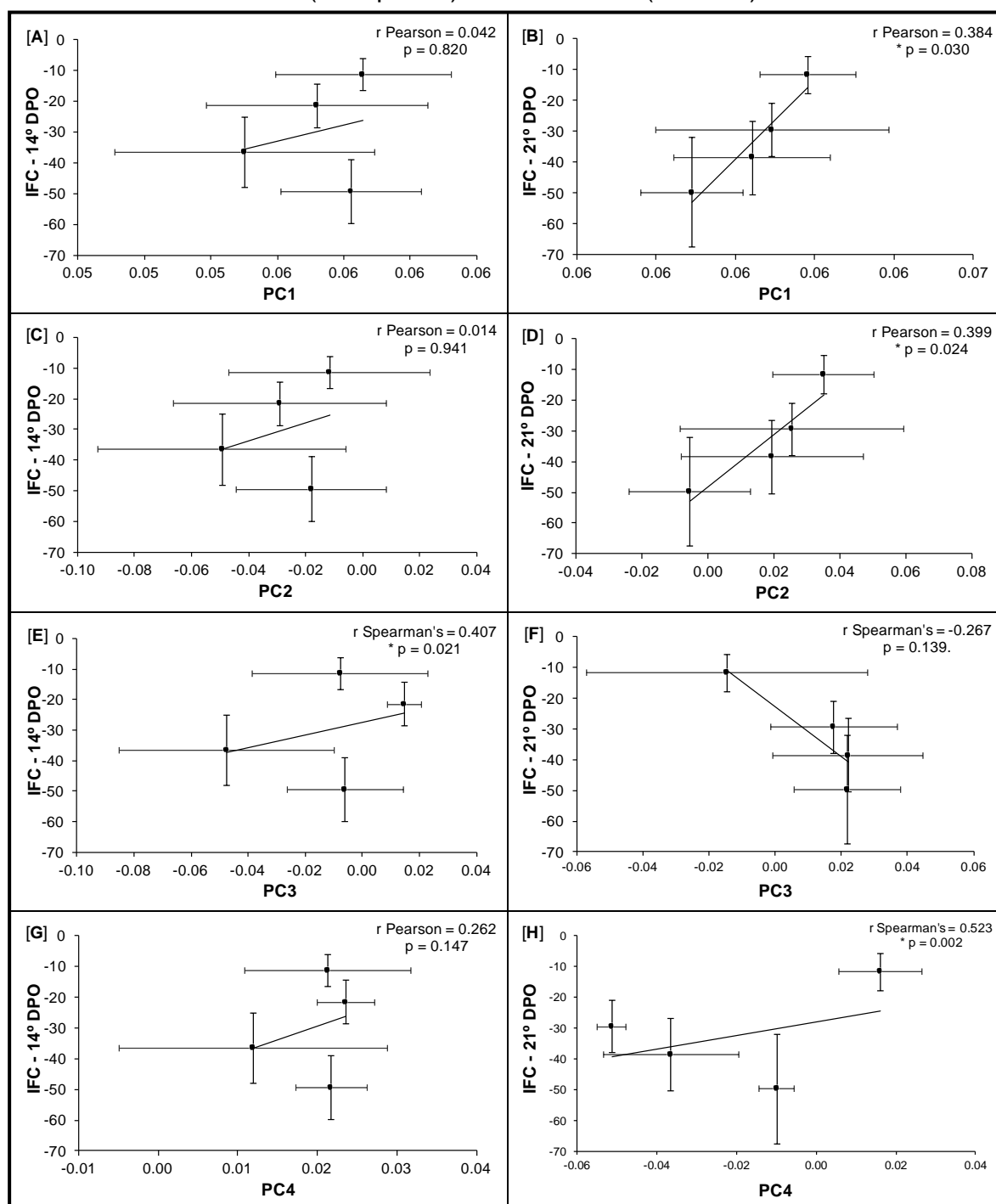


Legenda: As letras "a", "b", "c" e "d" acima da barra de desvio padrão nos PCs identificam os grupos com diferenças estatísticas significativas entre si após testes ANOVA ou Kruskal-Wallis para 14 e 21 dias de tratamento.

O grau de associação entre a recuperação neurofuncional da marcha dos animais (mensurada pelo IFC) e a composição bioquímica do nervo ciático (extraída dos espectros Raman pelo PCA) foram plotados para os grupos tratados por 14 e 21 dias pós-operatórios (FIGURAS 16 e 17), respectivamente. Nos grupos tratados com TLBI por 14 dias, o IFC mostrou correlação linear positiva discreta apenas com o PC3 (Spearman's, $r = 0,407$, $p < 0,021$) (FIGURA 16, E), e, nos grupos tratados por 21 dias, o IFC teve correlações positivas com o PC1 (Pearson, $r = 0,384$, $p < 0,030$)

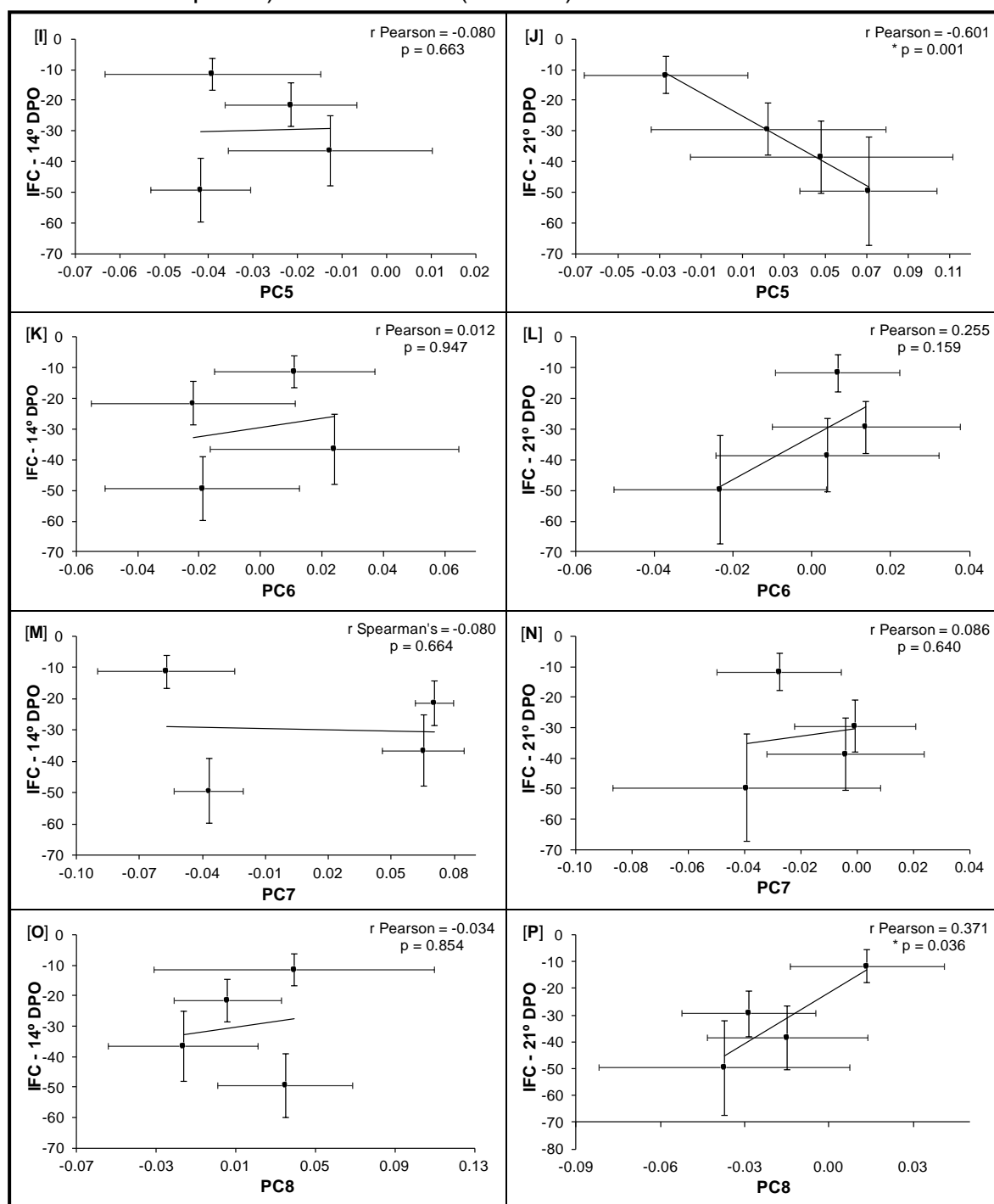
(FIGURA 16, B), com o PC2 (Pearson, $r = 0,399$, $p < 0,024$) (FIGURA 16, D) e, mais forte com o PC4 (Spearman's, $r = 0,523$, $p < 0,002$) (FIGURA 16, H).

Figura 16 - Correlação da composição bioquímica do nervo ciático resultante dos quatro primeiros componentes principais (PC1-PC4) com a recuperação neurofuncional da marcha dos animais (IFC) mensurada no 14^o DPO (à esquerda) e no 21^o DPO (à direita).



Legenda: Coeficiente de Pearson aplicado nos dados com distribuição normal (A, B, C, D e H) e coeficiente de Spearman's aplicado nos dados sem distribuição normal (E, F e H).

Figura 17 - Correlação da composição bioquímica do nervo ciático resultante dos quatro últimos componentes principais (PC5-PC8) com a recuperação neurofuncional da marcha dos animais (IFC) mensurada no 14^o DPO (à esquerda) e no 21^o DPO (à direita).



Legenda: Coeficiente de Pearson aplicado nos dados com distribuição normal (I, J, K, L, N, O e P) e coeficiente de Spearman's aplicado nos dados sem distribuição normal (M).

O IFC dos grupos tratados com TLBI por 14 dias não apresentou correlação com os quatro últimos PCs (PC5-PC8) e, os tratados por 21 dias, mostrou forte correlação negativa do IFC com o PC5 (Pearson, $r = 0,601$, $p < 0,001$) (FIGURA 16,

J) e correlação positiva discreta com o PC8 (Pearson, $r = 0,371$, $p < 0,036$) (FIGURA 16, P).

5 DISCUSSÕES

A lesão do nervo ciático por compressão é bastante utilizada em pesquisas experimentais, principalmente por meio do pinçamento do nervo, para provocar lesão do tipo axonotmese¹¹⁹. A axonotmese consiste em perda da continuidade do axônio e da bainha de mielina com alteração da função sensório-motora decorrente^{6,59,60}. A interrupção da continuidade axonal causa alteração nos neurônios e em outras células, afetando a bainha de mielina e desencadeando processo inflamatório que danifica uma quantidade significativa de neurônios sensoriais e motores¹⁶⁰. Em nosso estudo a compressão com a pinça Kelly fixada na segunda trava da cremalheira resultou na perda da SED e no comprometimento grave da biomecânica da marcha dos animais. Estudos nesse sentido mostram que a avaliação das funções motora e sensitiva (tátil e proprioceptiva) é essencial para diagnosticar uma alteração neurofuncional e deve ser realizada de forma qualitativa¹⁶¹. A recuperação da sensibilidade foi observada a partir do 14º dia pós-operatório.

As avaliações funcionais da marcha dos ratos sofrem interferências de vários fatores que podem modificar o apoio da pata na passarela, tais como a intensidade da pressão da pata, automutilação do animal e deformidades preexistentes na pata. Mesmo com certa dificuldade de avaliar a marcha dos animais, ocasionadas principalmente pelo controle dos mesmos na realização das atividades necessárias durante a mensuração, De Medinaceli introduziu o método de avaliação do nervo ciático de ratos que, posteriormente, foi modificado por outros autores^{20,21,162}, tornando-se capaz de avaliar de forma satisfatória a recuperação do nervo ciático em ratos. Esse método, que ficou conhecido como IFC, utiliza-se das mensurações das pegadas impressas ou vídeo-filmagem, sendo seu valor determinado, principalmente, em função dos músculos intrínsecos da pata posterior^{163,164,165}. Por meio do IFC foi possível mensurar tanto o prejuízo, após a lesão por axonotmese, quanto a recuperação neuromotora e funcional da marcha dos animais no decorrer de 14 e 21 dias de tratamento com TLBI. Vários testes estão descritos na literatura para avaliar qualitativamente a função proprioceptiva, por meio da avaliação das respostas táteis ou posições dos membros posteriores. As pegadas ficaram registradas na superfície de vidro (passarela) ou em papel com tintas; e foram

analisados os valores de IFC, significando que quanto mais próximos de zero melhor é o desempenho da marcha¹⁶⁶. Antes dos procedimentos cirúrgicos os animais apresentaram IFC dentro dos padrões de normalidade e, logo após a cirurgia (1º DPO), ficaram com severo comprometimento motor, sem conseguir colocar a pata na superfície de apoio.

O sistema nervoso periférico tem maior capacidade de recuperação do que o sistema nervoso central em virtude das diferenças nas respostas à lesão das células gliais referentes a cada sistema. As células gliais no SNP, também chamadas de células de Schwann, são capazes de se converter para um fenótipo regenerativo, favorecendo a produção de uma lâmina basal, contribuindo para o desencadeamento neuronal da resposta de regeneração¹⁶⁷. Tal capacidade pode explicar os resultados dos grupos CONT2_14 e CONT2_21 do estudo atual, pois observou-se melhora na funcionalidade da marcha, mesmo sem tratamento. Ao longo de 14 e de 21 dias dos experimentos, o grupo CONT2 (lesão nervosa e sem tratamento) permaneceu com grave comprometimento sensório-motor com discreta melhora da marcha a partir do 14º DPO. No 21º DPO ainda se percebeu dificuldades de deambulação dos animais, mostrando que a reparação tecidual nervosa espontânea ocorreu muito discretamente de forma tardia, limitada e com sequela permanente. Já os animais lesados e tratados com laser mostraram excelente recuperação neurofuncional a partir do 14º DPO. Tanto o laser no vermelho, com 660 nm, como no infravermelho, com 808 nm, mostraram-se eficazes na reparação da bainha de mielina do nervo ciático, sendo o melhor resultado o laser 660 nm.

Os estudos utilizando a TLBI têm mostrado resultados benéficos, pelos efeitos bioestimuladores ou bioinibidores positivos no metabolismo, obtendo melhoria na funcionalidade da marcha na segunda semana em comparação com o grupo não tratado¹⁶⁸. De fato, a LTBI estimula o aumento e produção das células de Schwann, que desempenham um papel importante durante a regeneração nervosa, contribuindo para redução do número de citocinas pró-inflamatórias, reparação dos neurofilamentos e recuperação do diâmetro axonal, além de realizar a fagocitose e direcionar o crescimento axonal¹⁶⁹. Mesmo com visível recuperação funcional da marcha e capacidade de movimentação dos animais, ao final de cada experimento (14 e 21 dias), não conseguiram retornar aos valores do IFC inicial, sugerindo que de alguma forma permaneceu sequela de ordem neuromuscular dos músculos dorso-flexores dos pododáctilos, uma vez que o IFC mensurava a distância entre os

pododáctilos. Além dessa evolução fisiológica, e dependendo do tipo de lesão dos distúrbios sensitivos e motores avaliados, da reparação tecidual e do tratamento proposto, as LNPs podem acarretar alterações funcionais permanentes.

Na pesquisa atual foi utilizado LTBI em dois diferentes comprimentos de ondas, onde laser 660 nm e, em maior grau, o laser 808 nm, foram eficientes no reparo celular do tecido nervoso lesionado, com efeitos similares. Ambos os lasers foram descritos como um tratamento eficaz após a lesão do nervo periférico avaliada por análise funcional e pela ER^{22,170}.

O laser vermelho mostrou-se mais eficaz que o laser infravermelho para promover a recuperação precoce da marcha. Esses achados foram obtidos pelos efeitos benéficos anti-inflamatórios^{99,171} pela maior capacidade de produção de ATP, permitindo que a célula tenha maior quantidade de energia para regeneração¹⁰. Em outro estudo, o emprego do laser de 660nm comprovou melhoras no IFC a partir do 14º dia de PO, porém ao 21º DPO, os valores do IFC obtiveram resultados semelhantes aos da normalidade, provando melhor restauração nervosa¹⁷⁰. Nossos resultados são consistentes com a literatura, pois evidência a importância da TLBI para melhorar a regeneração nervosa por meio de processos de fotobiomodulação^{172,173}.

