

LEANDRO HENRIQUE GRECCO

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO ULTRASSOM E LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA
NOCICEPÇÃO E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO
NERVOSA PERIFÉRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

LEANDRO HENRIQUE GRECCO

Efeitos da associação do ultrassom e Laser de baixa potência na nocicepção e recuperação funcional de ratos submetidos à lesão nervosa periférica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Yara Cury

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Grecco, Leandro Henrique.

Efeitos da associação do Ultrassom e Laser de baixa potência na nocicepção e recuperação funcional de ratos submetidos à lesão nervosa periférica / Leandro Henrique Grecco. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Yara Cury.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Dor e Sinalização.

Versão do título para o inglês: Effects of the combination os Ultrasound an low-power Laser therapy in nociception and functional recovery of rats with peripheral nerve injury.

1. Lesão nervosa periférica 2. Nocicepção 3. Disfunção Motora
4. Antinocicepção 5. Ultrassom terapêutico 6. Laser terapêutico
I. Cury, Profa. Dra. Yara II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
III. Título.

ICB/SBIB0116/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leandro Henrique Grecco.

Título da Dissertação: Efeitos da associação do Ultrassom e Laser de baixa potência na nocicepção e recuperação funcional de ratos submetidos à lesão nervosa periférica.

Orientador(a): Profa. Dra. Yara Cury.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **047** nas fls. **102** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Yara Cury**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Efeitos da associação do ultra-som e Laser intensidade na dor e regeneração tecidual em ratos submetidos à lesão nervosa*" do qual participam o(s) alunos **Leandro Henrique Grecco** e o pesquisador **Rodrigo Alvarez Brandão Lopes Martins**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **19.04.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 20 de abril de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

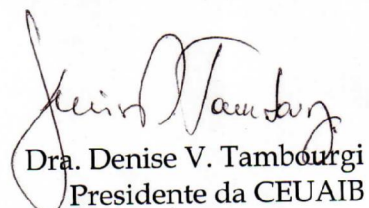
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da associação do ultra-som e LASER de baixa intensidade na dor e regeneração tecidual em ratos submetidos à lesão nervosa" **protocolo n° 820/11**, sob a responsabilidade de Yara Cury e Leandro Henrique Grecco, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 18/04/2011.

We certify that the research entitled "Effects of the association of ultrasound and low-intensity laser in nociception and tissue regeneration in rats with nerve injury", **protocol n° 820/11**, under the responsibility of Yara Cury and Leandro Henrique Grecco, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 04/18/2011.

Vigência do Projeto: 04/2011 – 04/2013 Laboratório Especial de Dor e Sinalização	N° de animais/espécie 195 ratos Wistar Machos
--	---

São Paulo, 20 de abril de 2011.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

A Deus, em primeiro lugar, pois sem Ele está jornada não seria cumprida.

A minha amada esposa Luanda, pelo apoio incondicional, companheirismo e suporte emocional, além dos sacrifícios e concessões, não medindo esforços para que eu chegasse até essa etapa de minha vida.

Ao meu amado filho Lucca, pela alegria e diversão que me inspira cada dia.

Aos meus pais Luiz e Tereza, exemplo de força, perseverança e dedicação que me ensinaram a viver com dignidade e respeito.

A minha irmã Aline, fonte inspiradora de rara inteligência e capacidade. Um anjo da guarda que Deus colocou em minha vida

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Yara Cury, por ter aberto as portas de seu laboratório, me acolhendo, me encorajando e me ajudado com as suas concisas pontuações. Obrigado pela confiança depositada.

À querida amiga Vanessa Gutierrez, pelas conversas, conselhos, caronas e ensinamento. Obrigado por fazer parte desse trabalho.

À Professora Gisele Picolo, por sua paciência e colocações preciosas que me auxiliaram em muito no andamento deste trabalho.

Aos amigos de laboratório que me apoiaram, me ensinaram, me corrigiram, me aturaram (“Do jeito que você me olha...vai da namoro...” entre outras) e que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho. Não sou de muitas palavras, mas saibam que estão no meu coração.

Aos meus familiares que embora saudosos, souberam entender a importância deste trabalho que por tantas vezes justificou a minha ausência. Aos meus avós, Amélia e Nelson, Rosa e Mário (creio que de alguma forma continuam orientando-me de algum lugar), aos tios, primos, sobrinhos, aos meus sogro e sogra (s) e cunhados, que sem o apoio nada disso seria possível.

À Dona Odília, que em um momento muito difícil porém muito feliz da minha vida, acolheu-me em sua residência.

Aos grandes amigos do Laboratório de Anatomia e Fisioterapia, com vocês compartilhei angustias, alegrias, felicidades e tantas outras coisas. Companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

Aos funcionários do LEDS, obrigado pela amizade, pela paciência, pelo seu respeito ao nosso aprendizado e pela sua colaboração. A cada um de vocês, minha gratidão.

Aos demais professores, pesquisadores e alunos do Instituto Butantan e do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, os quais sempre que precisei mostraram-se bastante dispostos. Em especial ao Professor Rodrigo pela colaboração do projeto.

Ao Prof. Dr. Julio Cezar Adamowski, e Prof. Marco Aurélio Brizzotti Andrade do Laboratório de Ultrassom, Departamento de Mecatrônica, POLI/USP pela colaboração no projeto inicial e aferição do equipamento de Ultrassom

Ao Prof. Dr. Ernesto Cesar Pinto Leal Junior, Biofotônica aplicada as Ciências da Saúde, UNINOVE, pela colaboração no projeto inicial e aferição do equipamento de Laser.

Ao Sr. Luiz pela confecção da pinça e ao técnico Edvaldo do Laboratório de Mecânica da UNINOVE, pela aferição da pinça.

As secretárias Mônica, Selma e Camila, sempre prestativas meu muito obrigado.

A CAPES pelo apoio financeiro, fundamental para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

RESUMO

GRECCO, L. H. **Efeitos da associação do Ultrassom e Laser de baixa potência na nocicepção e recuperação funcional de ratos submetidos à lesão nervosa periférica.** 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As lesões traumáticas dos nervos periféricos são frequentes, podem acarretar perda funcional e dor. A utilização, na clínica médica, do Ultrassom terapêutico e o Laser de baixa potência têm mostrado que estes recursos favorecem a recuperação funcional, além de induzir analgesia. Contudo, não existem ainda, estudos experimentais que mostrem a eficácia da aplicação conjunta destes recursos na recuperação da lesão nervosa. O objetivo do presente estudo foi avaliar, em ratos, o efeito da aplicação conjunta do ultrassom terapêutico e do Laser de baixa potência na nocicepção e recuperação funcional do nervo isquiático submetido à lesão por pinçamento. O pinçamento do nervo acarretou, por todo o período de observação (21 dias), hiperalgesia mecânica e térmica, alodinia mecânica, além de disfunção motora. As alterações funcionais foram acompanhadas por alterações histopatológicas (diminuição significativa do número de fibras mielínicas e irregularidade da sua distribuição). Para a melhor caracterização do modelo, foram realizados tratamentos farmacológicos. A administração de indometacina e morfina inibiu, parcial ou totalmente, respectivamente, os fenômenos nociceptivos, sem interferir com a recuperação da disfunção motora. A aplicação dos recursos físicos mostrou que Ultrassom (1.0 W/cm²) e o Laser (6 J) causaram antinocicepção, além de melhora parcial da recuperação funcional e das alterações histopatológicas. O efeito antinociceptivo do Laser é mediado pela ativação de receptores opióides. A aplicação conjunta do Ultrassom e Laser, além de antinocicepção, promoveu recuperação total das alterações histopatológicas. Em conclusão, a aplicação associada do Ultrassom e Laser é eficaz no controle da dor neuropática resultante do pinçamento do nervo isquiático, além acelerar o processo de regeneração nervosa, podendo favorecer o restabelecimento da função motora.

Palavras-chave: Lesão nervosa. Nocicepção. Disfunção Motora. Antinocicepção. Ultrassom. Laser terapêutico.

ABSTRACT

GRECCO, L.H. **Effects of the combination of Ultrasound and Low power laser therapy in nociception and functional recovery of rats with peripheral nerve injury.** 2013. 124 p. Masters thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Traumatic injuries of peripheral nerves are common and can lead to nerve function loss and pain. The clinical use of Therapeutic Ultrasound and Low Power Laser has evidenced that these resources foster nerve function recovery and induce analgesia. However, there are no experimental studies evaluating the effectiveness of the combined application of these resources in injury recovery. The aim of this study was to investigate, in rats, the effect of the combined application of these resources in nociception and functional recovery of injured sciatic nerve. In this study, the sciatic nerve was submitted to crush injury by a forceps (static load of 5000 g, applied for 5 min). Nerve crushing causes mechanical and thermal hyperalgesia, mechanical allodynia, and motor dysfunction that last for 21 days. Histopathological changes (significant decrease in myelinated fibers and uneven fiber pattern distribution) were also detected. To better characterize this injury model, pharmacological treatments were carried out. Administration of indomethacin and morphine partially inhibited or blocked, respectively, nociception without interfering with sciatic functional recovery. The application of Ultrasound (1.0 W/cm²) and Laser (6 J) caused antinociception and partial nerve function and histopathological changes recovery. The antinociceptive effect of Laser is mediated by activation of opioid receptors. The combined application of both physical resources, in addition to antinociception, resulted in a faster histopathological changes recovery. In conclusion, the combined application of Ultrasound and Laser is effective in controlling neuropathic pain resulting from sciatic nerve crush and in accelerating nerve regeneration.

Keywords: Peripheral nerve injury. Nociception. Motor dysfunction. Antinociception. Therapeutic ultrasound. Therapeutic laser.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de corte transversal mostrando os revestimentos dos nervos periféricos.	22
Figura 2 – Eventos do processo regenerativo do nervo periférico.	23
Figura 3 - Teste de pressão de pata.....	35
Figura 4 - Filamentos de Von Frey.....	37
Figura 5 - Teste plantar	38
Figura 6 - Vista geral da passarela.....	39
Figura 7 - Esquema da impressão em papel da pata.....	40
Figura 8 - Equipamento ultrassom terapêutico.....	41
Figura 9 - Equipamento Laser GaAsAl.....	42
Figura 10 - Esquema ampliado da contagem das fibras mielínicas.....	44
Figura 11 - Hiperalgia mecânica induzida pelo pinçamento do nervo isquiático de ratos. ...	49
Figura 12 - Alodinia mecânica induzida pelo pinçamento do nervo isquiático de ratos.	50
Figura 13 - Hiperalgia térmica induzida pelo pinçamento do nervo isquiático de ratos.	51
Figura 14 - Disfunção motora induzida pelo pinçamento do nervo isquiático de ratos.	52
Figura 15 - Efeito do tratamento com indometacina sobre a hiperalgia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.....	54
Figura 16 - Efeito do tratamento com indometacina sobre a alodinia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.....	56
Figura 17 - Efeito do tratamento com indometacina sobre a hiperalgia térmica induzida pelo pinçamento do nervo isquiático de ratos.....	58
Figura 18 - Efeito do tratamento com indometacina sobre a alteração do índice funcional de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático.	60
Figura 19 - Efeito do tratamento com morfina sobre a hiperalgia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.....	62
Figura 20 - Efeito do tratamento com sulfato de morfina sobre a alodinia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.....	64
Figura 21 - Efeito do tratamento com sulfato de morfina sobre a hiperalgia térmica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.....	66
Figura 22 - Efeito do tratamento com sulfato de morfina sobre a alteração do índice funcional de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático.....	68
Figura 23 - Fotomicrografia do nervo isquiático.....	69
Figura 24 - Representação gráfica da contagem de fibras mielínicas dos grupos Naive, Sham e Lesado.	70
Figura 25 - Representação gráfica da contagem de fibras mielínicas dos grupos tratados com indometacina e morfina.	71
Figura 26 - Efeito do ultrassom terapêutico sobre a hiperalgia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.....	73
Figura 27 - Efeito do ultrassom terapêutico sobre a alodinia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.....	74
Figura 28 - Efeito do tratamento com ultrassom terapêutico sobre a hiperalgia térmica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.	75
Figura 29 - Efeito do tratamento com UST sobre o índice funcional de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático.....	76
Figura 30 - Fotomicrografia do nervo isquiático de animais tratados com UST e simulado... ..	78
Figura 31 - Representação gráfica do efeito do tratamento com UST sobre o número de fibras mielínicas.....	79

Figura 32 - Efeito do Laser de baixa potência sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.....	81
Figura 33 - Efeito do Laser de baixa potência sobre a alodinia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.....	82
Figura 34 - Efeito do tratamento com laser de baixa potência sobre a hiperalgesia térmica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.....	83
Figura 35 - Efeito do laser de baixa potência sobre a alteração do índice funcional de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático.....	84
Figura 36 - Efeito do tratamento com LBP sobre as alterações histológicas causadas pelo pinçamento do nervo isquiático.....	86
Figura 37 - Representação gráfica do efeito do tratamento com LBP sobre o número de fibras mielínicas.....	87
Figura 38 - Efeito da associação do UST+LBP sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.....	89
Figura 39 - Efeito do tratamento associado UST+LBP sobre a alodinia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.....	90
Figura 40 - Efeito do tratamento associado UST+LBP sobre a hiperalgesia térmica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.....	91
Figura 41 - Efeito do Laser de baixa potência sobre a alteração do índice funcional de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático.....	92
Figura 42 - Envolvimento de opióides endógenos no efeito anti-hiperalgésico do UST e/ou LBP.....	94
Figura 43 - Envolvimento de receptores opióides no efeito anti-alodínico do UST e/ou LBP.....	95
Figura 44 - Envolvimento de receptores opióides no efeito anti-hiperalgésico do UST e/ou LBP.....	96
Figura 45 - Efeito da naloxona sobre a alteração do índice funcional de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático.....	97
Figura 46 - Fotomicrografia do nervo isquiático de animais tratados com UST+LBP.....	99
Figura 47 - Representação gráfica do efeito do tratamento com UST+LBP sobre o número de fibras mielínicas.....	100
Figura 48 – Efeito da naloxona sobre a contagem de fibras mielínicas dos grupos tratados com UST+LBP.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificações de lesões nervosas periféricas, propostas por Seddon (1943) e Sunderland (1951).....	25
Tabela 2 - Protocolo de irradiação do Laser de baixa potência.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs – Anti-inflamatórios Não Esteroidais