A ER foi eficaz na identificação e quantificação dos principais componentes bioquímicos presentes no nervo ciático. As características espectrais comuns dos tecidos biológicos são causadas principalmente pelos modos vibracionais de moléculas de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos no intervalo de 600 a 1800 cm^{-1} ¹⁷⁴. O espectro Raman tem sido utilizado para revelar estruturas biomoleculares específicas e realizar diagnóstico rápido, quantitativo e qualitativo de doenças, inclusive refletir proporção e conteúdo de proteína e lipídios como, por exemplo, no nervo periférico^{124,126,129}. O nervo periférico é constituído por muitas células (perineurais, fibroblastos, macrófagos e células de Schwann), abundância de tecido conjuntivo (lipídios, proteínas e colágenos I e III) e pouca quantidade de MEC³⁹. A bainha de mielina (envolve o neurônio), produzida pelas células de Schwann, é constituída por 70% de lipídios (fosfolipídios, esfingolipídios e glicolipídios) e 30% de proteínas (proteína básica da mielina e proteolipídica)^{122,128,137,175}.

Em nosso estudo, os picos Raman de altas intensidades foram atribuídos aos lipídios e proteínas como principais componentes bioquímicos do nervo ciático (FIGURA 13, A e B). Maior quantidade de lipídios como colesterol (423-607 cm^{-1}

¹⁾^{122,123}, esfingolípídios e fosfolípídios (700-729 cm^{-1} ; 878 cm^{-1} ; 1030-1130 cm^{-1})^{122,124,125,126,127,128,129,130,131} e, menor quantidade, mas muito expressiva, de proteínas como amida III e colágenos I e III (815-855 cm^{-1} ; 938 cm^{-1} ; 1004 cm^{-1} ; 1225-1680 cm^{-1})^{127,128,132,133,134}. Outros autores corroboram com estes resultados, identificando esfingolípídios e fosfolípídios, além de colágeno, como principais constituintes do nervo periférico, como o nervo ciático^{25,120,122,128,136,157}. As bandas de fosfolípídios estão em posições similares às do tripalmitato de glicerol e colesterol em 877, 1065, 1085, 1130, 1298 e 1440 cm^{-1} ^{120,122,126,128,136,157}.

A esfingomielina é composta por um grupo ceramida com um resíduo de fosfatidilcolina - picos Raman de colina estão localizados em 718 e 877 cm^{-1} ^{122,136,137,176}. Bandas espectrais próximas de 1440 cm^{-1} são típicas de ácidos graxos saturados, como a banda de colesterol (lipídios neutros). Essas bandas, que são dos grupos CC e CH (ácidos graxos saturados e insaturados), dominam o espectro na região de 1000 a 1700 cm^{-1} ^{122,126,136,137,157}. A bainha de mielina também é caracterizada por picos de glicoproteínas e colágeno (535, 852, 941, 1004, 1239 e 1344 cm^{-1}). Aproximadamente 70% do peso seco da membrana da mielina consiste em lipídios, em particular colesterol - um importante elemento lipídico estrutural da membrana mielina - glicolípídios e sulfolípídios (ricos em lipídios com longas cadeias de ácidos graxos saturados e insaturados)^{122,128,137,175}. A mielina também contém um repertório específico de proteínas da mielina, dentre as quais a proteína proteolípídica e a proteína básica da mielina são as mais abundantes^{175,177}. O lipídio da membrana de mielina é composto de fosfolípídios, plasmalogênios, colesterol e glicoesfingolípídios^{23,123,128}. No entanto, eles não são tão específicos como glicoesfingolípídios e seus derivados sulfatados devido à sua maior abundância de lipídios totais¹²².

As bandas Raman 1130, 1298, 1440 e 1660 cm^{-1} , predominantes dos lipídios, foram atribuídas ao nervo periférico mielinizado; e as bandas 829, 852, 877, 1004, 1239, 1452 e 1660 cm^{-1} são encontradas na região do epineuro que é formado de colágeno. Especialmente os picos relacionados ao anel aromático - fenilalanina (1004 cm^{-1}), amida III (1239 cm^{-1}), curvatura CH_2 (1452 cm^{-1}) e amida I (1660 cm^{-1}) mostram que essas bandas Raman estão relacionadas ao colágeno tipo I¹³⁶.

Como a análise exploratória das características espectrais Raman não mostraram diferenças visuais importantes entre os grupos tratados por 14 dias e nem entre os tratados por 21 dias, foi aplicada estatística multivariada de análise de

componentes principais (PCA). Nos primeiros oito componentes principais (PCs), ficou evidente a confirmação de que havia diferenças espectrais importantes nos dados das bandas Raman iniciais e na reparação tecidual do nervo entre os grupos pesquisados, principalmente entre os grupos tratados com laser. Corrobora com nossa pesquisa estudo em que o PCA foi utilizado para discriminar diferenças entre o tecido normal e o tumor cerebral, onde, inicialmente, não havia semelhanças espectrais entre os grupos e depois do PCA mostrou-se diferenças importantes¹⁷⁸. O PCA tornou-se ferramenta eficiente para identificar alterações bioquímicas e elucidar possíveis diagnósticos^{121,179}, bem como calcular características espectrais de maior variância no conjunto de dados e as classificar de acordo com sua relevância química para o estudo^{174,180}.

Neste estudo, o PCA foi utilizado para estimar as alterações biomoleculares do tecido nervoso associado à TLBI na lesão por esmagamento do nervo ciático e apresentar com mais precisão os modos vibracionais moleculares do nervo (TABELA 1) e as diferenças entre os grupos pesquisados (FIGURAS 14 e 15); além disto, extrair as bandas mais importantes em cada grupo e eliminar os espectros como resultado de ruído aleatório ou artefatos experimentais. Os escores (SCs) dos componentes principais encontrados em estudos ratificam a presença predominante dos lipídios, características marcantes nos nervos mielinizados, principalmente esfingolipídios (718, 1065 e 1440 cm^{-1}) e fosfolipídios (718, 1085 e 1298 cm^{-1})^{25,120,122,128,136,157}. Vibrações moleculares específicas ou associadas observadas nos SCs foram identificadas, principalmente, como lipídios e proteínas^{122,126} em todos os PCs.

Esses lipídios estão diretamente associados à composição da bainha de mielina^{126,130,137,146} dos neurônios e as proteínas estão associadas ao tecido de sustentação da fibra nervosa mielínica (neurônio mais bainha de mielina), que é formado basicamente por tecido adiposo disposto em camadas de colágenos I e III (endoneuro, perineuro e epineuro)^{126,127,134,138,140,150,153}. Todos esses componentes encontrados na ER são características moleculares correspondentes às células de Schwann que, segundo a literatura, desempenham um papel importante na regeneração nervosa. Essas células se multiplicam rapidamente dentro dos tubos endoneurais, preenchendo áreas previamente ocupadas pelos axônios. Isso proporciona um percurso direcionado longitudinalmente, direcionando assim os brotos de fibras inervadas para as placas adjacentes terminais das fibras musculares

desnervadas, funcionando como ponte e facilitando a regeneração e a reparação do nervo¹⁸¹.

Analisando os efeitos do LTBI sobre a regeneração nervosa periférica e no músculo acometido, encontrou-se resultado benéfico na melhora da funcionalidade e, conseqüentemente, no remodelamento de colágeno^{168,182,183}, na redução da concentração tecidual de citocinas pró-inflamatórias^{95,97,184,185}, no aumento do diâmetro axonal^{184,94}, da espessura da bainha de mielina⁹⁴ e no número de Células de Schwann⁹⁴. Com isso, aumenta os fatores de crescimento neurotróficos⁹⁷ e promove o remodelamento da MEC^{98,168}, confirmando esses achados com os resultados encontrados na ER.

A característica espectral do SC1 (FIGURA 14, SC1) foi predominante da vibração molecular da esfingomielina. Segundo a literatura, a esfingomielina é composta por um grupo ceramida com um resíduo de fosfatidilcolina e as bandas de colina, que estão localizadas nos espectros 718 e 877 cm^{-1} ^{122,136,130,176}. Embora o PC1 não tenha apresentado diferença estatística entre os grupos (FIGURA 14, PC1), foi possível observar que os grupos tratados com laser por 21 dias (L660_21 e L808_21) apresentaram melhor recuperação da bainha de mielina com maior quantidade de lipídios, especificamente esfingomielina.

O SC2 (FIGURA 14, SC2) apresentou picos positivos de colesterol (lipídios), mostrando reparação da bainha de mielina para os grupos tratados por 21 dias, e picos negativos de proteínas, indicando que os grupos tratados por 14 dias retardaram a reparação do nervo com acúmulo de colágeno III (FIGURA 14, PC2). As bandas Raman do SC3 (FIGURA 14, SC3) foram compatíveis de fosfatidilcolina (esfingofosfolipídio), outro componente molecular presente na fibra nervosa, comprovando a recuperação do nervo. No PC3 (FIGURA 14, PC3) houve melhora da resposta ao tratamento com laser, exceto do L808_14, que manteve maior quantidade de colágeno I como tecido cicatricial. Embora sem grande relevância química no espectro, o SC4 (FIGURA 14, SC4) mostrou picos remanescentes de fosfatidiletanolamina (glicofosfolipídio) da bainha de mielina e, nesse caso, apenas os grupos tratados por 14 dias apresentaram melhor resposta. De acordo com a literatura, os nervos são estruturas estáveis, nas quais as fibras nervosas são protegidas estruturalmente pela MEC vascularizada, rica em colágeno (endoneuro) ligado à lâmina basal ao redor de cada axônio, que são as células de Schwann¹⁸¹, confirmando os achados encontrados nos espectros.

Os últimos quatro escores mantiveram as características dos espectros dos PCs anteriores. Moléculas de ceramidas, presentes no SC5 (FIGURA 15, SC5), foram decorrentes de compostos lipídicos de álcool insaturado (esfingosina) com ácido graxo ligado ao grupo amida - molécula base dos esfingolipídios. O PC5 mostrou recuperação lipídica da bainha de mielina com melhor resposta ao laser no infravermelho (L808_21) e os grupos de 14 dias mantiveram maior quantidade de tecido proteico de colágeno tipo III (FIGURA 15, PC5). A predominância de proteínas (cisteína) no SC6 (FIGURA 15, SC6) mostra a reparação do tecido adiposo, fato que confere maior sustentação a fibra nervosa. Já os dois últimos escores mostram apenas remanescentes de lipídios (colesterol) (FIGURA 15, SC7 e SC8) e de proteínas (FIGURA 15, SC8); cisteína (proteína), no SC6 (FIGURA 15, SC6); colágeno I (proteína), no SC7 (FIGURA 15, SC7); e colágeno III (proteína), no SC8 (FIGURA 15, SC8).

Os fosfolipídios (lipídios contendo grupo fosfato) são moléculas primárias da membrana e do tecido adiposo, sendo, portanto, comuns em todo tipo de células, principalmente no tecido nervoso. Já as proteínas são cadeias de aminoácidos que consistem em uma unidade de cadeia principal de $C\alpha-C(=O)-N$ que se repete ao longo do polipeptídeo, ligada ao grupo de cadeia lateral de carbono alfa ($C\alpha$)¹⁷⁴. Em nervos periféricos frescos ex-vivo¹²⁰ bandas Raman relativamente amplas de amida I aparecem em 1654 cm^{-1} .

Ao comparar os dois comprimentos de ondas na TLBI, o laser vermelho mostrou-se mais eficaz que o laser infravermelho para promover a recuperação precoce do nervo⁹⁹, confirmando os achados através da ER e das análises de PCA.

Segundo Takhfooladi e colaboradores, os efeitos do laser com comprimento de onda de 680 nm em lesão do tipo neurotmesa em ratos, após 30 dias de lesão, apontaram que há uma maior quantidade de células de Schwann, com presença de núcleo ativo, característico dessas células em proliferação. Além disso, observou-se nesta mesma pesquisa que há maior quantidade de vasos sanguíneos e menor degeneração Walleriana²².

A recuperação biomecânica da marcha dos animais (IFC) apresentou correlação linear com a composição bioquímica do nervo com o PC3 (FIGURA 16, E), mostrando que quanto maior a quantidade de esfingolipídios melhor a capacidade de deambulação dos animais tratados por 14 dias. Nos grupos tratados por 21 dias, o IFC manteve correlação positiva com PC1 (FIGURA 16, B), PC2

(FIGURA 16, D), PC4 (FIGURA 16, H) e PC8 (FIGURA 17, P), ratificando que a composição química compatível com a esfingomielina recupera a fibra nervosa e, conseqüentemente, melhora a marcha. Apenas o PC5 (FIGURA 17, J) mostrou correlação negativa com o IFC, ou seja, quanto menos quantidade de proteína maior IFC. De fato, o laser de baixa intensidade aumentou a produção de lipídios (esfingofosfolipídios), glicoproteínas e colágeno presentes na bainha de mielina do nervo ciático, os quais estão relacionados à reparação tecidual, estimulando a ação e aumentando o número de células de Schwann, e conseqüentemente recuperando o controle neuromotor da marcha dos animais. As células de Schwann contribuem para reduzir o número de citocinas pró-inflamatórias, reparar os neurofilamentos e recuperar o diâmetro axonal⁹⁰. Além disto, tais células desempenham um papel importante durante a regeneração nervosa, controlando influxo das células inflamatórias, limpeza do ambiente de detritos através de processo autofágico e suporte de crescimento axonal^{169,181,186}.

A ER é uma ferramenta eficiente para detectar a produção dos compostos bioquímicos responsáveis pelo reparo do nervo ciático (esfingomielina e colágeno) e para medir a eficácia da TLBI. A ER tem sido descrita como uma técnica relevante para a análise bioquímica de materiais biológicos de interesse clínico^{25,26,121,123,179,187}. A ER foi eficaz na identificação e no ensaio da quantidade relativa de componentes bioquímicos presentes no nervo ciático. Os picos encontrados estão diretamente associados à composição química da bainha de mielina e das células de Schwann (esfingo e fosfolipídios) - ambos se relacionavam com a reparação do tecido do nervo lesado, à deposição de glicoproteínas (laminina, fibronectina, tenascina e colágeno) e ao aumento da matriz extracelular no tecido de reparo nervoso^{136,188}.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em comparação com os controles (CONT1), sem lesão e sem tratamento, tanto nos grupos de 14 como de 21 dias, a recuperação neurofuncional da marcha transcorreu de forma lenta ou mesmo ausente nos primeiros sete dias pós-operatórios. Os grupos sem tratamento (CONT2) apresentaram grave comprometimento da marcha e permaneceram com discreta melhora ou sequela permanente, mesmo no 21^o DPO. Apenas a partir do 14^o DPO, observou-se recuperação gradual da marcha entre os grupos tratados com laser, sendo mais eficaz o laser no vermelho (660 nm).

A composição bioquímica do nervo ciático, identificada pela ER, foi predominante de lipídios (esfingolipídios e fosfolipídios) e proteínas (colágeno), componentes característicos da bainha de mielina.

A análise multivariada pelo PCA revelou diferenças bioquímicas específicas induzidas pela TLBI, onde as características espectrais observadas ratificaram, nos oito primeiros escores, forte presença dos lipídios (fosfolipídios, esfingolipídios e colesterol) da bainha de mielina e glicoproteínas presentes no tecido de sustentação (epineuro) composto basicamente de tecido conjuntivo (colágeno). De modo geral, a PCA comprovou que os grupos controles (CONT1_14 e CONT1_21), em relação aos demais grupos, mantiveram suas estruturas do nervo ciático intactas e a TLBI induziu a reparação tecidual da bainha de mielina, principalmente com laser de 660 nm.

A recomposição química da bainha de mielina, mensurada pela PCA, manteve correlação positiva com o IFC, ou seja, quanto maior a quantidade destes lipídios (principalmente esfingolipídios) maior a capacidade sensorial e motora dos animais pesquisados.

Conclui-se que a espectroscopia Raman conseguiu identificar a composição biomolecular do nervo ciático de ratos e que a TLBI contribuiu possivelmente na proliferação tecidual de reparação da bainha de mielina induzindo a produção de lipídios, glicoproteínas e colágeno, conseqüentemente recuperando o controle neuromotor da marcha dos animais.