ATP – Adenosina Trifosfato

Ca²⁺ - Cálcio

CCI – Chronic Construction Injury (lesão por constrição crônica)

CGRP – Proteína Relacionada ao Gene da Calcitonina

ERA – Área de Radiação Efetiva

GaAlAs – Arsenato de Gálio Alumínio

He-Ne – Hélio Neônio

IASP- International Association for the Study of Pain (Associação Internacional para o Estudo da Dor)

IFC – Índice Funcional do Isquiático

J/cm² – Joule por centímetro quadrado

K⁺ - Potássio

Kgf – Quilograma força

kHz - Quilohertz

LBP – Laser de Baixa Potência

MHz - Milehertz

Na⁺ - Sódio

nm - Nanômetro

NO – Óxido Nítrico

NOS - Óxido Nítrico Síntase

pH – Potencial de Hidrogênio

UST – Ultrassom Terapêutico

W/cm² - Watts por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA	21
1.2 DOR NEUROPÁTICA	26
1.3 ULTRASSOM TERAPÊUTICO	28
1.4 LASER DE BAIXA POTÊNCIA	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 ANIMAIS	34
3.2 INDUÇÃO DA LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO	34
3.3 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOLOROSA	35
3.3.1 DETERMINAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA	35
3.3.2 DETERMINAÇÃO DA ALODINIA	36
3.3.3 DETERMINAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA.....	37
3.4 AVALIAÇÃO FUNCIONAL	38
3.5 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS	40
3.6 PROTOCOLOS DE TRATAMENTO	41
3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA	43
3.8 GRUPOS EXPERIMENTAIS	44
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4 RESULTADOS	48
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FENÔMENOS NOCICEPTIVOS E DA ALTERAÇÃO FUNCIONAL INDUZIDOS PELO PINÇAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS	48
4.1.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FENÔMENOS NOCICEPTIVOS.....	48
4.1.1.1 Hiperalgisia mecânica.....	48
4.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM INDOMETACINA SOBRE OS FENÔMENOS NOCICEPTIVOS E AS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS CAUSADAS PELO PINÇAMENTO DO NERVO	53
4.2.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FENÔMENOS NOCICEPTIVOS.....	53
4.2.1.1 Efeito sobre a hiperalgisia mecânica	53
4.2.1.2 Efeito sobre a alodinia mecânica.....	55
4.2.1.3 Efeito sobre a hiperalgisia térmica	57
4.2.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM INDOMETACINA SOBRE O ÍNDICE FUNCIONAL DO ISQUIÁTICO (IFC) DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO	59

4.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM MORFINA SOBRE OS FENÔMENOS NOCICEPTIVOS E AS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS ORIGINADAS PELO PINÇAMENTO DO NERVO.....	61
4.3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FENÔMENOS NOCICEPTIVOS.....	61
4.3.1.1 Efeito sobre a hiperalgesia mecânica	61
4.3.1.2 Efeito sobre a alodinia mecânica.....	63
4.3.1.3 Efeito sobre a hiperalgesia térmica	65
4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO NERVO ISQUIÁTICO SUBMETIDO AO PINÇAMENTO.....	68
4.5 DEFINIÇÕES DOS PARÂMETROS DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO	72
4.5.1 EFEITO DO UST NOS FENÔMENOS NOCICEPTIVOS INDUZIDOS PELA LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO	72
4.5.1.1 Efeito sobre a hiperalgesia mecânica	72
4.5.1.2 Efeito sobre a alodinia mecânica.....	74
4.5.1.3 Efeito sobre a hiperalgesia térmica	75
4.5.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM ULTRASSOM TERAPÊUTICO SOBRE O ÍNDICE FUNCIONAL DO ISQUIÁTICO (IFC) DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO.....	76
4.5.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM UST SOBRE AS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS CAUSADAS PELO PINÇAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO ANÁLISE HISTOLÓGICA DO NERVO ISQUIÁTICO APÓS TRATAMENTO COM UST.....	77
4.6 DEFINIÇÕES DOS PARÂMETROS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA.....	80
4.6.1 EFEITO DO <i>LASER</i> DE BAIXA POTÊNCIA NOS FENÔMENOS NOCICEPTIVOS INDUZIDOS PELA LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO	80
4.6.1.2 Efeito sobre a alodinia mecânica.....	82
4.6.1.3 Efeito sobre a hiperalgesia térmica	83
4.6.2 EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE AS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE FUNCIONAL DO ISQUIÁTICO (IFC).....	84
4.6.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM O LBP SOBRE AS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS INDUZIDAS PELO PINÇAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO.	85
FIGURA 36 - EFEITO DO TRATAMENTO COM LBP SOBRE AS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS CAUSADAS PELO PINÇAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO.	86
4.7 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO E LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE OS FENÔMENOS NOCICEPTIVOS E AS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS CAUSADAS PELO PINÇAMENTO DO NERVO	88
4.7.1 EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO UST E LBP NOS FENÔMENOS NOCICEPTIVOS INDUZIDOS PELA LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO	88

4.7.1.1 Efeito sobre a hiperalgesia mecânica	88
4.7.1.2 Efeito sobre a alodinia mecânica.....	90
4.7.1.3 Efeito sobre a hiperalgesia térmica	91
4.7.2 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO UST + LBP SOBRE AS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE FUNCIONAL DO ISQUIÁTICO (IFC).....	92
4.8 ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DE OPIÓIDES ENDÓGENOS NOS EFEITOS CAUSADOS PELO UST E/OU LBP	93
4.8.1 FENÔMENOS NOCICEPTIVOS	93
4.8.1.1 Hiperalgesia mecânica.....	93
4.8.1.2 Alodinia mecânica.....	95
4.8.1.3 Hiperalgesia térmica.....	96
4.8.2 ÍNDICE FUNCIONAL DO ISQUIÁTICO (IFC).....	97
4.9 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO UST+LPB SOBRE AS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO NERVO ISQUIÁTICO SUBMETIDO AO PINÇAMENTO.	98
5 DISCUSSÃO	102
6 CONCLUSÃO.....	114
REFERÊNCIAS.....	115

1 INTRODUÇÃO

As lesões traumáticas dos nervos periféricos são frequentes, demandam cuidados especializados e podem acarretar perda funcional de gravidade variável¹. Diversos fatores podem causar lesões dos nervos, sendo os mais comuns, os ferimentos penetrantes, esmagamento, tração, isquemia. Além desses fatores, as lesões podem ser produzidas por choque elétrico, radiação, percussão, vibração, ou ainda serem de origem térmica². Estudo realizado nos Estados Unidos mostrou que 50 mil pessoas sofrem, a cada ano, lesões traumáticas nos nervos periféricos³.

Após a lesão, uma série de eventos degenerativos é observada. Dentre estes eventos, está a fragmentação do axônio e da bainha de mielina. Logo após a fragmentação, tem início o processo de regeneração, cujo sucesso depende, em grande parte, da severidade da lesão⁴.