REFERÊNCIAS

1. LOUIS, E.D.; MAYER, S.A.; ROWLAND, L.P. Merritt - Tratado de Neurologia. 13ª Edição. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, 2018.
2. CAILLAUD, M.; RICHARD, L.; VALLAT, J.M.; DESMOULIÈRE, A.; BILLET, F. Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization. **Neural Regen Res**, v. 14, n. 1, p. 24-33, jan., 2019.
3. SHAHID, K. R.; DELLON, A. L.; AMRAMI, K. K.; SPINNER, R. J. Sciatic and peroneal nerve injuries after endovascular ablation of lower extremity varicosities: case reports and review of the literature. **Ann. Plast. Surg.** v. 74, p. 64-8, 2015.
4. WANG, C.Z.; CHEN, Y.J.; WANG, Y.H.; YEH, M.L.; HUANG, M.H.; HO, M.L.; LIANG, J.I.; CHEN, C.H. Low-level laser irradiation improves functional recovery and nerve regeneration in sciatic nerve crush rat injury model. **PLoS One**, v. 9, n. 8, e103348, ago., 2014.
5. HANEWINCKEL, R.; OJEN, M. V.; IKRAM, M. A.; DOORN, P. V. The epidemiology and risk factors of chronic polyneuropathy. **Eur J Epidemiol**, Rotterdam, v. 31, n. 1, p.5-29, 2016.
6. SEDDON, H. Three types of nerve injury. **Brain**, v. 66, p. 237-88, dez., 1943.
7. LI, R.; WU, J.; LIN, Z.; NANGLE, M.R.; LI, Y.; CAI, P. *et al.* Single injection of a novel nerve growth factor coacervate improves structural and functional regeneration after sciatic nerve injury in adult rats. **Experimental neurology**, 288:1-10, 2017
8. STA, M.; CAPPAERT, N. L. M.; RAMEKERS, D.; BAAS, F.; WADMAN, W. J. The functional and morphological characteristics of sciatic nerve degeneration and regeneration after crush injury in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, 222, 189–198, 2014.
9. GIGO-BENATO, D.; RUSSO, T.L.; TANAKA, E.H.; ASSIS, L.; SALVINI, T.F.; PARIZOTTO, N.A. Effects of 660 and 780-nm low-level lasertherapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciaticnerve. **Lasers Surg Med**, 42:673–682, 2010.
10. MEDALHA, C.C.; DI GANGI, G.C.; BARBOSA, C.B.; FERNANDES, M.; AGUIAR, O.; FALOPPA, F. *et al...* Low-level laser therapy improves repair following complete resection of the sciatic nerve in rats. **Lasers in Medical Science**, 27(3), 629–635, 2011.
11. GEUNA, S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. **J Neurosci Methods**, 243:39–46, 2015.

12. TOS, P.; RONCHI, G.; GEUNA, S.; BATTISTON, B. Future perspectives in nerve repair and regeneration. **Int Rev Neurobiol**, 109:165–92, 2013.
13. GRIFFIN, J.W.; HOGAN, M.V.; CHHABRA, A.B.; DEAL, D.N. Peripheral nerve repair and reconstruction. **J Bone Joint Surg Am**, 95:2144–51, 2013.
14. MARTINS, R.S.; BASTOS, D.; SIQUEIRA, M.G.; HEISE, C.O.; TEIXEIRA, M.J. Traumatic injuries of peripheral nerves: a review with emphasis on surgical indication. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 71, n. 10, p. 811-4, out., 2013.
15. HATZENBUEHLER, J. Peripheral nerve injury. **Curr Sports Med Rep**, v. 14, n. 5, p. 356-7, set-out., 2015.
16. MARQUES NETO, O.R.; LEITE, M.S.; FREITAS, T.; MENDELOVITZ, P.; VILLELA, E.A. *et al.* The role of magnetic resonance imaging in the evaluation of peripheral nerves following traumatic lesion: where do we stand? **Acta Neurochir**. 159, 281–290, 2017.
17. FERRANTE, M.A. The assessment and management of peripheral nerve trauma. **Curr Treat Options Neurol**, v. 20, n. 7, p. 25-43, jul., 2018.
18. KIM, S.J.; HONG, S.H.; JUN, W.S. *et al.* MR Imaging Mapping of Skeletal Muscle Denervation in Entrapment and Compressive Neuropathies. **RadioGraphics**, 31:319–332, 2011.
19. SCHWARZ, D.; WEILER, M.; PHAM, M. *et al.* Diagnostic Signs of Motor Neuropathy in MR Neurography: Nerve Lesions and Muscle Denervation. **Eur Radiol**, 25: 1497, 2015.
20. DE MEDINACELI, L. Use of sciatic function index and walking track assessment. **Microsurgery**, v. 11, n. 2, p. 191, 1990.
21. BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, D.A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconstr Surg.**, v. 83, n. 1, p. 129-38, jan., 1989.
22. TAKHTFOOLADI, M.A.; JAHANBAKHS, F.; TAKHTFOOLADI, H.A.; YOUSEFI, K.; ALLAHVERDI, A. Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm²) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers Med Sci**, v. 30, p. 1047–52, abr., 2015.
23. MANGUEIRA, M.A.M.M.; MANGUEIRA, N.M.; GAMA FILHO, O.P.; HELUY, R.A.; SILVEIRA JR, L.; DÁQUER, E.G.C.M.A. Biochemical changes in injured sciatic nerve of rats after low-level laser therapy (660 nm and 808 nm) evaluated by Raman spectroscopy. **Lasers Med Sci.**, v. 34, n.3, p. 525-35, set., 2018.
24. CRANE, N.J.; ELSTER, E.A. Vibrational spectroscopy: a tool being developed for the noninvasive monitoring of wound healing. **J Biomed Opt.**, v. 17, n. 1, p. 109-12, jan., 2012.

25. MORISAKI, S.; OTA, C.; MATSUDA, K.; KAKU, N.; FUJIWARA, H.; ODA, R. et al. Application of Raman spectroscopy for visualizing biochemical changes during peripheral nerve injury in vitro and in vivo. **J Biomed Opt.**, v. 18, n. 11, p. 116011-8, nov., 2013.
26. HANLON, E.B.; MANOHARAN, R.; KOO, T.W.; SHAFER, K.E.; MOTZ, J.T.; FITZMAURICE, M.; et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Phys Med Biol.**, v. 45, n. 2, p. R1-R59, fev., 2000.
27. TU, Q.; CHANG, C. Diagnostic applications of Raman spectroscopy. **Nanomedicine**, v. 8, p. 545– 58, 2012.
28. KUZMIN, A.N.; PLISS, A.; PRASAD, P.N. Ramanomics: New Omics Disciplines Using Micro Raman Spectrometry with Biomolecular Component Analysis for Molecular Profiling of Biological Structures. **Biosensors (Basel)**. v. 7, n. 4, p. 52-67, dez., 2017.
29. KUMAMOTO, Y.; HARADA, Y.; TANAKA, H.; TAKAMATSU, T. Rapid and accurate peripheral nerve imaging by multipoint Raman spectroscopy. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 845-55, abr., 2017.
30. MINAMIKAWA, T.; HARADA, Y.; KOIZUMI, N.; OKIHARA, K.; KAMOI, K.; YANAGISAWA, A.; TAKAMATSU, T. Label-free detection of peripheral nerve tissues against adjacent tissues by spontaneous Raman microspectroscopy. **Histochem. Cell Biol**, v. 139, p. 181–193, jan., 2013.
31. COTLER, H.B.; CHOW, R.T.; HAMBLIN, M.R.; CARROLL, J. The Use of Low Level Laser Therapy (LLLT) For Musculoskeletal Pain. **MOJ orthopedics & rheumatology**, v. 2, n. 5, p. 00068, jun., 2015.
32. MACIAS, D.M.; COUGHLIN, M.J.; ZANG K, STEVENS, F.R.; JASTIFER, J.R.; DOTY, J.F. Low-level laser therapy at 635nm for treatment of chronic plantar fasciitis; a placebo-controlled, randomized study. **J Foot Ankle Surg.**, v. 54, p. 768-72, set-out., 2015.
33. CLIJSEN, R.; BRUNNER, A.; BARBERO, M.; CLARYS, P.; TAEYMANS, J. Effects of low-level laser therapy on pain in patients with musculoskeletal disorders: a systematic review and meta-analysis. **Eur J Phys Rehabil Med.** v. 53, n. 5, p. 603-10, ago., 2017.
34. FEEHAN, J.; BURROWS, S.P.; CORNELIUS, L.; COOK, A.M.; MIKKELSEN, K.; APOSTOLOPOULOS, V. *et al.* Therapeutic applications of polarized light: Tissue healing and immunomodulatory effects. **Maturitas**, v. 116, p. 11–17, out., 2018.
35. MACHADO, A.B.M.; HAERTEL, L.M. Neuroanatomia funcional. 3.ed. São Paulo: **Atheneu**, 2006.
36. STEWART. J.D. Peripheral nerve fascicles: Anatomy and clinical relevance. **Muscle Nerve**, v. 28, n. 5, p. 525-41, nov., 2003.

37. CARROLL, S.L. The Molecular and Morphologic Structures That Make Saltatory Conduction Possible in Peripheral Nerve. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 76, n. 4, p. 255–7, abr., 2017.
38. GUYTON, A.C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 11ª ed. Rio de Janeiro, **Elsevier Editora**, 2016.
39. SCHMIDT, C.E.; LEACH, J.B. Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. **Annual Review of Biomedical Engineering**, 5(1), 293–347, 2003.
40. PRÁ, M.A.A. **Matrizes nãoestruturadas bioativas para aplicação na regeneração de nervos periféricos**. Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marschin. 2017. 138f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
41. ROMERO-ORTEGA, MARIO. **Peripheral nerves, anatomy physiology of**. In: Encyclopedia of Computational Neuroscience. Editors Jaeger, Dieter and Jung, Ranu. New York: Springer New York, 2013. ISBN: 978-1-4614-7320-6; DOI: 10.1007/978-1-4614-7320-6-214-1.
42. VALENT, F.; ELEOPRA, R.; MANGANOTTI, P.; PASSADORE, P. A population-based study of injuries to the brachial plexus and to the peripheral nerves of the shoulder girdle and upper limb in the Italian region Friuli Venezia Giulia. **Neurosurg Rev.**, Apr;41(2):519-523, 2018.
43. KOUYOUMDJIAN, J.A. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. **Muscle Nerv**, v. 34, n. 6, p. 785–8, dez., 2006.
44. CIARAMITARO, P.; MONDELLI, M.; LOGULLO, F.; GRIMALDI, S.; BATTISTON, B.; SARD, A. *et al.* Traumatic peripheral nerve injuries: epidemiological findings, neuropathic pain and quality of life in 158 patients. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v.15, n. 2, p. 120-7. Jun., 2010.
45. NOBLE, J.; MUNRO, C.A.; PRASAD, V.S.S.V.; MIDHA, R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. **J Trauma**, v. 45, n. 1, p. 116–22, jul., 1998.
46. BERIS, A.; GKIATAS, I.; GELALIS, I.; PAPADOPOULOS, D.; KOSTAS-AGNANTIS, I. Current concepts in peripheral nerve surgery. **Eur J Orthop Surg Traumatol**, v. 29, n. 2, p. 263-9, fev., 2019.
47. SHEN, C.C.; YANG, Y.C.; HUANG, T.B.; CHAN, S.C.; LIU, B.S. Low-Level Laser-Accelerated Peripheral Nerve Regeneration within a Reinforced Nerve Conduit across a Large Gap of the Transected Sciatic Nerve in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1–12, 2013.
48. GARG, K.; SINHA, S.; SATYARTHEE, G.D.; AGARWAL, D.; GUPTA, D.K.; SHARMA, B.; MAHAPATRA, A.K. Microsurgical Outcome of Post-traumatic

- Peripheral Nerve Injuries: An Experience of 23 Cases and Review of Literature. **Turk Neurosurg**, v. 26, n. 2, p. 297-301, jan., 2016.
49. RASULIC, L. Current concept in adult peripheral nerve and brachial plexus surgery. **J Brachial Plexus Peripher Nerv Injury**, v. 12, n. 1, p. 7–14, out., 2017.
 50. ROBINSON, L.R. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle nerve**. v. 23, n. 6, p. 863-73, jun., 2000.
 51. ANTONIADIS, G.; KRETSCHMER, T.; PEDRO, M.T.; KÖNIG, R.W.; HEINEN, C.P.G.; RICHTER, H.P. Iatrogenic nerve injuries: prevalence, diagnosis and treatment. **Dtsch Arztebl Int**, v. 111, n. 16, p. 273–9, abr., 2014.
 52. MISSIONS, S.; BEKELIS, K.; SPINNER, R.J. Traumatic peripheral nerve injuries in children: epidemiology and socioeconomic. **J Neurosurg Pediatr**, v. 14, n. 6, p. 688-94, dez., 2014.
 53. COSTALES, J.R.; SOCOLOVSKY, M.; LÁZARO, J.Á.S.; GARCÍA, R.A. Peripheral nerve injuries in the pediatric population: a review of the literature. Part I: traumatic nerve injuries. **Childs Nerv Syst**, v. 35, n. 1, p. 29-35, jan., 2019.
 54. WATERS, P.M.; BAE, D.S. Traumatic peripheral nerve injuries. In: Pediatric hand and upper limb surgery: a practical guide. **Springhouse Publishing Co**, U.S., fev., 2012
 55. ATOLINI JÚNIOR, N.; JORGE JUNIOR, J.J.; GIGNON, V.F.; KITICE, A.T.; PRADO, L.S.A. *et al.* Paralisia facial periférica: incidência das várias etiologias num ambulatório de atendimento terciário. **Arq. Int. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 167-171, abr./jun. 2009.
 56. MURRAY, B. Trauma of the nervous system: Pheripheral nerve trauma. In: RADLEY, W. G. et al. (Ed.). **Neurology in Clinical Praticce**: Principles of diagnosis and management. 4. ed. London: Butterworth Heinemann, p. 1179-1198, 2005.
 57. ANTUNES, J.; KARVAT, J.; ARAGÃO, F.F.; BERTOLINI, G.R.F. Laser de baixa potência, no espectro de luz vermelha, em lesão nervosa periférica: revisão sistemática. **Revista Pesquisa em Fisioterapia**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.43-48, maio, 2015.
 58. CAMPBELL, W.W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clin Neurophysiol**, v. 119, p. 1951-65, set., 2008.
 59. SUNDERLAND, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain: A J Neurol**, v. 74, n. 4, p. 491–516, dez., 1951.
 60. SUNDERLAND, S. Nerve Injuries and Their Repair: A Critical Appraisal. Churchill Livingstone, New York, NY, 1991.

61. DELLON, A.L.; MACKINNON, S.E. Basic scientific and clinical applications of peripheral nerve regeneration. **Surg Annu**, 20:59-100, 1988.
62. TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. Princípios da Anatomia e fisiologia. 14ª edição. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2016.
63. SILVA, C.K.; CAMARGO, E.A. Mecanismos envolvidos na regeneração de lesões nervosas periféricas. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 1, p. 93-98, jan/abr, 2010.
64. STOLL, G.; GRIFFIN, J.W.; LI, C.Y.; TRAPP, B.D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. **J Neurocytol**, v.18, n. 5, p. 671-83, out., 1989.
65. LIU, Q.; WANG, X.; YI, S. Pathophysiological Changes of Physical Barriers of Peripheral Nerves After Injury. **Front Neurosci**. v. 12, n. 597, ago., 2018.
66. PISTARINI, L.C.Y. **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®**. 2015. 82f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Programa de Pós-Graduação em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais. Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
67. TIAN, F.; YANG, W.; MORDES, D.A.; WANG, J.Y.; SALAMEH, J.S.; MOK J.; CHEW, J. *et al.* Monitoring peripheral nerve degeneration in ALS by label-free stimulated Raman scattering imaging. **Nat Commun**. v. 31, n. 7, p. 13283, out., 2016.
68. SIQUEIRA, R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. **Rev. Neurocienc.**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 226-233, jul. 2007.
69. DUARTE-MOREIRA, R.J.; CASTRO, K.V.; LUZ-SANTOS, C.; MARTINS, J.V.P.; SÁ, K.N.; BAPTISTA, A.F. Electromyographic Biofeedback in Motor Function Recovery After Peripheral Nerve Injury: An Integrative Review of the Literature. **Appl Psychophysiol Biofeedback**, v. 43, n. 4, p. 247-57, dez., 2018.
70. DVALI, L.; MCKINNON, S. The role of microsurgery in nerve repair and nerve grafting. **Hand Clin**, 21:73-81, 2007.
71. KALLIO, P.K.; VASTAMÄKI, M. An analysis of the results of late reconstruction of 132 median nerves. **J Hand Surg (Br)**, v. 18, n. 1, p. 97-105, fev., 1993.
72. LOVATI, A.B.; D'ARRIGO, D.; ODELLA, S.; TOS, P.; GEUNA, S.; RAIMONDO, S. Nerve Repair Using Decellularized Nerve Grafts in Rat Models: A Review of the Literature. **Front Cell Neurosci**, v. 19, n. 12, p. 427-47, nov., 2018.

73. ZHANG, P.X.; HAN, N.; KOU, Y.H.; ZHU, Q.T.; LIU, X.L.; QUAN, D.P. *et al.* Tissue engineering for the repair of peripheral nerve injury. **Neural Regen Res**, v. 14, n. 1, p. 51-8, jan., 2019.
74. GONCALVES, R.B.; MARQUES, J.C.; MONTE-RASO, V.V.; ZAMARIOLI, A.; CARVALHO, L.C. *et al.* Effects of low-power laser on injured rat sciatic nerve regeneration. **Fisioterapia e Pesquisa**, São Paulo, v.17, n.1, p.34-9, jan/mar, 2010.
75. ROBINSON, L.R. Predicting recovery from peripheral nerve trauma. **Phys Med Rehabil Clin N Am**, v. 29, n. 4, p. 721-33, nov., 2018.
76. KARIMI, H.; FOROOTAN, K.S.; MOEIN, G.; MOSAVI, S.J.; IEKTA, B.G. Survey of the results of acute sciatic nerve repair comparing epineural and perineural techniques in the lower extremities of rat. **Journal of Acute Disease**, 4(1), 18–22, 2015.
77. ABREU, J.A.C.; SOUSA, A.L.; ALVES, C.L.G.F.; NUNES, J.L. Análise histológica da cicatrização de feridas cutâneas experimentais sob ação do laser de baixa potência. **Scientia medica**, v. 21, n. 3, 2011.
78. PETRI, V. Dermatologia prática. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2009.
79. MENDONÇA, G.B.N. **Laser de baixa intensidade na regeneração de nervo isquiático de ratos após tubulização com câmara de silicone**. Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito. 2013. 113f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
80. SILVA JÚNIOR, J.S. "O que é infravermelho?"; *Brasil Escola*. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/o-que-e/fisica/o-que-e-infravermelho.htm>. Acesso em 22 de abril de 2019.
81. LEAL-JUNIOR, E.C.; LOPES-MARTINS, R.A.; BJORDAL, J.M. Clinical and scientific recommendations for the use of photo biomodulation therapy in exercise performance enhancement and post-exercise recovery: current evidence and future directions. **Braz J Phys Ther**, v. 23, n. 1, p. 71-5, jan., 2019.
82. BAVARESCO, T. *et al.* Low-power laser therapy in wound healing. **Journal of Nursing UFPE on line** - ISSN: 1981-8963, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 216-226, jan. 2019. ISSN 1981-8963. Available at: <<https://periodicos.ufpe.br/revistas/revistaenfermagem/article/view/235938>>. Date accessed: 22 abr. 2019. doi:<https://doi.org/10.5205/1981-8963-v13i1a235938p216-226-2019>.
83. LI, X.; ZHANG, L.; GU, S.; SUN, J.; QIN, Z.; YUE, J.; ZHONG, Y.; DING, N.; GAO, R. Comparative effectiveness of extracorporeal shock wave, ultrasound, low-level laser therapy, noninvasive interactive neurostimulation, and pulsed

radiofrequency treatment for treating plantar fasciitis: A systematic review and network meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 97, n. 43, p. 1-12, out., 2018.

84. LEAL-JÚNIOR, E.C.; LOPES-MARTINS, R.A.; DALAN, F.; FERRARI, M.; SBABO, F.M.; GENEROSI, R.A. *et al.* Effect of 655nm low-level laser therapy on exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. **Photomed Laser Surg**. v. 26, n. 5, p. 419-24, out., 2008.
85. CHOW, R.C.; ARMATI, P.; LAAKSO, E.L.; BJORDAL, J.; BAXTER, G.D. Inhibitory effects of laser irradiation on peripheral mammalian nerves and relevance to analgesic effects: a systematic review. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 6, p. 365-81, jun., 2011.
86. PUGLIESE, L.S.; MEDRADO, A.P.; REIS, S.R.A.; ANDRADE, Z.A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui Odontol Bras**, v. 17, n. 4, p. 307-13, out-dez., 2003.
87. ROCHKIND, S. Photobiomodulation in neuroscience: a summary of personal experience. **Photomed Laser Surg**, v. 35, n. 11, p. 604-15, nov., 2017.
88. MANDELBAUM-LIVNAT, M.M.; ALMOG, M.; NISSAN, M. LOEB, E.; SHAPIRA, Y.; ROCHKIND, S. Photobiomodulation triple treatment in peripheral nerve injury: nerve and muscle response. **Photomed Laser Surg**, v. 34, n. 12, p. 638–45, dez., 2016.
89. SHAMIR, M.H.; ROCHKIND, S.; SANDBANK, J.; ALON, M. Doubleblind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low power laser treatment. **J Reconstruct Microsurg**, v. 17, n. 2, p. 133–138, fev., 2001.
90. ANDREO, L.; SOLDERA, C.B.; RIBEIRO, B.G.; DE MATOS, P.R.V.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.S. *et al.* Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury. **Lasers Med Sci**, v. 32, n. 9, p. 2155-65, dez., 2017.
91. PASSARELLA, S.; KARU, T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. **J Photochem Photobiol B**, v. 140, p. 344–58, nov., 2014.
92. KARU, T.I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochem Photobiol**, v. 84, n. 5, p. 1091-9, set-out., 2008.
93. MOHAMMED, I.F.R.; AL-MUSTAWFI, N.; KAKA, L.N. Promotion of regenerative processes in injured peripheral nerve induced by lowlevel laser therapy. **Photomed Laser Surg**, 25:107–111, 2007.
94. SHEN, C.C.; YANG, Y.C.; LIU, B.S. Large-area irradiated low-level lasereffect ina biodegradable nerve guideconduitonneutralregeneration of peripheral nerve injury in rats. **Injury**, v. 42, n. 8, p. 803–13, ago., 2011.

95. AKGUL, T.; GULSOY, M.; GULCUR, H.O. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. **Lasers Med Sci**, Londres, v.29, n. 1, p. 351–57, jan., 2014.
96. CÂMARA, C.N.; BRITO, M.V.; SILVEIRA, E.L.; SILVA, D.S.; SIMÕES, V.R.; PONTES, R.W. Histological analysis of low-intensity laser therapy effects in peripheral nerve regeneration in Wistar rats. **Acta Cir Bras**, v. 26, n. 1, p. 12–18, fev., 2011.
97. GOMES, L.E.; DALMARCO, E.M.; ANDRÉ, E.S. The brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, neurotrophin-3, and induced nitric oxide synthase expression after low-level laser therapy in an axotomy experimental model. **Photomed Laser Surg**, v. 30, n. 11, p. 642–7, nov., 2012.
98. ALCÂNTARA, C.C.; GIGO-BENATO, D.; SALVINI, T.F.; OLIVEIRA, A.L.; ANDERS, J.J.; RUSSO, T.L. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute neural recovery and inflammation-related gene expression after crush injury in rat sciatic nerve. **Lasers Surg Med**, v. 45, n. 4, p. 246–52, abr., 2013.
99. BARBOSA, R.I.; MARCOLINO, A.M.; GUIRRO R.R.J.; MAZZER, N.; BARBIERI, C.H.; FONSECA, M.C.R. Comparative effects of wave lengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers Med Sci**, v. 25, n. 3, p. 423–30, maio, 2010.
100. TOS, P.; RONCHI, G.; PAPALIA, I.; SALLEN, V.; LEGAGNEUS, J.; GEUNA, S.; GIACOBINI-ROBECCHI, M.G. Chapter 4: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part I—experimental models. **Int Rev Neurobiol**, v. 87, p. 47–79, fev., 2009.
101. BELCHIOR, A.C.G.; DOS REIS, F.A.; NICOLAU, R.A.; SILVA, I.S.; PEREIRA, D.M.; DE CARVALHO, P.T. Influence of laser (660 nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers Med Sci**, v. 24, n. 6, p. 893–9, nov., 2009.
102. SOUSA, F.F.; ANDRAUS, R.A.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N. Influence of laser radiation in nerve regeneration in different treatments sites. **Acta Ortop Bra**, v. 17, n. 6, p. 331–335, 2009.
103. BERTOLINI, G.R.; ARTIFON, E.L.; SILVA, T.S.; CUNHA, D.M.; VIGO, P.R. Low-level laser therapy, at 830 nm, for pain reduction in experimental model of rats with sciatica. **Arq. Neuro-Psiquiatr**. v. 69, n. 2b, p. 356-359, 2011.
104. RAMAN, C.V.; KRISHNAN, K.S. A New Type of Secondary Radiation. **Nature**, v. 121, p. 501-2, mar., 1928.
105. WANG, W.T.; ZHANG, H.; YUAN, Y.; GUO, Y.; HE, S.X. Research Progress of Raman Spectroscopy in Drug Analysis. **AAPS PharmSciTech**. v. 19, n. 7, p. 2921-8, out., 2018.

106. WILLARD, H.H.; HOBART, H.; MERRITT, L.L.; DEAN, J.A. Instrumental Methods of Analysis. **J. Chem. Educ.** v. 43, n. 9, p. 506, set., 1966.
107. DAS, R.S.; AGRAWAL, Y.K. Raman spectroscopy: recent advancements, techniques and applications. **Vibrational Spectroscopy**, v. 57, p. 163-76, nov., 2011.
108. MACRITCHIE, N.; GRASSIA, G.; NOONAN, J.; GARSIDE, P.; GRAHAM, D.; MAFFIA, P. Molecular imaging of atherosclerosis: spotlight on Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman scattering. **Heart**, v. 104, n. 6, p. 460–7, mar., 2018.
109. SAHU, A.; KRISHNA, C.M. Optical diagnostics in oral cancer: An update on Raman spectroscopy applications. **J Can Res Ther**, v. 13, n. 6, p. 908-15, out-dez., 2017.
110. KAUR, H.S. Instrumental methods of chemical analysis. 3^a ed. **Pragati Prakashan**, Meerut, 2006.
111. RICHARDS-KORTUM, R.; SEVICK-MURACA, E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. **Annu Rev Phys Chem.** v.47, p. 555-606, 1996.
112. ELLIS, D.I.; BREWSTER, V.L.; DUNN, W.B.; ALLWOOD, J.W.; GOLOVANOV, A.P.; GOODACRE, R. Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination. **Chem Soc Rev.** v. 41, n. 17, p. 5706-27, set., 2012.
113. BUGAY, D.E.; SMITH, P.A.M. In: Jickels, A.S. Negrusz (Eds). Clarke's Analytical Forensic Toxicology, 3^a ed, **Pharmaceutical Press**, London, 455-68, cap.17, 2008.
114. DIJKSTRA, R.J.; ARIESE, F.; GOOJER, C.; BRINKMAN, U.A. Raman spectroscopy as a detection method for liquid-separation techniques. **Trends Anal. Chem.**, v. 24, n. 5, p. 304-23, abr., 2005.
115. KUCHA, C.T.; LIU, L.; NGADI, M.O. Non-Destructive Spectroscopic Techniques and Multivariate Analysis for Assessment of Fat Quality in Pork and Pork Products: A Review. **Sensors (Basel)**, v. 18, n.2, p. 377-400, jan., 2018.
116. CHARAN, J.; KANTHARIA, N.D. How to calculate sample size in animal studies? **J Pharmacol Pharmacother**, v. 4, n. 4, p. 303-6, out., 2013.
117. FESTING, M.F.; ALTMAN, D.G. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. **ILAR J**, 43: 244–258, 2002.
118. SEABRA, I.D.; POMPEU, E.; VALENTI, M.L.G. Anestesia e analgesia de animais utilizados em protocolos experimentais. **Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 2014.

http://www.bioterio.fm.usp.br/pdf/Anestesia_e_Analgesia.pdf. Acesso em 08 Mar 2018.

119. HANDWERKER, H.O.; KOBAL, G. Psychophysiology of experimentally induced pain. **Physiol Ver**, v. 73, n. 3, p. 639-71, jul., 1993.
120. MINAMIKAWA, T.; HARADA, Y.; TAKAMATSU, T. Ex vivo peripheral nerve detection of rats by spontaneous Raman spectroscopy. **Sci Rep.**, v. 5, n. 1, p. 17165-76, nov., 2015.
121. SILVEIRA, L.; SILVEIRA, F.L.; BODANESE, B.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO, M.T. Discriminating model for diagnosis of basal cell carcinoma and melanoma in vitro based on the Raman spectra of selected biochemicals. **J Biomed Opt.**, v. 17, n. 7, p. 77003-15. Erratum in: *J Biomed Opt.* 18(3):039801, jul., 2012.
122. KRAFFT, C.; NEUDERT, L.; SIMAT, T.; SALZER, R. Near infrared Raman spectra of human brain lipids. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.**, v. 61, n. 7, p. 1529-35, mai., 2005.
123. TALARI, A.C.S.; MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, 50(1), 46–111, 2014.
124. LAKSHMI, R.J.; KARTHA, V.B.; KRISHNA, C.M.; SOLOMON, J.G.R.; ULLAS, G.; UMADEVI, P. Tissue Raman Spectroscopy for the Study of Radiation Damage: Brain Irradiation of Mice. **Radiation Research**, 157(2), 175–182, 2002.
125. NOTINGHER, I.; VERRIER, S.; HAQUE, S.; POLAK, J.M.; HENCH, L.L. Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: Living cells versus dead cells. **Biopolymers**, 72(4), 230–240, 2003.
126. VERRIER, S.; NOTINGHER, I.; POLAK, J.M.; HENCH, L.L. In situ monitoring of cell death using Raman microspectroscopy. **Biopolymers**, 74(1-2), 157–162, 2004.
127. CHENG, W.T.; LIU, M.T.; LIU, H.N.; LIN, S.Y. Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatixoma. **Microsc Res Tech.**, v. 68, n. 2, p. 75-84, out., 2005.
128. SHETTY, G.; KEDALL, C.; SHEPHERD, N.; STONE, N.; BARR, H. Raman spectroscopy: Elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. **Br J Cancer**, v. 94, n. 10, p. 1460-4, mai., 2006.
129. BITAR, R.A.; MARTINHO, H.S.; TIERRA-CRIOLLO, C.J.; ZAMBELLI RAMALHO, L.N.; NETTO, M.M.; MARTIN, A.A. Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, 11(5), 054001, 2006.

130. NOTINGHER, I. Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors. **Sensors**, 7(8), 1343–1358, 2007.
131. GELDER, J.D.; GUSSEM, K.D.; VANDENABEELE, P.; MOENS, L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. **Journal of Raman Spectroscopy**, 38(9), 1133–1147, 2007.
132. CHAN, J.W.; TAYLOR, D.S.; ZWERDLING, T.; LANE, S.T.; IHARA, K.; HUSER, T. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. **Biophysical Journal**, 90: 648–656, 2006.
133. GAJJAR, K.; HEPPENSTALL, L.D.; PANG, W., ASHTON, K.M.; TREVISAN, J.; PATEL, I.I. *et al.* Diagnostic segregation of human brain tumors using Fourier-transform infrared and/or Raman spectroscopy coupled with discriminant analysis. **Anal. Methods** 5 (1), 89–102, 2013.
134. FRASER, P.E.; DEBER, C.M. Structure and function of the proline-rich region of myelin basic protein. **Biochemistry**, 24(17), 4593–4598, 1985.
135. LI, X., LIN, J.; DING, J.; WANG, S.; LIU, Q.; QING, S. **Raman spectroscopy and fluorescence for the detection of liver cancer and abnormal liver tissue**. *In: ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY SOCIETY, 2004. IEMBS'04. 26TH ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE IEEE, San Francisco, CA, 2004. p. 212–215.*
136. STONE, N.; KENDALL, C.; SMITH, J.; CROW, P.; BARR, H. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. **Faraday Discuss.**, v. 126, n. 1, p. 141-57, 2004.
137. NOTINGHER, I.; GREEN, C.; DYER, C. Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity in vitro using Raman spectroscopy. **Journal of the Royal Society Interface**, 1: 79–90, 2004.
138. GREMLICH, HANS-ULRICH; YAN, BING. **Infrared and raman spectroscopy of biological materials**. 10 ed. New York: Marcel Dekker, 2001. ISBN: 0-8247-0409-6.
139. ZHU, G.; ZHU, X.; FAN, Q.; WAN, X. Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 78(3), 1187–1195, 2011.
140. NIJSSEN, A.; SCHUT, T.C.B.; HEULE, F.; CASPERS, P.J.; HAYES, D.P., NEUMANN, M. *et al.* Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by raman spectroscopy. **Journal of Investigative Dermatology**, 119, 64–69 (2002).
141. HUANG, Z.; MCWILLIAMS, A.; LUI, M.; MCLEAN, D.I.; LAM, S.; ZENG, H. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. **International Journal of Cancer**, 107: 1047–1052, 2003.