A lesão de nervos acarreta também, dor. A dor neuropática, secundária às lesões traumáticas do nervo periférico, é caracterizada por hipersensibilidade do sistema nervoso central e periférico e necessita de tratamento específico. Muitas vezes, esse tratamento é ineficaz e/ou está associado à presença de efeitos colaterais⁵.

A recuperação morfológica e funcional do nervo lesionado raramente é completa e perfeita. Inúmeros fatores influenciam a regeneração, tais como: a) natureza e intensidade da lesão, b) tempo de desnervação, c) tipo e diâmetro das fibras nervosas afetadas e d) idade do indivíduo⁶. Quanto maior a disfunção causada pela lesão, pior o prognóstico, uma vez que pode afetar a capacidade do indivíduo de realizar atividades da vida diária. Esse fato problemas econômicos, sociais, emocionais e muitas vezes, aposentadoria precoce⁷.

Vários estudos vêm sendo realizados objetivando a obtenção de tratamentos que possam favorecer a recuperação destas lesões. Contudo, em relação à abordagem farmacológica, não há ainda nenhum fármaco desenvolvido exclusivamente para o tratamento da regeneração nervosa e da dor neuropática. Muitos dos fármacos utilizados na clínica médica para o tratamento da dor neuropática, não pertencem à classe de fármacos analgésicos e incluem, por exemplo, os antidepressivos tricíclicos (amitriotilina)⁸, os anticonvulsivantes (gabapentina e carbamazepina)⁹ e os antiarrítmicos (lidocaína)¹⁰.

Dentre as principais técnicas não farmacológicas utilizadas para o tratamento de neuropatias, podemos destacar a estimulação elétrica de baixa frequência¹¹, exercícios ativos¹², estimulação elétrica funcional¹³, o ultrassom terapêutico^{14; 15; 16; 17; 18} e o Laser de baixa potência^{1; 19; 20; 21}.

Esses dois últimos recursos têm mostrado resultados positivos na recuperação funcional e no controle da dor na clínica médica. Contudo, não existem ainda, estudos experimentais que comprovem a eficácia da associação destes recursos na recuperação da lesão nervosa.

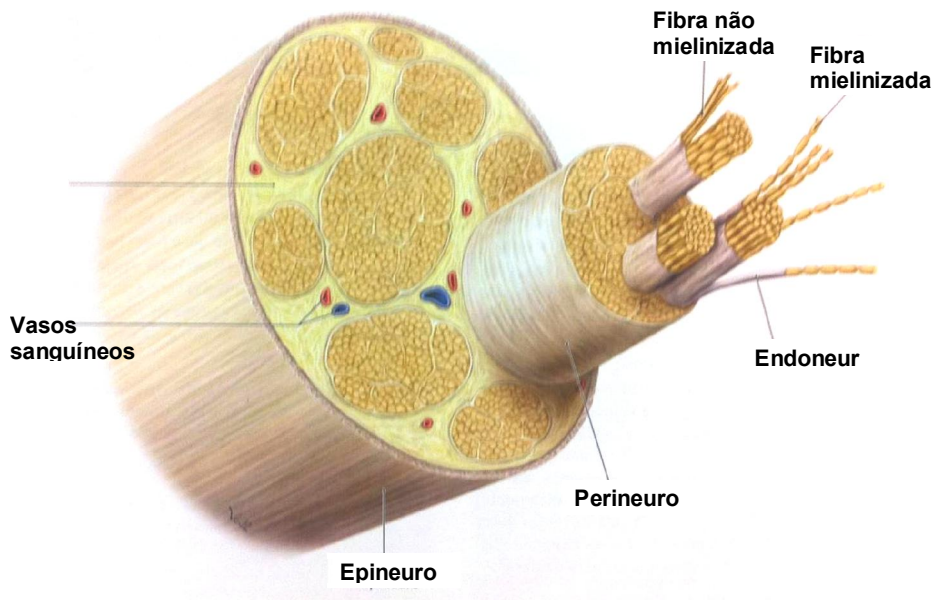
1.1 Lesão nervosa periférica

A unidade funcional do nervo periférico é o neurônio, constituído por um corpo celular, localizado na medula espinal ou no gânglio espinal e sua expansão, a fibra nervosa, formada pelo axônio e a bainha conjuntiva que o envolve. O corpo celular possui prolongamentos denominados dendritos, a substância de Nissl (retículo endoplasmático rugoso da célula, condensado), outras organelas e o núcleo com seu nucléolo^{22; 23}.

Existem neurônios envoltos por uma camada de mielina, produzida pelas células de Schwann, e neurônios não mielinizados. Nos neurônios mielinizados existem estreitamentos denominados nódulos de Ranvier, onde ocorrem as trocas iônicas na condução saltatória do estímulo nervoso²⁶.

O nervo periférico consiste num feixe ou feixes de fibras nervosas. A fibra nervosa apresenta-se envolta por uma bainha protetora ou envoltório de tecido conjuntivo, denominado endoneuro. Esta bainha é elástica e resistente, protegendo as fibras de traumas mecânicos. Várias fibras nervosas, de diferentes tamanhos, são agrupadas e esta união forma os fascículos nervosos. Cada fascículo está envolto por um tecido conjuntivo denso e forte, chamado perineuro, que o protege de traumas e compressões externas. O perineuro tem como funções, manter a pressão intrafascicular, auxiliar na manutenção do fluxo axoplasmático e proteger e formar uma barreira entre as fibras nervosas e outros tecidos. Na maioria das vezes, os fascículos se apresentam de forma relativamente organizada dentro do nervo periférico, envoltos por tecido conjuntivo denominado epineuro interno. Este tecido conjuntivo se espessa e forma o epineuro externo, que engloba todos estes fascículos. Tanto o perineuro como o epineuro externo são mais espessos nas articulações, protegendo os nervos periféricos durante os movimentos (Figura 1)^{23; 24}.

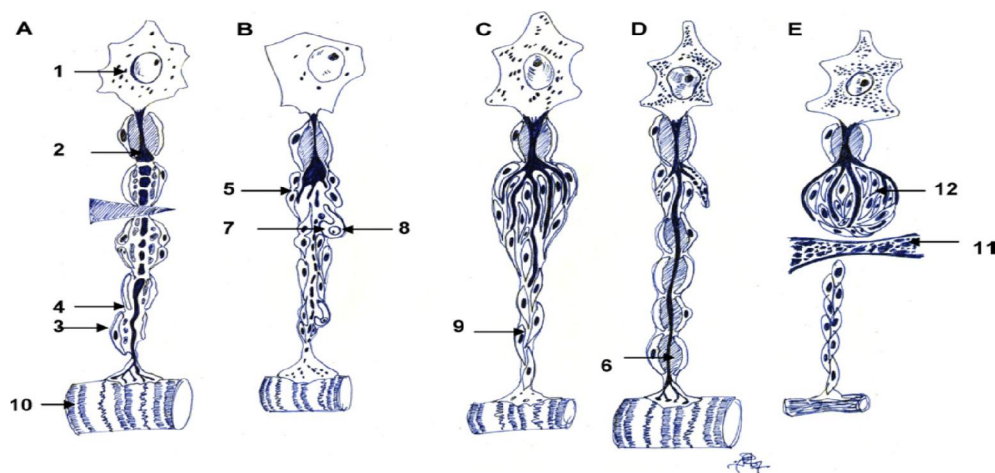
Figura 1 – Esquema de corte transversal mostrando os revestimentos dos nervos periféricos.