142. ZELIG, U.; MORDECHAI, S.; SHUBINSKY, G.; SAHU, R.K.; HULEIHEL, M., LEIBOVITZ, E.; KAPELUSHNIK, J. Pre-screening and follow-up of childhood acute leukemia using biochemical infrared analysis of peripheral blood mononuclear cells. *Biochimica et Biophys. Acta (BBA)-Gen. Subj.* 1810(9): 827–835, 2011.
143. BROZEK-PLUSKA, B.; MUSIAL, J.; KORDEK, R.; BAILO, E.; DIEING, T.; ABRAMCZYK, H. Raman spectroscopy and imaging: applications in human breast cancer diagnosis. *The Analyst*, 137(16), 3773, 2012.
144. ABRAMCZYK, H.; BROZEK-PLUSKA, B.; SURMACKI, J.; JABLONSKA-GAJEWICZ, J.; KORDEK, R. Raman “optical biopsy” of human breast cancer. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 108(1-2), 74–81, 2012.
145. KATEINEN, E.; ELOMAA, M.; LAAKKONEN, U.M.; SIPPOLA, E.; NIEMELA, P.; SUHONEN, J.; JARNINEN, K. Qualification of the amphetamine content in seized street samples by Raman spectroscopy. *Journal of Forensic Science*, 52 (1): 88–92, 2007.
146. MALINI, R.; VENKATAKRISHNA, K.; KURIEN, J.M.; PAI, K.; RAO, L.; KARTHA, V.B.; KRISHNA, C. M. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study. *Biopolymers*, 81(3), 179–193, 2006.
147. COUTINHO, E.S.T. **Espectroscopia raman Ex Vivo da porção anterior e posterior a áreas com lesões medulares tratadas com membrana amniótica**. Orientadora: Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa. 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, 2017.
148. SURMACKI, J.; BROZEK-PLUSKA, B.; KORDEK, R.; ABRAMCZYK, H. The lipid-reactive oxygen species phenotype of breast cancer. Raman spectroscopy and mapping, PCA and PLS-DA for invasive ductal carcinoma and invasive lobular carcinoma. Molecular tumorigenic mechanisms beyond Warburg effect. *The Analyst*, 140(7), 2121–2133, 2015.
149. CAINE, S.; HERAUD, P.; TOBIN, M. J.; MCNAUGHTON, D.; BERNARD, C.C. The application of Fourier transform infrared microspectroscopy for the study of diseased central nervous system tissue. *Neuroimage*, 59(4): 3624–3640, 2012.
150. ZHANG, G.; MOORE, D.J.; FLACH, C.R.; MENDELSON, R. Vibrational microscopy and imaging of skin: from single cells to intact tissue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(5), 1591–1599, 2007.
151. FAOLÁIN, E.O.; HUNTER, M.B.; BYRNE, J.M.; KELEHAN, P.; MCNAMARA, M.; BYRNE, H.J.; LYNG, F.M. A study examining the effects of tissue processing on human tissue sections using vibrational spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 38: 121–127, 2005.

152. KATAINEN, E.; ELOMAA, M.; LAAKKONEN, U.-M.; SIPPOLA, E.; NIEMELÄ, P.; SUHONEN, J.; JÄRVINEN, K. Quantification of the Amphetamine Content in Seized Street Samples by Raman Spectroscopy. **Journal of Forensic Sciences**, 52(1), 88–92, 2007.
153. MENDELSON, R.; FLACH, C.R.; MOORE, D.J. Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, 1758(7), 923–933, 2006.
154. KNEIPP, J.; SCHUT, T.B.; KLIFFEN, M.; MENKE-PLUJMERS, M.; PUPPELS, G. Characterization of breast duct epithelia: a Raman spectroscopic study. **Vibrational Spectroscopy**, 32(1), 67–74, 2003.
155. BROZEK-PLUSKA, B.; KOPEC, M.; NIEDZWIECKA, I.; MORAWIEC-SZTANDERA, A. Label-free determination of lipid composition and secondary protein structure of human salivary noncancerous and cancerous tissues by Raman microspectroscopy. **The Analyst**, 140(7), 2107–2113, 2015.
156. NOREEN, R.; CHIEN, C.-C.; DELUGIN, M.; YAO, S.; PINEAU, R.; HWU, Y. *et al.* Detection of collagens in brain tumors based on FTIR imaging and chemometrics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 401(3), 845–852, 2011.
157. SAHER, G.; STUMPF, S.K. Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 8, p. 1083-94, ago., 2015.
158. BROWN, M.D.; HART, C.; GAZI, E.; GARDNER, P.; LOCKYER, N.; CLARKE, N. Influence of omega-6 PUFA arachidonic acid and bone marrow adipocytes on metastatic spread from prostate cancer. **Br. J. Cancer**, 102(2): 403–413, 2010.
159. LAU, D.P.; HUANG, Z.; LUI, H.; ANDERSON, D.W.; BEREN, K.; MORRISON, M.D.; SHEN, L.; ZENG, H. Raman spectroscopy for optical diagnosis in the larynx: Preliminary findings. **Lasers in Surgery and Medicine**, 37: 192–200, 2005.
160. HART, A.M.; TERENCE, G.; WIBERG, M. Neuronal death after peripheral nerve injury and experimental strategies for neuroprotection. **Neurol. Res.**, 30, 999–1011, 2008.
161. BONETTI, L.V.; SCHNEIDER, A. P.; BARBOSA, S.; ILHA, J.; FACCIANI-HEUSER, M. C. Balance and coordination training and endurance training after nerve injury. **Muscle Nerve**, 51 (1), 83–91.32, 2015.
162. CARLTON, J. M.; GOLDBERG, N. Quantitative integrated muscle function following reinnervation. **Surg. Forum**, 37: 611, 1986.

163. FRANCO, R.; RAIMUNDO, S.S.; BELO, M.A.A.; MORAES, F.R.; MOTA, F.C.D.; FATORETTO, L.A. Avaliação de método digital para análise do índice funcional do ciático em ratos. **Bioscience Journal**, 27(2), 2011. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7215/7237>>. Acesso em: 24 mar. 2019.
164. KAKIHATA, C.M.; MALANOTTE, J.A.; KARVAT, J.; BRANCALHÃO, R.M.; RIBEIRO, L.F.C.; BERTOLINI, G.R. The morphological and functional effects of exercise in the aquatic environment, performed before and/or after sciatic nerve compression in Wistar rats. **Journal of exercise rehabilitation**, 12(5), 393–400, 2016. doi:10.12965/jer.1632670.335
165. COSTA, J.; CAMARGO, V.M.; ANDRÉ, E.S. Desenvolvimento de um método de baixo custo para avaliação da marcha em ratos. **Fisioterapia em Movimento**, [S.l.], v. 21, n. 2, set. 2017. ISSN 1980-5918. Disponível em: <<https://periodicos.pucpr.br/index.php/fisio/article/view/19113>>. Acesso em: 22 mar. 2019.
166. GANGULY, A.; McEWEN, C.; TROY, E.L.; COLBURN, R.W.; CAGGIANO, A.O. *et al.* Recovery of sensorimotor function following sciatic nerve injury across multiple rat strains. **Journal of Neuroscience Methods**, 275.25–32, 2017.
167. FARONI, A.; MOBASSERI, A.S.; KINGHAM, P.J.; REID, A.J. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. **Adv Drug Deliv Rev**, mar, 82-83:160-7, 2015.
168. ANDREO, L., SOLDERA, C.A.; RIBEIRO, B.G.; MATOS, P.R.V.; SOUSA, P.B.; AMORIM, W.W.A.A. *et al.* Effects of Photobiomodulation on Functionality in Wistar Rats with Sciatic Nerve Injury. **Photochemistry And Photobiology**, São Paulo, v. 20, n. 1, p.1-7, 30 out. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/php.13048>>. Acesso em: 24 mar. 2019.
169. CATTIN, A.-L.; LLOYD, A.C. The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 39, n.1, 38–46, 2016.
170. ZIAGO, E.K.M.; FAZAN, V.P.S.; YOMASA, M.M.; SOUSA, L.G.; YAMAUCHI, P.Y.; DA SILVA, E.A. *et al.* Analysis of the variation in low-level laser energy density on the crushed sciatic nerves of rats: a morphological, quantitative, and morphometric study. **Lasers Med Sci.**, v. 32, n. 2, p. 369-78, fev., 2017.
171. SANCHEZ, A.D.; ANDRADE, A.L.M.; PARIZOTTO, N.A. Eficácia da terapia a laser de baixa intensidade no controle da dor neuropática em camundongos. **Fisioter. Pesqui.**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 20-27, Mar, 2018. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fp/v25n1/2316-9117-fp-25-01-20.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2019.
172. SOUZA, L.G. **Análise Comparativa de Efeito da Fotobiomodulação (Laser, 660 nm) Associada á Dexametasona após lesão por Esmagamento de Nervo Ciático em camundongos**. Orientador: Rafael Inácio Barbosa. 2017. 33

f. TCC (Graduação) - Curso de Fisioterapia, Universidade Federal de Santa Catarina, Araranguá, 2017.

173. DE ANDRADE, A.L.M.; BOSSINI, P.S.; DE SOUZA, A.L.M.C.; SANCHEZ, A.D.; PARIZOTTO, N.A. Effect of photobiomodulation therapy (808 nm) in the control of neuropathic pain in mice. **Lasers Med Sci.**, v. 32, n. 4, p. 865-72, mai., 2017.
174. SHIPP, D.W.; SINJAB, F.; NOTINGHER, I. Raman spectroscopy: Techniques and applications in the life sciences. **Advances in Optics and Photonics**, 9(2), 315, 2017.
175. ZÖLLER, I.; MEIXNER, M.; HARTMANN, D.; BÜSSOW, H.; MEYER, R.; GIESELMANN, V.; ECKHARDT, M. Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration. **J Neurosci.**, v. 28, n. 39 p. 9741-54, set., 2008.
176. FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; BROWN, H.A.; GLASS, C.K.; MERRILL, A.H.J.; MURPHY, R.C. et al. A comprehensive classification system for lipids. **J Lipid Res.**, v. 46, n. 5, p. 839-61, mai., 2005.
177. BARON, W.; HOEKSTRA, D. On the biogenesis of myelin membranes: sorting, trafficking and cell polarity. **FEBS Lett.**, v. 584, n. 9, p. 1760-70, mai., 2010.
178. ABRAMCZYK, H.; IMIELA, A. The biochemical, nanomechanical and chemometric signatures of brain cancer. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 188, 8–19, 2018.
179. MANGUEIRA, N.M.; XAVIER, M.; DE SOUZA, R.A.; SALGADO, M.A.C.; SILVEIRA JR, L.; VILLAVERDE, A.B. Effect of Low-Level Laser Therapy in an Experimental Model of Osteoarthritis in Rats Evaluated Through Raman Spectroscopy. **J Photomed Laser Surg.**, v.33, n. 3, p. 145-53, mar., 2015.
180. AGUIAR, R.P.; SILVEIRA, L. JR.; FALCÃO, E.T.; PACHECO, M.T.; ZÂNGARO, R.A.; PASQUALUCCI, C.A. Discriminating neoplastic and normal brain tissues in vitro through Raman spectroscopy: a principal components analysis classification model. **Photomed Laser Surg.**, v. 31, n. 12, p. 595-604, dez., 2013.
181. JESSEN, K.R.; MIRSKY, R.; LLOYD, A.C. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 7(7), a020487, 2015.
182. RIBEIRO, B.G.; ALVES, A.N.; SANTOS, L.A.D.; FERNANDES, K.P.S.; CANTERO, T.M. et al. The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. **Lasers in Surgery and Medicine**, 47(7), 571–578, 2015.
183. ALVES, A.N.; FERNANDES, K.P.S.; MELO, C.A.V.; YAMAGUCHI, R.Y.; FRANÇA, C.M. et al. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. **Lasers in Medical Science**, 29(2), 813–821, 2014.

184. MOHAMMED, I.F.R.; AL-MUSTAWFI, N.; KAKA, L.N. Promotion of regenerative processes in injured peripheral nerve induced by low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg**, 25:107–111, 2007.
185. CHEN, Y.J.; WANG, Y.H.; WANG, C.Z.; HO, M.L.; KUO, P.L.; HUANG, M.H. *et al.* Effect of Low Level Laser Therapy on Chronic Compression of the Dorsal Root Ganglion. **PLoS ONE**, 9(3), e89894, 2014.
186. GORDON, T.; BORSCHEL, G.H. The use of the rat as a model for studying peripheral nerve regeneration and sprouting after complete and partial nerve injuries. **Experimental Neurology**, 287, 331–347, 2017.
187. MOURA JÚNIOR, M.J.; MAIA FILHO, A.L.; PESSOA, D.R.; ALVES, M.D.; JUSTINO, J.S.; ANDRADE, M.S. *et al.* Assessing the biochemical changes of tendons of rats in an experimental model of tenotomy under therapeutic ultrasound and leds (625 and 945 nm) by near-infrared raman spectroscopy. **Lasers Med Sci.**, v.30, n. 6, p. 1729-38, ago., 2015.
188. DE SOUZA, R.A.; XAVIER, M.; MANGUEIRA, N.M.; SANTOS, A.P.; PINHEIRO, A.L.; VILLAVARDE, A.B.; SILVEIRA JR, L. Raman spectroscopy detection of molecular changes associated with two experimental models of osteoarthritis in rats. **Lasers Med Sci.**, v. 29, n. 2, p. 797-804, mar., 2014.

ANEXO A - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMA.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito da terapia laser de baixa intensidade em modelo experimental após lesão do nervo ciático avaliados por meio da espectroscopia Raman**" registrada com o nº 23115.005396/2016-65, sob a responsabilidade de Nilton Maciel Mangueira que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **Aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 19/08/2016.

FINALIDADE	()Ensino (X)Pesquisa () Extensão
Vigência da autorização	11/08/2016 à 10/08/2018
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> (rato)/Wistar
Nº de animais	48
Peso/Idade	200-250g / 1 mês
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMA

Lucilene Amorim Silva

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva
 Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
 UFMA

ANEXO B – Formato final do 1^o artigo científico submetido

Lasers in Medical Science
<https://doi.org/10.1007/s10103-018-2637-1>

ORIGINAL ARTICLE



Biochemical changes in injured sciatic nerve of rats after low-level laser therapy (660 nm and 808 nm) evaluated by Raman spectroscopy

Melissa de Almeida Melo Maciel Manguiera¹ · Nilton Maciel Manguiera² · Ozimo Pereira Gama Filho² · Márcio Moysés de Oliveira² · Renato Albuquerque Heluy² · Landolfo Silveira Jr³ · Egas Caparelli Moniz de Aragão Dâquer⁴

Received: 24 May 2018 / Accepted: 27 August 2018
 © Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2018

Abstract

The aim of this study was to identify biochemical changes in sciatic nerve (SN) after crush injury and low-level laser therapy (LLLT) with 660 nm and 808 nm by Raman spectroscopy (RS) analysis. A number of 32 Wistar rats were used, divided into four groups (control 1, control 2, LASER 660 nm, and LASER 808 nm). All animals underwent surgical procedure of the SN and groups control 2, LASER 660 nm, and LASER 808 nm were submitted to SN crush damage (axonotmesis). The LLLT in the groups LASER 660 nm and LASER 808 nm was applied daily for 21 consecutive days (100 mW, 30 s, 133 J/cm² fluence). The hind paw was removed and the SN was dissected and positioned on an aluminum support to collect dispersive Raman spectra (830 nm excitation, 30 s accumulation). To estimate the biochemical changes in the SN associated with LLLT, the principal component analysis (PCA) was applied. The Raman spectra of the sciatic nerve fragments showed peaks of the major biochemical components of the nerve, especially sphingolipids, phospholipids, glycoproteins, and collagen. The spectral features identified in some of the principal component loading vectors are referred to the biochemical elements present on the SN and were increased in the groups treated with LLLT, mainly lipids (sphingo and phospholipids) and proteins (collagen)—constituents of the myelin sheath. The RS was effective in identifying the biochemical differences in the SN after the crush injury, and LASER 660 nm was more efficient than the LASER 808 nm in cell proliferation and repair of the injured SN.

Keywords Peripheral nerve · Low-level laser therapy · Raman spectroscopy · Biochemical changes

Introduction

The peripheral nervous system (PNS) has a great ability to regenerate after a traumatic injury, even in the case of total transection, but functional recovery does not always occur completely [1]. Traumatic injuries by crushing, classified as axonotmesis grade II, despite causing axonal damage with damage of the myelin sheath, maintain the supporting tissue (endoneurium) and are therefore reversible [2, 3]. Such injuries cause neuropathic pain, sensory-motor deficit, and significant morphofunctional impairment [4], and for this reason, this axonotmesis needs to be treated early and properly, since it affects the ability of the nerve impulse to propagate and can cause transient or permanent functional deficits [5–7].

The tissue repair process involves distinct and complex multicellular responses that contribute to reestablishment and reorientation of axons in the injured area. Schwann cells, associated to inflammatory cells and macrophages, express cell

✉ Nilton Maciel Manguiera
 nm.manguiera@ufma.br

¹ Department of Physiotherapy, Faculdade Santa Teresinha – CEST, São Luís, Maranhão, Brazil

² Department of Morphology, Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Cidade Universitária Dom Delgado, Av. dos Portugueses, 1986, Bacanga, São Luís, Maranhão 65080-803, Brazil

³ Center for Innovation, Technology and Education – CITE, Universidade Anhembis Morumbi – UAM, Parque Tecnológico de São José dos Campos, Estrada Dr. Altino Bondesan, 500, São José dos Campos, São Paulo 12247-016, Brazil

⁴ Physiological Sciences Department, Roberto Alcântara Gomes Biology Institute, Rio de Janeiro State University, Avenida Professor Manoel de Abreu, 444/ 5º andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 20550-170, Brazil

adhesion molecules in the interaction with matrix proteins aiming to remodel the injured area and to promote axonal growth [8], allowing a physical support to the injured area and producing neurotrophic factors, extracellular matrix molecules, and integrins that contribute to the nerve regeneration, besides producing fibronectin, tenascin, heparin sulfate, and collagen to enhance the extracellular matrix lost due to the injury [9].

Early diagnosis of peripheral nerve injury (PNI) is essential in establishing effective therapeutic approaches. Several methods are proposed to identify the PNIs such as magnetic resonance (MR), which evaluates PNI abnormalities by means of changes in signal intensity based on disorganization or loss of nerve fascicular pattern, therefore being a non-invasive technique used for volumetric assessment [10]; electroneuromyography, which diagnoses axonal degeneration through nerve conduction with high sensitivity even in lower degrees of axonal loss [11]; and histomorphometry and immunohistochemistry, the first one is used to measure the repair of nerve tissue through the number of regenerated fibers and the second one is used to identify the distribution and location of specific biomarkers and proteins in different parts of the tissue [12]. Besides the routine use of such techniques, these methods have limitations due to low or no molecular sensitivity, lack of spatial resolution, need for sample preparation, and being time consuming, among others.

Optical techniques such as Raman spectroscopy have been prominent in the biomedical area as a tool for the identification of molecular biomarkers in tissues and fluids aimed at characterization and evaluation of the physiological status in biological processes and diagnoses [13–17]. Compared to immunohistochemical analysis, Raman spectroscopy was effective in the routine chemistry-free diagnosis of peripheral nerve regeneration [13] by examining the biochemical changes of the sciatic nerve after crush injury, showing important peaks in the high wavenumber range (2800 to 3000 cm^{-1}), assigned to phospholipids and proteins. Peaks at 2851, 2885, and 2909 cm^{-1} , which are attributed to phospholipids and CH_2 vibration modes of proteins, reflect the composition of the nerve since the Schwann cells are responsible for the remodeling of the myelin sheath and produce sphingomyelin and proteins. The peak pattern of the axons was distinct from that of the Schwann cells in the same spectral range due to the different composition of both structures [13].

Among the therapeutic resources for PNI, low-level laser therapy (LLLT) is a technique commonly used in clinical practice [18]. Laser has photobiostimulation properties that act directly in pain and functional disability through analgesic and anti-inflammatory effects, muscle relaxation, tissue healing, and fibroblastic proliferation [19, 20]. In the literature, there are many studies that show the effects on the sciatic nerve regeneration process after LLLT [20–22], as well as

physiological responses associated to the therapy time [18–22]. However, studies that compare two different wavelengths during 21 days of treatment are hardly found in literature.

The main objective of this work was to identify, by means of Raman spectroscopy, the biochemical changes present in the repair of the sciatic nerve tissue after crush damage and treatment with LLLT irradiation at 660 and 808 nm (133 J/cm^2) during 21 days compared to controls (not injured and injured but not treated). Raman spectroscopy has been used to detect biochemical changes in tendons, knees, and bones as a result of LLLT applied to lesioned tissues with great success [15–17]; therefore, the technique can meet the criteria to detect biochemical changes in injured sciatic nerves by evaluating the differences in the peaks of the irradiated and non-irradiated groups and correlating those peaks with the peaks of the biochemicals present in the tissue.

Materials and methods

Ethical guidelines and samples This experimental study was done in the Maranhão Experimental Surgery Academic League (LACEMA) from Federal University of Maranhão (UFMA) and approved by the Commission of Ethics in the Use of Animals (CEUA) from UFMA, under protocol no. 23115.005396/2016-65. It used 32 female Wistar rats, 7 weeks old, weighing on average 200 g. Animals were randomly divided into four groups of eight animals each (CONTR 1; CONTR 2; LASER 660 nm; LASER 808 nm) and followed for a period of 21 days. All the groups underwent surgical procedure for the exposure of the sciatic nerve (as detailed below). The control 1 group (CONTR 1) did not undergo sciatic nerve damage; in addition to nerve exposure, the other groups (CONTR 2, LASER 660 nm, and LASER 808 nm) were individually submitted to sciatic nerve crush damage, causing axonotmesis. The LLLT was applied only to the groups LASER 660 nm and LASER 808 nm. They were kept in groups of four animals per cage, in a controlled temperature room (23 ± 1 °C) and with 12-h light-dark cycle, receiving proper food and water ad libitum throughout the experimental period of 21 days.

Sciatic nerve injury Each animal was anesthetized with intraperitoneal subcutaneous injection needle (25 × 5 mm), while being held by its back according to the modified protocol of ICB/USP [23]. For the anesthesia, ketamine 10% (90 mg/kg) and xylazine 2% (10 mg/kg) were associated and administered in 0.1 mL/100 g. The anesthesia was confirmed by monitoring the reflex response of tail and cornea, as well as changes of the cardiorespiratory frequencies. Following epilation of the posterior-lateral surface of right thigh, the animal was placed prone on an operating table and antiseptics of the operative

field was done. Under the fenestrated aseptic field, the right sciatic nerve was exposed through skin posterior incision of the lower limb (0.5 cm behind the femur diaphysis and 1 cm above the knee) and division of the posterior muscles of the right paw. The mechanic damage of the sciatic nerve, which causes axonotmesis, was done in the groups CONTR 2, LASER 660 nm, and LASER 808 nm through nerve crush using 16-cm Kelly straight clamp, locked in the second level option, crushing the nerve for 30 s (Fig. 1), which results in a force of approximately 6 N applied to the lesioned nerve [24]. Finally, the wound was sutured and the animal was placed in a cage with water containing analgesics ad libitum.

Low-level laser therapy For the LLLT, it used the TF Premier Plus laser device (MMO Optics, São Carlos, SP, Brazil), consisting of two laser sources: one in the red region (660 nm \pm 10 nm of InGaIP and 100 mW power) and the other in the infrared region (808 nm \pm 10 nm of GaAlAs and 150 mW power). Both lasers were adjusted with the same power (100 mW) to irradiate energy density of 133 J/cm² in a beam output area of 0.03 cm², being delivered 12 J of total energy (three points of 4 J each) with an exposure time of 30 s. The LLLT was applied daily from the 1st postoperative day, in three points 1 cm apart from each other, perpendicular to the injury surface, with the laser head in contact with the tissue. The control groups received the laser head during the same irradiation time and points with the laser turned off.

On the 21st day of treatment, the rats were anesthetized for surgical removal of the right hind paw together with the right hip and lumbar vertebrae, thus preserving the entire extent of the sciatic nerve. Soon after, the animals were euthanized with overdose of the same anesthetics (ketamine 10% and xylazine 2%), placed in a black bag and discarded in the biological waste. The hind paw was frozen (-80°C) and stored during 30 days, being transported with dry ice (-78°C) for Raman spectroscopy analysis.

Raman spectroscopy For Raman spectroscopy analysis, the hind paw was unfrozen and the sciatic nerve, which was still inserted in the hind paw, was dissected by removal of the posterior thigh muscles all the way behind the femur, and

positioned on an aluminum support (Fig. 2) to be exposed to the excitation laser of the Raman spectrometer. The spectra were obtained by means of a fiber optic probe connected to a dispersive Raman spectrometer, positioned perpendicularly to the nerve.

It used a near-infrared Raman spectrometer (model Dimension P-1, Lambda Solutions, Inc., Waltham, MA, USA) [25–27] with a Raman probe (Vector Probe, Lambda Solutions, Inc., Waltham, MA, USA) for sample excitation and signal collection. This spectrometer has an excitation laser at 830 nm, maximum laser power of 350 mW, imaging spectrograph with diffraction grating coupled to a back thinned, deep-depleted CCD camera (1340 \times 100 pixels) of spectral resolution of 2 cm⁻¹ in the useful spectral range of 400 to 1800 cm⁻¹. The output laser power was set to 250 mW at the probe tip, thus avoiding sample degradation by heating. The use of a Raman probe allows one to access the Raman spectra of the bulk samples with repeatability in the excitation and collection geometry. The exposure time for collecting the spectra of sciatic nerve was set to 3 s and 10 accumulations, resulting in a shot noise-limited spectrum with an estimated signal-to-noise ratio greater than 50 for the most intense peaks. Spectra were collected in triplicate.

After Raman spectroscopy, the sciatic nerve still inserted in the hind paw was fixed with buffered formalin 10%, and after 24 h, it was sectioned and submitted to standard histology processing.

After collection and storage, spectra were preprocessed in the software Matlab (v. 2007, The Mathworks Inc., Natick, MA, USA), where the background fluorescence was removed by fitting and subtracting a 7th-order polynomial with the “mpoly” routine [26] in the 400–1800 cm⁻¹ region. Removal of the fluorescence allows a more appropriate identification of the most relevant peaks without the interference of the broadband fluorescence. Spikes due to cosmic rays were removed manually prior the polynomial subtraction.

Identifying the spectral differences in the groups related to the biochemistry of sciatic nerve Spectra were then submitted to principal component analysis (PCA) in order to reveal the spectral differences between the LLLT-irradiated

Fig. 1 Surgical process of sciatic nerve injury. (a) shows the dissection and exposure of the sciatic nerve; (b) shows the compression of the nerve with straight Kelly clamp (approximately 6 N force); and (c) shows the exposure of nerve injury after compression

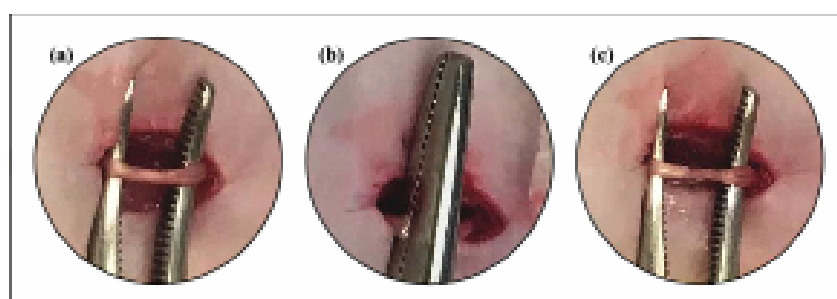
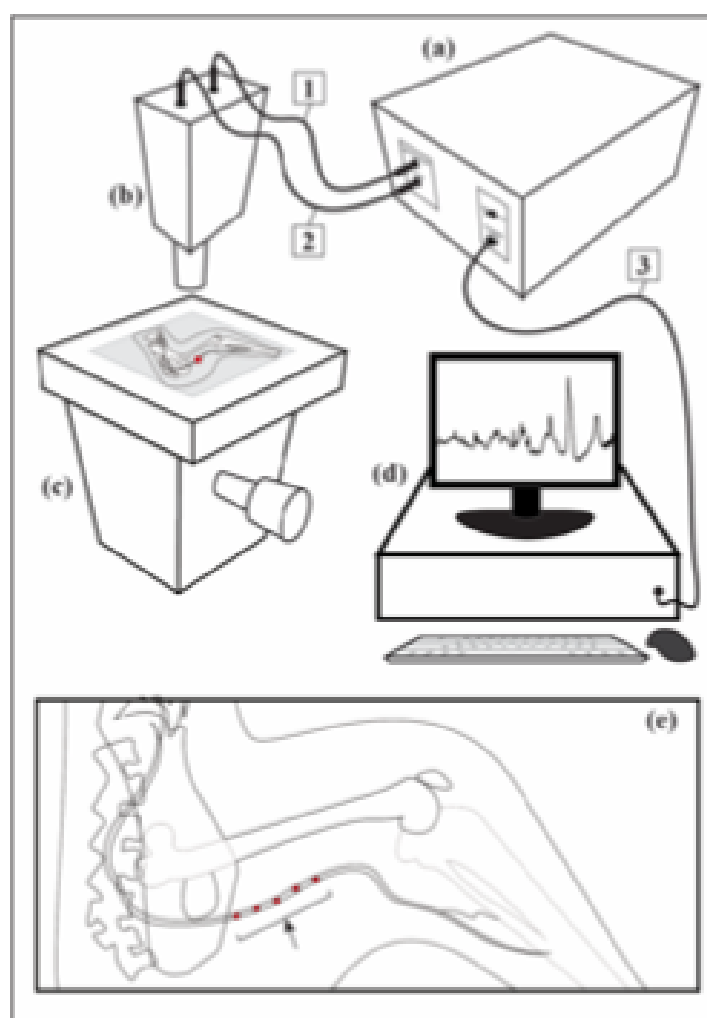


Fig. 2 Schematic diagram of the Raman spectrometer and sample positioned under the probe. The Raman spectrometer (a) connects to the fiber optic Raman probe (b). The laser travels through the excitation fiber (1) and irradiates the sample through the probe (b) held by the aluminum support (c). The scattered signal from the sample is captured (2) and delivered to the spectrograph (a). The electronic converted spectrum is transferred to the computer (d) by the USB cable port (3). In lateral view, an enlarged illustration of the sample (c) shows the five collection points (arrow) of the Raman spectrum in the sciatic nerve



and LLLT-non-irradiated (control) groups and to correlate these differences with the main biochemicals presented in the sciatic nerve, by comparing the PCA spectral features and the published Raman literature. PCA is a multivariate statistical technique suitable for data reduction and feature extraction that transforms original correlated variables into new uncorrelated variables called principal components loading vectors (LVs), based on the maximum variance and the corresponding scores (SCs) [16, 27]. Each LV is orthogonal to each other, so a unique spectral characteristic is present in each vector. The first LV brings the most relevant spectral features presented in the dataset, and the sequent LVs bring remnant variance vectors, orthogonal with each. The SCs bring the intensity of each LV in each spectrum of the dataset [16, 27].

The parameters LVs and SCs resulting from PCA were used to correlate the changes induced by LLLT in the biochemistry of the sciatic nerve. First, the spectral features of each LV were compared to the biochemical composition of the sciatic nerve in the Raman literature of biological tissues [28–36] and the Raman spectra from a dataset from Silveira et al. [26]. Then, the SCs, which are the intensities of each LV in each spectrum, were associated to differences in the relative concentration of the chemicals associated to the spectral features of that particular LV in each group. The possible differences between the means of the SCs of each experimental group were evaluated by the analysis of variance (one-way or non-parametric ANOVA, when specified) with significance level of 5% ($p < 0.05$), followed by a post-test (Tukey-Kramer or Dunn post hoc test when specified).

Results and discussion

The research was performed over 21 days after the sciatic nerve crush injury to compare the biochemical changes resulting from LLLT at two different wavelengths (660 nm and 808 nm). Figure 3 presents the means Raman spectra of sciatic nerve samples from the four groups evaluated by Raman spectroscopy (control without sciatic nerve injury and without laser treatment—CONTR 1; control with sciatic nerve injury and without laser treatment—CONTR 2; LLLT with red laser—LASER 660 nm; and LLLT with infrared laser 808 nm—LASER 808 nm). The spectra showed Raman peaks in the positions of the main biochemical components of the myelinated peripheral nerve tissue (described in Table 1). By

visual inspection, very small spectral differences between the groups were found; therefore, a more detailed exploratory analysis employing multivariate PCA has been performed (Fig. 3).