Fonte: Schunke (2007)²⁵

Após a lesão de um nervo periférico, vários eventos complexos são observados. Os eventos observados durante o processo regenerativo acontecem de maneira sincronizada e são caracterizados por fagocitose (por macrófagos) dos axônios em degeneração (degeneração Waleriana), proliferação das células de Schwann e síntese de fatores de crescimento no coto distal. Concomitantemente, uma ponte constituída de fibrina, conecta os cotos, que estão envolvidos por células não neurais, vasos sanguíneos e componentes da matriz extracelular. Subsequentemente ocorre o brotamento axonal do coto proximal em direção ao coto distal, seguido da mielinização dos axônios pelas células de Schwann²⁶. Dessa forma, a resposta regenerativa no sistema nervoso periférico, é um fenômeno complexo e dependente de uma série de eventos necessários para reajustar o microambiente do nervo lesado, no intuito de restabelecer a homeostasia²⁷ (Figura 2).

Figura 2 – Eventos do processo regenerativo do nervo periférico.



Degeneração Walleriana e regeneração nervosa: A) 24 horas após a lesão: degeneração walleriana distal do nervo periférico e início da cromatólise. B) 10 a 21 dias após o trauma: atrofia muscular, proliferação das células de Schwann para formação do cone de crescimento, crescimento do coto proximal e cromatólise. C) Vários meses após o trauma: brotamentos axonais em diferentes velocidades, porém ainda não atingindo o alvo, marcado por severa atrofia de desnervação muscular e regressão das reações de cromatólise. D) Reinervação do órgão-alvo: a junção neuromuscular se torna funcional e de condução restaurada. E) Formação do neuroma: a desnervação de fibras musculares por mais de um ano está sujeita a significativas fibroses intersticiais, não ocorrendo reinervação do órgão-alvo. 1. Corpo celular. 2. Axônio, broto do axônio. 3. Células de Schwann. 4. Membrana basal da célula de Schwann. 5. Mitose das células de Schwann. 6. Bainha de mielina. 7. Detritos de mielina. 8. Macrófagos. 9. Proliferação das células de Schwann. 10. Fibras musculares. 11. Cicatriz fibrosa. 12. Neuroma.

Fonte: Delmonte et al. (2009)²⁷

Dependendo da intensidade da lesão nervosa, pode ocorrer perda ou diminuição da sensibilidade e motricidade da área inervada. A magnitude dessas alterações depende do tipo de estrutura lesada e das dimensões do trauma²⁸.

A classificação das lesões dos nervos periféricos, proposta por Seddon (1943), é baseada no grau de ruptura das estruturas internas do nervo periférico, estando correlacionado com o prognóstico de recuperação. Estas lesões podem ser classificadas em²⁹:

- neuropraxia: é a forma mais branda de uma lesão nervosa. Neste tipo de lesão ocorre bloqueio localizado da condução dos estímulos nervosos; contudo, a condução está preservada nos segmentos proximal e distal à lesão. Nesse tipo de lesão, o axônio não perde sua continuidade, havendo recuperação rápida e completa do nervo em poucas semanas;

- axonotmese: é uma lesão mais grave, na qual os danos são suficientes para promover ruptura da continuidade axonal, provocando degeneração walleriana distal. O prognóstico de recuperação funcional é bom, desde que sejam mantidas a continuidade dos tecidos conectivos de suporte e a integridade das células e da membrana basal;

-neurotmese: é o tipo mais grave de lesão nervosa periférica. Esta lesão é caracterizada pela ruptura total do nervo periférico e o prognóstico de recuperação é pouco favorável e dependente do restabelecimento da continuidade do nervo.

Adicionalmente a esta classificação, Sunderland³⁰, em 1951, propôs outra classificação, diferenciada por números, mais detalhada e baseada na anatomia e funcionalidade pós-trauma:

I – corresponde a neuropraxia descrita por Seddon (1943)²⁹. Ocorre interrupção da condução nervosa no local da lesão, não havendo perda da continuidade entre o corpo celular e as terminações do axônio. Esta lesão é totalmente reversível, pois não ocorre degeneração walleriana;

II – o axônio é seccionado, ocorrendo desintegração da bainha de mielina e degeneração walleriana abaixo da lesão, mas o endoneuro e as estruturas de sustentação ficam preservados. Ocorre regeneração praticamente completa e a função é restaurada;

III – há envolvimento não apenas dos axônios, mas da estrutura interna dos fascículos, com perda da continuidade dos tubos neurais e degeneração walleriana. As lesões intra-fasciculares incluem hemorragia, edema, estase e isquemia vascular e a ocorrência de fibrose é um obstáculo à regeneração;

VI – há destruição do perineuro externo e interno e grande desarranjo da estrutura fascicular do nervo, cuja continuidade se mantém à custa de um tecido desorganizado. Os axônios em regeneração não encontram o tubo neural distal correspondente e invadem o tecido cicatricial intracelular, resultando em neuroma. O tratamento dessa lesão requer a excisão do segmento destruído e interposição de enxertos de nervo.

V – é a lesão por secção completa do nervo, envolvendo não apenas as estruturas endoneurais, mas também o epineuro. Ocorre formação de neuroma no coto proximal e degeneração walleriana no coto distal. A regeneração requer regularização dos cotos e interposição de enxertos de nervo.

A Tabela 1 compara as duas classificações. Quanto maior o grau de lesão, menor é a probabilidade de regeneração total, além de outras variáveis como ocorrência de fibrose ou até de lesão vascular, o que pode afetar a regeneração.

Tabela 1 - Classificações de lesões nervosas periféricas, propostas por Seddon (1943) e Sunderland (1951).

Seddon	Sunderland	Processo
Neuropraxia	Grau I	Desmielinização segmentar
Axonotmese	Grau II	Axônio lesado, mas o endoneuro está intacto (condições ideais para regeneração)
Axonotmese	Grau III	Descontinuidade do axônio e tubo endoneurial, perineuro e arranjo fascicular preservado
Axonotmese	Grau IV	Perda da continuidade do axônio, dos tubos: endoneuro, perineuro e fascículos; epineuro intacto (neuroma em continuidade).
Neurotmese	Grau V	Perda de toda continuidade do nervo

Os fenômenos envolvidos na regeneração podem ser estudados por meio da utilização de modelos experimentais de lesão nervosa. Dentre estes modelos, o da lesão por pinçamento tem a vantagem de não envolver as variáveis detectadas na lesão por secção seguida de sutura¹⁸. A lesão por pinçamento do nervo danifica ou mata os axônios distais ao local da lesão, mas os corpos das células neurais normalmente sobrevivem e os revestimentos do tecido conjuntivo do nervo permanecem intactos. Neste tipo de lesão, não há a necessidade de reparo cirúrgico, pois as bainhas de tecidos conjuntivos intactos guiam os axônios em crescimento, até seus destinos³¹. Esse modelo tem sido empregado para avaliar a lesão em si, como para o estudo de dor neuropática, da regeneração e recuperação funcional, espontânea ou induzida^{1; 15; 17; 18; 19; 20; 21; 31; 32; 33; 34}.