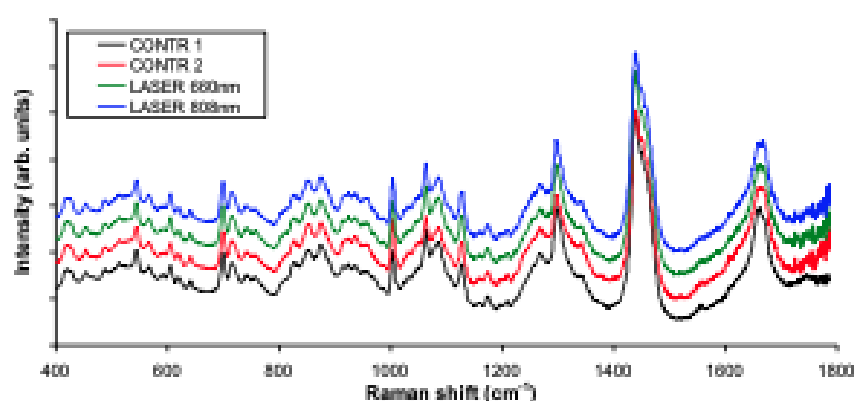
The peak positions presented in Table 1 were obtained from the first principal component loading vector (Fig. 4, left side). In terms of molecular composition revealed by the Raman bands (Table 1), the main biochemical constituents of the myelin sheath of the sciatic nerve are lipids, especially sphingolipids (718, 1065, and 1440 cm^{-1}) and phospholipids (718, 1085, and 1298 cm^{-1}) [13, 29–33, 37–39]. Raman bands of phospholipids are in similar positions as in glycerol tripalmitate at 877, 1065, 1085, 1130, 1298, and 1440 cm^{-1} [29–34, 39]. Sphingomyelin

Table 1 Peak positions of the main Raman bands of the sciatic nerve spectra shown in the principal component loading vectors (Fig. 4). The band assignments of the main biochemical components responsible for these peaks according to the literature are also presented

Raman shift (cm^{-1})	Band assignment [28–35]
423 (421)*	Cholesterol [31]
533)*	$\nu(\text{S-S})$ bridge—cysteine (proteins, glycoproteins) [32]
546 (545)*	Cholesterol [31]
570	Cholesterol; tryptophan (proteins); cytosine/guanine (nucleic acid) [33]
608	Cholesterol [31, 33]
700 (697)*	$\nu(\text{C-S})$ —methionine (proteins); cholesterol [31, 32]
718	C-N (membrane phospholipids head, choline group)—sphingolipids (sphingomyelin) and phospholipids [31, 33]
766)*	Ring breathing—tryptophan [28]
829 (815, 833)*	Proline, hydroxyproline (collagen), and ring breathing (tyrosine); PO_2^- stretch of nucleic acids—phosphodiester [28, 34, 35]
852 (856, 857)*	Proline, hydroxyproline (collagen) [34]
877 (875)*	C-C-N ⁺ symmetric stretching (lipids) [35]; antisymmetric stretch vibration of choline group N ⁺ (CH ₂) ₃ (sphingo and phospholipids—phosphatidylcholine) [31]; hydroxyproline (collagen) [28]
938, 939, 941)*	C-C skeletal—collagen backbone; proline, hydroxyproline (collagen) [33, 34]
1004 (1003, 1006, 1007)*	C-C symmetric ring breathing—phenylalanine (proteins, glycoproteins) [26]
1065 (1062, 1067)*	C-C skeletal stretching and C-O stretching—lipids (sphingo and phospholipids); proline (protein) [28, 31]
1085	C-C skeletal and C-O stretching—unsaturated lipids (sphingo and phospholipids) [31, 33]
1130 (1127, 1132)*	C-N stretching [29] and C-C skeletal acyl backbone—lipids (sphingo and phospholipids) [31, 34]
1239)*	Amide III (collagen) [32]
1270 (1264)*	C=C groups in unsaturated fatty acids (phospholipids) [31]; amide III (proteins) [28]
1298 (1296, 1301, 1306)*	CH ₂ twisting/bending/wagging—unsaturated lipids (sphingo and phospholipids) [31, 32]
1249)*	C=C stretching (saturated lipids); C-N and N-H modes of amide III (envelope)—proteins [34]
1344	CH ₂ /CH ₂ wagging—proteins/glycoproteins [31]
1440 (1435, 1439)*	CH ₂ /CH ₂ bending modes—lipids (saturated and unsaturated—sphingo and phospholipids); cholesterol [31]
1452	CH ₂ bending mode of proteins (collagen) [35]
1469	C=N stretching (proteins) [33]
1643)*	Amide I—proteins (collagen) [30, 33]
1660 (1658)*	C=C stretching— <i>cis</i> in unsaturated fatty acids (sphingo and phospholipids) [31]; C=O stretching (lipids) [35]; amide I (proteins) [30, 33]
1672)*	Amide I (proteins) [30, 33]
1671 (1658)*	C=O stretching (lipids) [35]; cholesterol [31]

*In parentheses are the peaks found in the principal component loading vectors 2 to 6 that were related to the differences in the constitution of the SN induced by the LLLT

Fig. 3 Mean Raman spectra of the control groups (CONTR 1, no injury; and CONTR 2, injured but not treated) and the groups with LLLT treatment (LASER 660 nm and LASER 808 nm). The spectra are similar, denoting little difference in the constitution. Spectral differences between the groups and the band assignments have been described in the exploratory analysis by PCA



is composed of a ceramide group with an attached phosphatidylcholine residue. Choline bands are located at 718 and 877 cm^{-1} in the Raman spectrum of sphingomyelin [31, 33, 35, 39]. Bands at around 1440 cm^{-1} are typical of fatty acids such as cholesterol band (neutral lipids) as well as CH_2/CH_2 bending modes of saturated and unsaturated fatty acids, and bands due to CC and CH groups for both saturated and unsaturated fatty acids dominate the spectrum in the region from 1000 to 1700 cm^{-1} [29, 31, 33–35].

The myelin sheath also is characterized by peaks of glycoproteins and collagen (535, 852, 941, 1004, 1239, and 1344 cm^{-1}) [32–35]. Approximately 70% of the myelin membrane's dry weight consists of lipids, in particular cholesterol—an important structural lipid element of the myelin membrane—and glycolipids and sulfolipid (highly lipids with long saturated and monosaturated fatty acid chains) [31, 32, 35, 40]. Myelin also contains a specific repertoire of myelin proteins, among which proteolipid protein and myelin basic protein are the most abundant ones [37, 40]. Lipids of the myelin membrane also have phospholipids, cholesterol, plasmalogens, and glycosphingolipids [29, 37, 38]. However, they are not as specific as glycosphingolipids and the sulfated derivative (sulfatide) because of their higher abundance of total lipids [41].

The predominant Raman bands of lipids were assigned to the myelinated peripheral nerve (peaks at 1130, 1298, 1440, and 1660 cm^{-1}), and collagen is found in the surrounding region of peripheral nerves (epineurium) and connective tissue, with bands appearing at 829, 852, 877, 1004, 1239, 1452, and 1660 cm^{-1} . Especially the peaks related to aromatic ring—phenylalanine (1004 cm^{-1}), amide III (1239 cm^{-1}), CH_2 bending (1452 cm^{-1}), and amide I (1660 cm^{-1})—show that these Raman bands are related to type I collagen [30].

To estimate the biochemical changes in the nerve tissue associated with the LLLT in sciatic nerve crush injury, PCA was employed. Multivariate statistics such as PCA can be applied in the Raman spectra to reveal the biochemical

constitution of the sample aiming the identification of biochemical changes and diagnosis [16, 26]. The PCA calculates the spectral features of higher variance in the dataset and ranks them according to their importance. With repetition of the experiment, it is possible to identify which bands are important for characterizing the biochemical composition of the tissue in each group (no changes or changes within a particular group) and which ones are introduced in the spectrum as a result of random noise or experimental artifacts [42].

The spectral features presented in the first six LVs (Fig. 4, left) showed Raman bands of main peripheral nerve constituents. The LV 1 showed spectral features of lipids and proteins [31, 39]. Peaks of sphingolipids (particularly sphingomyelin) can be seen at 718, 1065, 1130, 1298, 1440, and 1660 cm^{-1} ; peaks of cholesterol can be seen at 423, 546, 570, 608, 700, 1440, and 1671 cm^{-1} ; peaks of phospholipids (phosphatidylcholine and phosphatidic acid) can be seen at 718, 1065, 1085, 1298, 1440, and 1660 cm^{-1} ; and peaks of proteins (mainly collagen) can be seen at 829, 852, 877, 1004, 1270, 1344, 1452, and 1672 cm^{-1} . The SC 1 (Fig. 4, right) showed that the total amounts of lipids (sphingo and phospholipids) and proteins are different in the groups (ANOVA, $p < 0.001$), being reduced in the CONTR 2 compared to all other groups (Tukey, $p < 0.05$). Since this LV has spectral features of all the gross biochemical constituents of the myelin sheath nerve, and there is no statistically significant difference between the CONTR 1 and the irradiated groups, both light sources acted to recover the gross constitution of the myelin sheath of the sciatic nerve.

The LV 2 showed positive spectral features of proteins at 535, 857, 941, 1004, and 1643–1672 cm^{-1} and negative features of lipids (sphingo and phospholipids) at 1067, 1085, 1301, and 1439 cm^{-1} . The SC 2 showed statistically significant differences between the groups (ANOVA, $p < 0.0001$), being statistically significant the negative intensity of CONTR 1 versus the positive intensity of CONTR 2 (Tukey, $p < 0.001$) and both versus the irradiated groups (Tukey, $p < 0.05$), being the irradiated groups with no significant

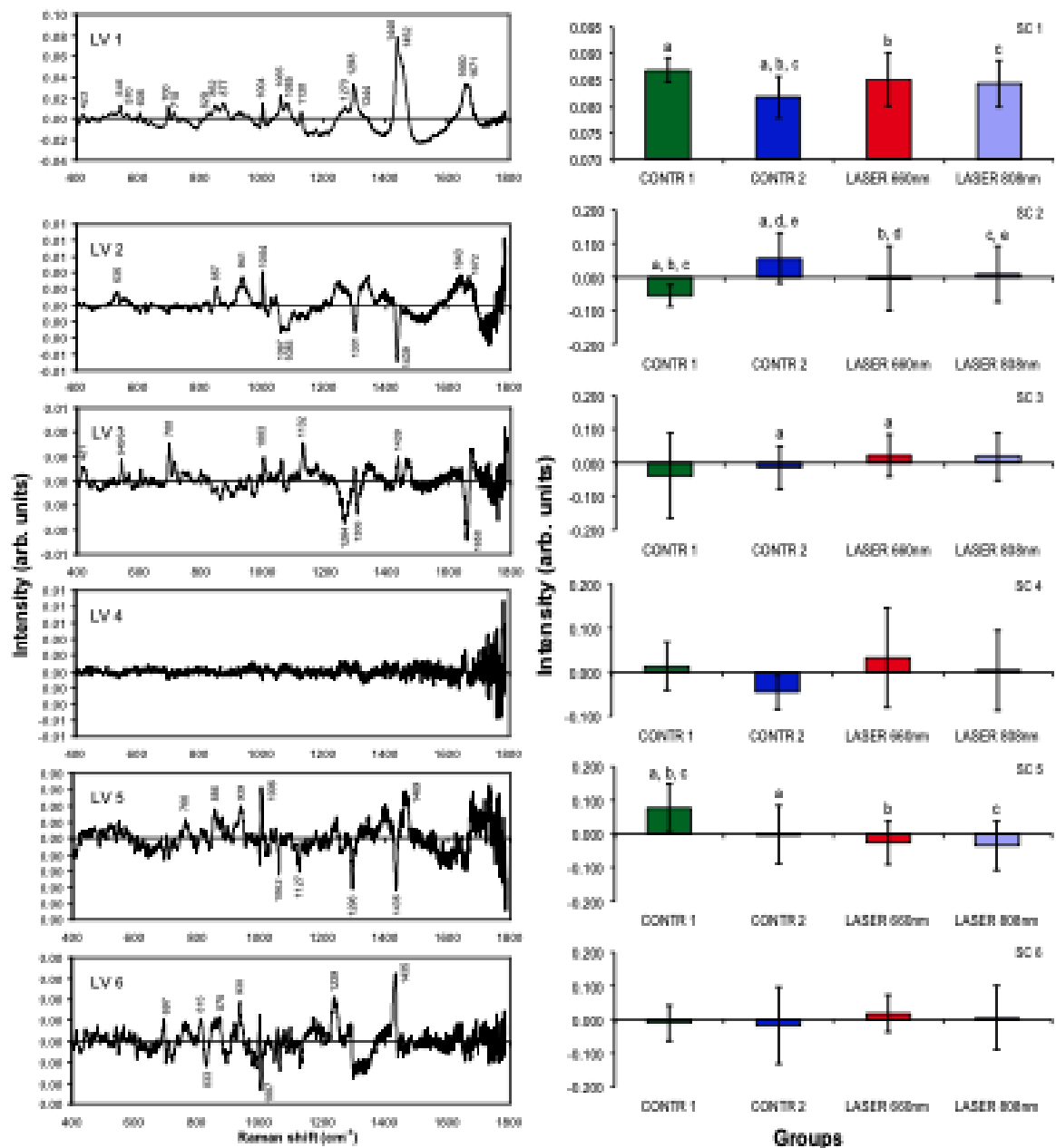


Fig. 4 Left: plot of the first six principal components leading vectors (LV 1 to LV 6) calculated from the Raman spectra. Right: plot of the first six principal component scores (SC 1 to SC 6) and the groups with significance ($p < 0.05$) between the scores of the groups (caption

letters). SC 4 was not statistically evaluated. The spectral features observed in the loading vectors relate to the features of biochemical components present in the sciatic nerve (myelin sheath) according to Table 1

differences between them. This shows that the CONTR 1 maintains the lipid constitution (the sphingo and mainly phospholipids) of the preserved myelin sheath, and the CONTR 2 presents proteins (mainly collagen I) characteristic of the

injured sciatic nerve. The irradiated groups with “zero” SC 2 suggest that they did not recover the lipids of the myelin sheath nerve as the CONTR 1 group recovered. The LV 3 showed positive peaks referred mainly to cholesterol at 421,

545, 700, and 1439 cm^{-1} , and remnant peaks of proteins at 1003 cm^{-1} and sphingolipids at 1132 cm^{-1} . Negative peaks referred to remnant features of phospholipids are at 1264, 1306, and 1658 cm^{-1} . The SC 3 showed significant differences between the groups (Kruskal Wallis, $p < 0.01$), being the differences occurring for the CONTR 2 and LASER 660 nm (Dunn, $p < 0.05$). In fact, the LASER 660 nm group presented higher SC 3 than all the other groups, and the positive features of the LV 3, related mainly to cholesterol, suggest that the irradiation increased the nervous tissue repair.

The spectral features of the LV 4 are neglectable for the analysis by the lack of peaks referred to lipids and proteins; therefore, the SC 4 has not been statistically evaluated. The LV 5 showed positive peaks at 856, 939, 1006, and 1469 cm^{-1} , attributed to proteins, the peak at 766 cm^{-1} can be assigned to remnant peak from phospholipid, and negative peaks at 1062, 1127, 1296, and 1435 cm^{-1} , attributed to sphingolipids. The SC 5 presented statistical significance between the groups (ANOVA, $p < 0.0001$), and the group CONTR 1 presented significantly higher intensity than the other groups (Tukey, $p < 0.001$), suggesting that the amount of proteins is higher in the non-injured sciatic nerves compared to the injured nerve (maintenance of the protein level expected for the intact nerve compared to the injured groups), and the amounts of lipids are higher for the sciatic nerves irradiated by both light sources. The LV 6 presents general features of proteins and lipids, but the SC 6 showed no significant differences between the groups (ANOVA, $p = 0.269$), indicating no relevant spectral information to describe the biochemical differences between the groups.

In this study, Raman spectroscopy has been used to assay changes in the biochemical composition of sciatic nerve induced by LLLT compared to control. The results showed differences in the peaks referred to lipids (sphingo and phospholipids) and proteins, indicating that these compounds increased with the use of light therapy at 660 and 808 nm, and 4 J/cm^2 compared to the injured control (CONTR 2), thus recovering the myelin sheath of the sciatic nerve to the status of the non-injured sciatic nerve (CONTR 1) (LV 1 and SC 1) after 21 days of treatment. The injured and non-irradiated sciatic nerve presented high proteins as a consequence of the nerve's injury, and the groups that received laser light presented lipid reconstitution (LV 2 and SC 2), suggestive of Schwann cells' proliferative activity induced by both lasers, but significantly higher for the LASER 660 nm due to the presence of high cholesterol content (LV 3 and SC 3). The differences in the protein content in the sciatic nerves can be attributed to collagen, present in the intact sciatic nerve (LV 2 and LV 5, SC 2 and SC 5 respectively) and lower for the injured nerves. Sphingolipids (mainly sphingomyelin), which are the most significant lipids in the nerve's myelin sheath, are

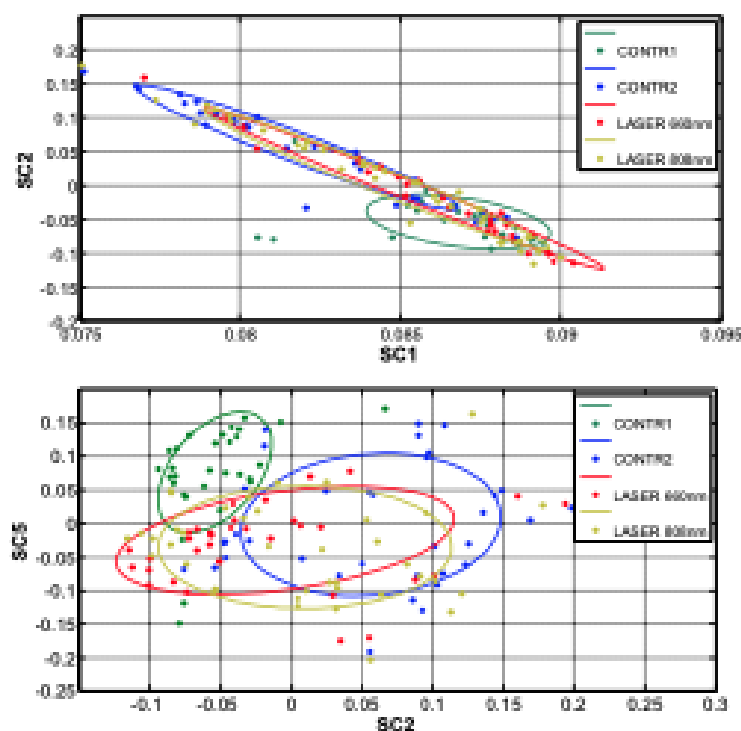
remarkably higher in both laser-treated groups compared to the injured and non-treated sciatic nerve group.