1.2 Dor neuropática

A dor neuropática é definida atualmente, segundo a Associação Internacional para estudo da Dor (*IASP*), como a dor iniciada ou causada por uma lesão ou disfunção primária do sistema nervoso, podendo decorrer de lesão do nervo periférico (amputações, desaferentações), infecções (neuralgia pós-herpética), compressão do nervo (acidentes, cirurgias, tumores), infarto, distúrbios metabólicos (neuralgia diabética) ou ser idiopática³⁵. Em geral, a dor neuropática é classificada de acordo com sua causa intrínseca (tal como neuralgia pós-herpética) ou pela localização da lesão nervosa - central ou periférica³⁶.

Apesar dos diversos estudos clínicos e experimentais, os mecanismos envolvidos na gênese da dor neuropática não estão ainda totalmente caracterizados. A dor neuropática persiste mesmo após a retirada do estímulo lesivo. Isto decorre de alterações nos neurônios e nas fibras que conduzem a informação nociceptiva³⁷.

A lesão do nervo periférico acarreta alterações neuroquímicas e neuroanatômicas nos neurônios, bem como em seus territórios de projeção central. Observa-se a presença de focos ectópicos nas fibras nervosas periféricas lesadas, os quais mantêm os impulsos nervosos aferentes para o sistema nervoso central³⁷. A entrada desses impulsos ectópicos na medula espinal sensibiliza os neurônios da coluna dorsal da medula, que pode ser independente (*wind up* e potenciação de longa duração -LTP) ou dependente da transcrição gênica (fase tardia do LTP)³⁸. Essa atividade elétrica alterada ocorre não apenas nas fibras que conduzem a informação nociceptiva (fibras A δ e C), mas também nas fibras do tipo A β , que em situações fisiológicas normais conduzem informações referente à estimulação tátil. Essas modificações ocorrem predominantes nas lâminas I, II e V do corno dorsal da medula espinal. Isso pode se manter por um longo período ou indefinidamente, justificando o caráter crônico da dor³⁹. Essas lesões podem alterar ainda a plasticidade neuronal em estruturas supra-espinais, como no tálamo e córtex cerebral, por meio de mecanismos que envolvam os receptores para o glutamato.

Após a lesão do tecido nervoso, ocorre liberação de neurotransmissores, como substância P, somatostatina, peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina, neurocinina-A, glutamato e aspartato. Essas substâncias estão relacionadas com a ativação de potenciais pós-sinápticos excitatórios. Estímulos frequentes dos neurônios aferentes geram a somação dos potenciais de ação e conseqüente despolarização pós-sináptica cumulativa. Depois da ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) pelo glutamato, há remoção do íon magnésio do

interior do receptor e o influxo de cálcio para a célula, o que resulta na amplificação e prolongamento da resposta ao impulso nervoso^{40; 41}.

Dados de literatura tem indicado, também, que a resposta inflamatória desencadeada pela lesão do nervo, desempenha papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática^{42; 43}. Macrófagos ativados e células de Schwann sintetizam mediadores inflamatórios, citocinas e fatores de crescimento. O fator de crescimento neural (NGF) aumenta a síntese de neuropeptídeos, como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), nas terminações nervosas centrais e periféricas^{44; 45}. Além de contribuir para a sensibilização central, estas alterações favorecem também alterações nos nociceptores, resultando em sensibilização periférica⁴⁶.

Os sintomas da dor neuropática descritos pelos pacientes, ou observados em modelos experimentais em animais, incluem dor espontânea persistente (dor em queimação), hiperalgesia (resposta exagerada a estímulos nocivos) e alodinia (resposta a estímulos não nocivos)^{42; 47}. Os fármacos utilizados no tratamento da dor neuropática não são totalmente eficazes no controle dessa dor e menos da metade dos pacientes relatam benefícios significativos com qualquer tipo de medicamento⁴⁸. Assim, para a melhoria do tratamento, tem sido preconizada a multidisciplinaridade da abordagem terapêutica, no intuito de reduzir a sintomatologia do paciente, promovendo a máxima independência funcional, melhora do estado psicossocial e rápida reintegração à sociedade^{49; 50}. As modalidades terapêuticas para o tratamento da dor neuropática incluem medicamentos, terapias físicas (fisioterapia), psicoterapia, acupuntura, procedimentos anestésicos, como bloqueios nervosos com anestésicos locais, e, por fim, procedimentos neurocirúrgicos (cirurgias descompressivas, neurotomias, rizotomias, psicocirurgias e implante de eletrodos para estimulação elétrica do sistema nervoso central⁵¹). Recursos físicos utilizados por fisioterapeutas, como o ultrassom terapêutico (UST) e o Laser de baixa potência (LBP), vêm apresentando bons resultados no controle da dor neuropática^{52; 53}.

1.3 Ultrassom terapêutico

O ultrassom terapêutico (UST) é uma forma de energia mecânica de alta frequência, acima de 20 kHz, que não é percebida pelo ouvido humano e que se propaga como onda de pressão. Essa onda provoca agitação de partículas ao seu redor, fazendo com que estas partículas oscilem sem causar deformação do meio¹⁵.

O UST utilizado em aplicações terapêuticas, é gerado por um transdutor eletromecânico, baseado em cerâmicas piezoelétricas. O efeito piezoelétrico consiste na variação das dimensões físicas de um cristal quando submetido a campos elétricos. O contrário também ocorre, ou seja, a aplicação de pressões no cristal gera campos elétricos. O efeito piezoelétrico aparece em alguns cristais como o quartzo, óxido de zinco e cerâmicas sintetizadas, tais como titanato de bário e titanato de zirconato de chumbo. A caracterização dos transdutores e a determinação do campo acústico gerado por ele são essenciais para o entendimento da informação causada pela interação do ultrassom com os diversos meios e tecidos biológicos⁵⁴. A aplicação do UST na reparação de tecidos biológicos, depende de seus efeitos biofísicos, mas não térmicos, e inclui a cavitação, o micro fluxo acústico e a piezoelectricidade, os quais estão envolvidos na interação com esses tecidos¹⁵.

Os efeitos biofísicos gerados pelo UST podem ser divididos em efeitos térmicos e não térmicos. Os efeitos térmicos (exposição à onda contínua) são aqueles derivados do aquecimento tecidual e podem levar ao aumento do fluxo sanguíneo, a redução do espasmo muscular, aumento da extensibilidade das fibras colágenas e inflamação. Estima-se que ocorra aumento de temperatura tecidual de 40-45°C, durante 5 minutos de aplicação. Ainda, efeitos térmicos excessivos, em especial o UST com intensidades mais elevadas, podem lesionar os tecidos expostos^{55; 56}.

Já os efeitos não térmicos (exposição à onda pulsada gerando efeitos mecânicos) podem ser obtidos com ou sem efeito térmico. Cabe ressaltar que os dois efeitos são inseparáveis porém o efeito mecânico é imperante. Dois fenômenos são observados no modo pulsado - a cavitação e a microtransmissão acústica (micromassageamento). O fenômeno de cavitação pode criar, aumentar e implodir cavidades de vapor e gases. Durante a expansão, os gases adsorvidos no líquido ao redor da cavidade, evaporam resultando na expansão da cavidade^{55; 56}. Por outro lado, durante a etapa de compressão, estes gases ou vapores não retornam completamente ao líquido, resultando num aumento efetivo da cavidade. Este processo ocorre em ciclos periódicos de expansão e compressão, causando o aumento do

tamanho desta cavidade, que atinge um tamanho crítico e implode. Então ocorre a liberação de grande quantidade de calor e pressão num curto período de tempo e em pontos localizados do líquido, o que fornece energia suficiente para acelerar processos químicos⁵⁷. A cavitação estável (regular) é considerada benéfica ao tecido lesado, enquanto a cavitação instável (transitória) provoca danos teciduais. A microtransmissão acústica pode alterar a estrutura da membrana celular, função e permeabilidade e tem sido sugerido que estimula a reparação tecidual. A somatória desses fenômenos estimula a atividade de fibroblastos, aumento na síntese de proteínas, aumento do fluxo sanguíneo local, regeneração tecidual e cicatrização óssea^{57; 58}. Adicionalmente, a energia ultrassônica pode gerar aumento da vascularização, da permeabilidade celular e do limiar de dor^{56; 58}.

O UST é, provavelmente, o recurso físico mais antigo e o mais utilizado na clínica fisioterapêutica por ser de fácil aplicabilidade e baixo custo operacional⁵⁹. De fato, há muitos relatos sobre os efeitos do ultrassom sobre o processo de cicatrização dos nervos^{15; 17; 18; 60}, ossos⁶¹, tendões⁶², músculos⁶³, ligamentos⁶⁴, cartilagem⁶⁵ e pele⁶⁶. Esses relatos têm demonstrado seus benefícios, quando o UST é aplicado em baixas doses, e seus prejuízos, em doses elevadas⁶⁷. O UST é considerado pró-inflamatório e pró-proliferativo e pode ser aplicado em qualquer fase da lesão, para acelerar os aspectos fisiológicos de reparação tecidual^{59; 67}. Foi evidenciado ainda, que o ultrassom possui efeito sobre a inibição de radicais livres e estimulação da microcirculação, mediadores do processo inflamatório, infiltração celular e reparação dos tecidos moles⁶⁸.

Os estudos sobre a utilização do UST no tratamento da dor isquiática e de outras neuropatias iniciaram-se na década de 1930⁶⁹ e desde então, os dados de literatura tem mostrado que este tratamento auxilia na recuperação das lesões. Nesse sentido, Hong et al.⁷⁰, utilizando UST (0,5 e 1,0 W/cm²), três vezes por semana, durante 35 dias, para o tratamento de lesão nervosa periférica (nervo tibial) em ratos, observaram que a aplicação de 0,5 W/cm² acarreta recuperação mais rápida da velocidade de condução nervosa e da amplitude do potencial evocado da contração muscular, comparativamente aos animais dos grupos controle ou tratados com UST na intensidade de 1,0 W/cm². Baseado nesses dados foi sugerido que o UST de intensidade baixa, pode facilitar a recuperação das neuropatias de compressão.

Em estudo experimental visando avaliar o efeito do UST em nervo isquiático de ratos, previamente submetido à lesão por esmagamento, foi observado que o UST aumenta a regeneração nervosa. Neste estudo, foi utilizada irradiação ultrassônica pulsada (1:5, 1 MHz, 0,4 W/cm², duração de 2 min), aplicada por 10 dias, iniciando-se o tratamento 24 horas após a

indução da lesão. Por meio do emprego do índice funcional do isquiático e de histomorfometria, os autores sugeriram que houve melhora na avaliação funcional e aumento de densidade de fibras nervosas típicas de regeneração¹⁸.

Cabe ressaltar que o uso do UST é bastante difundido na clínica médica, apresentando resultados satisfatórios, além de ser pouco oneroso, o que mostra a importância da sua utilização como agente terapêutico. Apesar disso, os mecanismos envolvidos nas ações do ultrassom são ainda contraditórios. A ausência de parâmetros de uso (como frequência, modo, área irradiada, tempo de duração e principalmente, a dosagem), e a dificuldade de padronização da técnica de utilização, são fatores que dificultam as pesquisas visando avaliar sua eficácia e mecanismos de ação. Assim, a ampliação de estudos e dos modelos experimentais que utilizam o UST pode favorecer a compreensão destes mecanismos, contribuindo para sua melhor utilização clínica.

1.4 Laser de baixa potência

Outro recurso bastante utilizado na reabilitação é o *LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* – amplificação da luz por emissão de radiação estimulada), uma fonte de luz coerente de um feixe estreito monocromático nas faixas visível, infravermelho e ultravioleta do espectro. Os diversos tipos de Lasers diferem entre si pelo comprimento de onda e pela natureza do meio ativo⁷¹.

A radiação emitida pelo Laser terapêutico ou de baixa potência, possui características que a diferem dos demais tipos de aparelhos, devido aos seguintes princípios⁷²:

- monocromaticidade: a luz emitida apresenta apenas um comprimento de onda;
- coerência: em uma radiação Laser temos não só um único comprimento de onda, mas também picos e vales (depressões) dos campos elétricos e magnéticos ocorrendo ao mesmo tempo (coerência temporal) e “viajando” numa mesma direção (coerência espacial);
- colimação: os feixes do Laser permanecem sempre paralelos, em consequência da coerência espacial, acarretando inexistência de divergência da radiação durante sua propagação ao longo de grandes distâncias.

A natureza da interação entre a radiação eletromagnética luminosa e os tecidos biológicos é complexa. Acredita-se que o mecanismo primário de ação da radiação a Laser sob moléculas fotossensíveis, ocorra de 4 maneiras diferentes⁷³:

- mudanças no estado de oxidação – redução dos componentes da cadeia respiratória e aceleração na transferência de elétrons;
- alteração na atividade bioquímica e estrutural determinada pelo aquecimento transitório dos cromóforos;
- aumento na concentração de H_2O_2 com subsequente aumento do ânion superóxido (O_2^-);
- produção de oxigênio molecular ou singlete (O_2).