Figure 5 shows the binary plots of the SC 1 versus SC 2 and SC 2 versus SC 5 for all the experimental groups, as well as the plot of the ellipses with the 90% confidence interval error for each group. PCA was effective in confirming the molecules present in the sciatic nerve (Fig. 4), where the LV 1 presents the general spectral features of lipids and proteins, LV 2 presenting the spectral features of lipids forms the myelin sheath from intact sciatic nerve and proteins from injured and non-treated nerves, and LV 5 presents spectral features of proteins from intact nerve and lipids from the treated injured nerves. The binary plot of these scores showed a lower scattering of the SCs for both binary plots (SC 1 X SC 2 and SC 2 X SC 5) for the LASER 660 nm and LASER 808 nm, and the ellipses were going towards the CONTR 1 group, principally the ellipse of the LASER 660 nm group. This reveals that both lasers presented effective action in regenerating the myelin sheath in sciatic nerves (more pronounced for the LASER 660 nm), being the constitution closer to the intact nerve in this irradiated group than the injured and untreated CONTR 2. In contrast, the injured CONTR 2 group presented a high dispersion and is dislocated from both laser-irradiated groups.

The LASER 660 nm (red), and in lesser degree the LASER 808 nm (infrared), was efficient in cell proliferation and repair of injured nerve tissue. Both infrared and red lasers have been described as an effective treatment after peripheral nerve injury evaluated by functional and morphometric analyses [21, 22]. When comparing the two wavelengths in LLLT, red laser showed to be more effective than infrared laser to promote early nerve recovery [43], confirming the findings through Raman spectroscopy and PCA analyses. The present study is consistent with the literature, as it provides evidence on the importance of LLLT to improve nerve regeneration through photobiomodulation processes [44]. In this study, LLLT increased the production of lipids (sphingo and phospholipids), glycoproteins, and collagen present in the myelin sheath of sciatic nerve, which is related to tissue repair by stimulating the action and increasing the number of the Schwann cells. In fact, LLLT has shown that the Schwann cell's stimulus contributes to reduce the number of pro-inflammatory cytokines and repairs the neurofilaments and recovers the axonal diameter [19]. Schwann cells take an important role during the nerve regeneration by controlling the influx of the inflammatory cells, cleaning the environment of debris through autophagic process and supporting axonal regrowth [45]. Therefore, Raman spectroscopy is an efficient tool to detect the production of the biochemicals responsible for the sciatic nerve repair (sphingomyelin and collagen) and to measure the efficacy of therapies.

Raman spectroscopy has been described as a relevant technique for the biochemical analysis of biological materials of clinical interest [13–17, 26, 28]. In this research, Raman

Fig. 5 Binary plot of the principal component scores SC 1 versus SC 2 (top) and SC 2 versus SC 5 (bottom) for each experimental group (CONTR 1, CONTR 2, LASER 660 nm, and LASER 808 nm). The ellipses delineate the 90% confidence interval error for each group



spectroscopy was effective in the identification and assay of the relative amount of the biochemical components present in the sciatic nerve. The peaks found are directly associated with the chemical composition of the myelin sheath and the Schwann cells (sphingo and phospholipids), both related to the tissue repair of the injured nerve, deposition of glycoproteins (laminin, fibronectin, tenascin, and collagen), and increase of the extracellular matrix in the nerve repair tissue [8, 30].

Conclusion

Raman spectroscopy has been employed to identify the peaks of the major biochemical components of myelinated peripheral nerves (lipids and glycoproteins), and the corresponding biochemical compounds present in the sciatic nerve after crush injury, mainly sphingolipids and phospholipids (attributed to the myelin sheath of the nerve) and collagen (attributed to the epineurium—the external layer of the connective tissue which involves the sciatic nerve). The multivariate analysis by PCA revealed specific differences between the groups, where the spectral characteristics presented in the first six loadings showed Raman bands of the main biochemical constituents of the sciatic nerve. The CONTR 1 group showed Raman spectra characteristic of the biochemical component of the intact

nerve, predominance of lipids (sphingo and phospho) and proteins. The loadings LV1, LV2, and LV5, particularly these last two, showed the predominant Raman spectra of sphingo and phospholipids and proteins, mainly in the LASER 660 nm group, and the binary plot between the scores SC1, SC2, and SC5, the ones that presented higher significance between controls and LLLT ($p < 0.05$), showed lower dispersion for the LASER 660 nm group, indicating repair of the sciatic nerve with increased Schwann cells and reconstitution of the myelin sheath after 21 days of LLLT.

Funding information The authors thank FAPEMA (Foundation for Research Support and Scientific and Technological Development of the Maranhão) for the research grant support (Universal Process no. 01377/16), FAPESP (São Paulo Research Foundation) for the partial financial support (Grant no. 2009/01788-5), and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) for the productivity fellowship (Process no. 306344/2017-3). The authors also thank LACEMA (Academic League of Experimental Surgery of Maranhão).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that there is no conflict of interest.

Ethical approval It is approved by Commission of Ethics in the Use of Animals (CEUA) from Federal University of Maranhão (protocol no. 23115.005396/2016-65).

References

- Hoffman PN (2010) A conditioning lesion induces changes in gene expression and axonal transport that enhance regeneration by increasing the intrinsic growth state of axons. *Exp Neurol* 223(1):11–18. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.09.006>
- Seddon HJ (1947) The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. *Br J Surg* 33(138):151–167. <https://doi.org/10.1002/bjs.10003513808>
- Sunderland S (1951) The function of nerve fibers whose structure has been disorganized. *Anat Rec* 109(3):503–513. <https://doi.org/10.1002/ar.1091090307>
- Caramitro E, Mondelli M, Logallo F, Grimaldi S, Barisoni B, Sardi A, Scarinzi C, Migliareti G, Paoconi G, Cocito D (2010) Traumatic peripheral nerve injuries: epidemiological findings, neuropathic pain and quality of life in 158 patients. *J Peripher Nerv Syst* 15(2):120–127. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2010.00260.x>
- Wu SG, Huang SJ, Zhou J, Sun JY, Guo H, Li FY et al (2014) Dosimetric analysis of the brachial plexus among patients with breast cancer treated with post-mastectomy radiotherapy to the ipsilateral supraclavicular area: report of 3 cases of radiation-induced brachial plexus neuropathy. *Radiat Oncol* 9(1):1–7. <https://doi.org/10.1186/s13014-014-0292-5>
- Brull R, Hadziio A, Reina MA, Barrington MJ (2015) Pathophysiology and etiology of nerve injury following peripheral nerve blockade. *Reg Anesth Pain Med* 40(5):479–490. <https://doi.org/10.1097/AAP.0000000000000125>
- Pereira S, Fontes F, Sorini T, Dias T, Fragoso M, Castro-Lopes JM, Lunet N (2016) Chemotherapy-induced peripheral neuropathy after neoadjuvant or adjuvant treatment of breast cancer: a prospective cohort study. *Support Care Cancer* 24(4):1571–1581. <https://doi.org/10.1007/s00520-015-2935-y>
- Madi CM, Heilshorn SC (2015) Matrix interactions modulate neurotrophin-mediated neurite outgrowth and pathfinding. *Neural Regen Res* 10(4):514–517. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.155426>
- Elbaz AA, Abu-Almaaty AH, Hassan MK, Mohammed EA, Aziz MM (2017) Therapeutic role of Schwann cells and regenerated or melatonin combination in peripheral nerve injured rat models. *J Exp Appl Anim Sci* 3(2):190–210. <https://doi.org/10.20454/jeas.2017.1285>
- Tessngui G, Hart A, Wilson M (2011) The nerve injury and the dying neurons: diagnosis and prevention. *J Hand Surg Eur Vol* 36(9):730–734. <https://doi.org/10.1177/1753195411422202>
- Campbell WW (2008) Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol* 119(9):1951–1965. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2008.05.018>
- Geuna S (2015) The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *J Neurosci Methods* 30(243):39–46. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.01.021>
- Morisaki S, Ota C, Matsuda K, Kaku N, Fujiwara H, Oda R et al (2013) Application of Raman spectroscopy for visualizing biochemical changes during peripheral nerve injury in vitro and in vivo. *J Biomed Opt* 18(11):116011–116018. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.11.116011>
- Harlow EB, Manoharan R, Koo TW, Shafer KE, Metz JT, Fitzmaurice M et al (2009) Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Phys Med Biol* 45(2):R1–R59. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/45/2/004>
- Mozan Júnior MJ, Maia Filho AL, Penson DR, Alves MD, Justino Jde S, Andrade Mde S et al (2015) Assessing the biochemical changes of tendons of rats in an experimental model of tenotomy under therapeutic ultrasound and LEDs (625 and 945 nm) by near-infrared Raman spectroscopy. *Lasers Med Sci* 30(6):1729–1738. <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1779-5>
- Mangarita NM, Xavier M, de Souza RA, Salgado MAC, Silveira L Jr, Villaverde AB (2015) Effect of low-level laser therapy in an experimental model of osteoarthritis in rats evaluated through Raman spectroscopy. *J Photomed Laser Surg* 33(3):145–153. <https://doi.org/10.1089/pho.2014.3744>
- de Souza RA, Xavier M, Mangarita NM, Santos AF, Pinheiro AL, Villaverde AB, Lir S (2014) Raman spectroscopy detection of molecular changes associated with two experimental models of osteoarthritis in rats. *Lasers Med Sci* 29(2):797–804. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1423-1>
- de Oliveira RF, de Andrade Salgado DM, Trevelin LT, Lopes RM, da Cunha SR, Amaha AC et al (2013) Benefits of laser phototherapy on nerve repair. *Lasers Med Sci* 30(4):1395–1406. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1531-6>
- Andreo L, Soldani CB, Ribeiro BG, de Matos PRV, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA (2017) Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury. *Lasers Med Sci* 32(9):2155–2165. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2359-7>
- Andreas RAC, Maia LP, de Souza Lino AD, Fernandes KSP, de Matos Gomes MV et al (2017) LLLT activates MMP-2 and increases muscle mechanical resistance after nerve sciatic rat regeneration. *Lasers Med Sci* 32(4):771–778. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2169-y>
- Takhrifooladi MA, Jahanshahi F, Takhrifooladi HA, Yousefi K, Allahverdi A (2015) Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm²) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci* 30(3):1047–1052. <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1709-6>
- Ziogo EKM, Fazan VPS, Iyemasa MM, Sousa LG, Yamashita PY, de Silva EA et al (2017) Analysis of the variation in low-level laser energy density on the crushed sciatic nerves of rats: a morphological, quantitative, and morphometric study. *Lasers Med Sci* 32(2):369–378. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2126-1>
- Seabra JD, Pompeu E, Valenti MLG. Anestesia e analgesia de animais utilizados em protocolos experimentais. *Central Vivarium of the University of São Paulo Medical School* http://www.biometria.fi.usp.br/pdf/Anestesia_e_Analgesia.pdf. Accessed 08 Mar 2018
- Hansbarker HO, Kolbal G (1993) Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiol Rev* 73(3):639–671. <https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.3.639>
- Bispo JA, Vieira EES, Silveira L, Fernandes AB (2013) Correlating the amount of urea, creatinine, and glucose in urine from patients with diabetes mellitus and hypertension with the risk of developing renal lesions by means of Raman spectroscopy and principal component analysis. *J Biomed Opt* 18(8):87004–870011. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.8.087004>
- Silveira L, Silveira FL, Bodanese B, Zângaro RA, Pacheco MT (2012) Discriminating model for diagnosis of basal cell carcinoma and melanoma in vitro based on the Raman spectra of selected biochemicals. *J Biomed Opt* 17(7):077003–077015. Erratum in: *J Biomed Opt* 18(5):059801. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.7.077003>
- Silveira L Jr, Borges RCF, Navarro RS, Giana HE, Zângaro RA, Pacheco MTT, Fernandes AB (2017) Quantifying glucose and lipid components in human serum by Raman spectroscopy and multivariate statistics. *Lasers Med Sci* 32(4):787–795. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2173-2>
- Mirasaghi Z, Rehman S, Rehman IU (2007) Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc* 42(5):493–541. <https://doi.org/10.1080/0057049020701551530>
- Saher G, Stumpf SK (2015) Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. *Biochim Biophys Acta* 1851(8):1083–1094. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.02.010>

30. Minamikawa T, Harada Y, Takamatsu T (2015) *In vivo* peripheral nerve detection of rats by spontaneous Raman spectroscopy. *Sci Rep* 5:17165–17176. <https://doi.org/10.1038/srep17165>
31. Krafft C, Neudert L, Simat T, Salzer R (2005) Near infrared Raman spectra of human brain lipids. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 61(7):1529–1535. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.11.017>
32. Shetty G, Kendall C, Shepherd N, Stone N, Barr H (2006) Raman spectroscopy: evaluation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. *Br J Cancer* 94(10):1469–1484. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603102>
33. Stone N, Kendall C, Smith J, Crow P, Barr H (2004) Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Paraday Discuss* 128:141–157. <https://doi.org/10.1039/B304992B>
34. Cheng WT, Liu MT, Liu HN, Lin SY (2005) Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatricoma. *Microsc Res Tech* 68(2):75–84. <https://doi.org/10.1002/jemt.20229>
35. Nottingham I, Green C, Dyer C (2004) Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity *in vitro* using Raman spectroscopy. *J R Soc Interface* 1(1):79–90. <https://doi.org/10.1098/rsif.2004.0098>
36. Kasteinen E, Elomaa M, Luukkainen UM, Sippola E, Niemela P, Salonen J, Järninen K (2007) Quantification of the amphetamine content in seized street samples by Raman spectroscopy. *J Forensic Sci* 52(1):88–92. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00396.x>
37. Baron W, Hoekstra D (2010) On the biogenesis of myelin membranes: sorting, trafficking and cell polarity. *FEBS Lett* 584(9):1780–1770. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.085>
38. Schmitt S, Castelvetri LC, Simons M (2015) Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochim Biophys Acta* 1851(8):999–1005. <https://doi.org/10.1016/j.bbalt.2014.12.016>
39. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH Jr, Murphy RC et al (2005) A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 46(5):839–861. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
40. Zöllner I, Metzner M, Hartmann D, Büsow H, Meyer R, Gieselmann V, Eckhardt M (2008) Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration. *J Neurosci* 28(39):9741–9754. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6458-08.2008>
41. Lahiri S, Futerman AH (2007) The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci* 64(17):2270–2284. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7076-0>
42. Aguiar RP, Silveira L Jr, Falcão ET, Pacheco MT, Zingaro RA, Pasqualucci CA (2013) Discriminating neoplastic and normal brain tissues *in vitro* through Raman spectroscopy: a principal components analysis classification model. *Photomed Laser Surg* 31(12):595–604. <https://doi.org/10.1089/pho.2012.3460>
43. Barbosa RI, Marcolino AM, de Jesus GRB, Barbieri CH, de Clasia RFM (2010) Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci* 25(3):423–430. <https://doi.org/10.1007/s10103-009-0750-8>
44. de Andrade ALM, Bossini PS, de Souza ALMC, Sanchez AD, Parizotto NA (2017) Effect of photobiomodulation therapy (808 nm) in the control of neuropathic pain in mice. *Lasers Med Sci* 32(4):865–872. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2186-x>
45. Catlin AL, Lloyd AC (2016) The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 39:38–46. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.04.005>