Dados de literatura tem evidenciado que o Laser de baixa potência promove maior velocidade de cicatrização e reparo, aceleração da neovascularização, oclusão de feridas, maior formação de tecido de granulação, maior número de fibroblastos e de fibras colágenas, aumento da síntese de ATP, liberação de histamina pré-formada, redução do pH intracelular e alterações na proliferação e motilidade celular, fagocitose, resposta imune e respiração celular⁷⁴. O Laser acarreta também efeito analgésico. Esse efeito tem sido atribuído à manutenção do gradiente iônico da membrana celular, evitando sua despolarização em virtude do aumento de ATP e favorecendo a saída de sódio através da bomba de sódio/potássio. De maneira geral, pode-se dizer que a luz atua como fator estabilizador do potencial de membrana em repouso (hiperpolarização), o que dificulta a transmissão do impulso doloroso local⁷⁵. Tem sido sugerido ainda, que o LBP diminui a inflamação e dor por favorecer a reabsorção de exsudatos inflamatórios, promovendo desta forma, a eliminação de substâncias nociceptivas²¹. Estudo realizado por Ferreira et al. (2005) demonstrou que a irradiação a Laser He-Ne de baixa potência, com $2,5 J/cm^2$, acarreta analgesia e efeito anti-edematogênico em ratos injetados com carragenina, por via intraplantar. Os estudos farmacológicos evidenciaram que o efeito analgésico do Laser não é decorrente da ativação de receptores opióides, mas deve envolver bloqueio da sensibilização dos nociceptores por mediadores liberados durante o processo inflamatório²¹.

Além da interferência em processos inflamatórios, foi observado que o LBP, aplicado por até sete semanas no nervo isquiático lesado (esmagamento) de ratos, induz aumento

significativo no número e diâmetro dos axônios regenerados¹⁹. Ainda, Barbosa et al. (2010) investigando, por meio da avaliação funcional (pelo índice funcional do isquiático - IFC), os efeitos de ondas de LBP (660 nm e 830 nm), aplicado por 21 dias em ratos submetidos à lesão do nervo isquiático, observaram que apenas a aplicação do Laser de 660 nm promove recuperação funcional precoce²⁰, reforçando os dados sobre a eficácia do Laser de baixa potência .

Apesar dos dados sobre os efeitos do Laser na lesão nervosa, as informações ainda não são conclusivas, havendo ainda dados conflitantes e inconsistentes. A adequação dos parâmetros deste tipo de tratamento é fator decisivo para selecionar a dose a ser administrada nessa terapia.

*

* *

Os dados descritos até o momento indicam que o ultrassom terapêutico ou o Laser de baixa potência, aplicados no local da lesão, podem ter efeitos benéficos, favorecendo a reparação estrutural e funcional do nervo lesado, bem como diminuindo da dor. Ainda, tem sido observada, na clínica, a utilização conjunta desses dois recursos, contudo, não existem dados na literatura sobre estudos sistemáticos sobre os efeitos desta aplicação conjunta sobre a dor e a recuperação da lesão nervosa periférica.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, em ratos, a eficácia da aplicação conjunta do ultrassom terapêutico e do Laser de baixa potência na nocicepção e recuperação funcional do nervo isquiático submetido à lesão por pinçamento.

Os objetivos específicos foram:

1. caracterizar os fenômenos nociceptivos e a alteração funcional induzidos pelo pinçamento do nervo isquiático de ratos;
2. determinar o efeito do ultrassom terapêutico e do Laser de baixa potência, aplicados isoladamente ou em conjunto, sobre a dor neuropática, alteração funcional e regeneração nervosa após lesão do nervo isquiático;
3. avaliar o envolvimento de receptores opióides nos efeitos causados pelo ultrassom terapêutico e Laser de baixa potência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso entre 160 a 180 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Estes animais foram mantidos com água e ração ad libitum em sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada (22 °C + 1) e ciclo claro-escuro (12:12h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº: 047 nas folhas 102 do livro 02 e pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto Butantan – sob o protocolo nº 820/11.

3.2 Indução da lesão do nervo isquiático

A lesão do nervo isquiático foi realizada por pinçamento do nervo, de acordo com a técnica descrita por Monte-Raso et al. (2008)⁷⁶.

Os animais foram anestesiados por isoflurano inalatório. Foi realizada tricotomia da face lateral da coxa direita. O animal foi posicionado em decúbito ventral, prendendo-se as patas dianteiras e traseiras em abdução. Foi realizada incisão cutânea longitudinal retilínea, na face lateral da coxa, desde o trocânter maior até a articulação do joelho. O espaço entre os músculos quadríceps femoral e glúteo foi rebatido por divulsão, para identificação do nervo isquiático, desde sua emergência, na borda inferior do glúteo máximo, até sua bifurcação, na articulação do joelho. Um ponto de sutura foi realizado para identificar a região a ser lesada. O nervo isquiático foi então comprimido por uma pinça regulável capaz de produzir uma carga estática de 5.000 gramas, que foi aplicada ao nervo por 5 minutos. A incisão foi suturada em camadas, utilizando fio de sutura de seda número 4-0.

A pinça foi calibrada na máquina universal de ensaios, com uma célula de carga de 50 Kgf de capacidade (Kratos® - Brasil) e um indicador digital (Kratos®, modelo IKE-01 - Brasil).

3.3 Avaliação da sensibilidade dolorosa

3.3.1 Determinação da hiperalgesia mecânica

Para avaliação da hiperalgesia mecânica, foi utilizado o teste de pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Itália), realizado de acordo com o método descrito por Randall & Sellito (1957)⁷⁷.

Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de “retirada” do membro. Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação (Figura 3).

Este teste foi aplicado antes da cirurgia, bem como em diversos tempos após a cirurgia ou os tratamentos. Os resultados foram avaliados através da comparação das médias das medidas iniciais (basal) e finais ou, quando determinado, através da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 3 - Teste de pressão de pata



3.3.2 Determinação da alodinia

A alodinia foi avaliada por ensaio quantitativo, em resposta a estímulo tátil aplicado às patas do rato, segundo método descrito por Chaplan et al. (1994)⁷⁸, modificado. Neste teste, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas destes animais.

Para o ensaio de alodinia, foi empregada uma série logarítmica de 10 filamentos de von Frey (Aesthesiometer Semmer-Weinstein, Stoelting Co., E.U.A). A calibração dos filamentos é definida como \log_{10} (gramas x 10000), tendo os seguintes valores (o valor em gramas está entre parênteses): 3,61 (0,407g); 3,84 (0,692g); 4,08 (1,202g); 4,17 (1,479g); 4,31 (2,041g); 4,56 (3,630g); 4,74 (5,495g); 4,93 (8,511g); 5,07 (11,749g) e 5,18 (15,136g). Cabe ressaltar que os filamentos com peso superior à 15,136g não foram empregados nos estudos de alodinia. Os filamentos foram aplicados, um a um, perpendicularmente, sob a área plantar de ambas as patas posteriores e mantidas por um período de 8 segundos. Os ensaios foram iniciados com o filamento de 1,202g. O filamento capaz de elicitar a retirada da pata, duas vezes consecutivas, foi considerado como a força em gramas necessária para elicitar a resposta (100% de resposta). Na ausência de resposta ao filamento inicial (1,202g), a apresentação dos filamentos foi realizada de forma ascendente, até a observação de duas respostas consecutivas para um mesmo filamento.

Na ausência de resposta ao maior estímulo (15,135g), este filamento foi considerado como valor de corte. Esta forma de apresentação dos filamentos minimiza o risco de habituação do animal à resposta⁷⁸ (Figura 4). Este teste foi aplicado antes da cirurgia, bem como em diversos tempos após a cirurgia ou os tratamentos. Os resultados foram avaliados através da comparação das médias das medidas iniciais (basal) e finais ou, quando determinado, através da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 4 - Filamentos de Von Frey



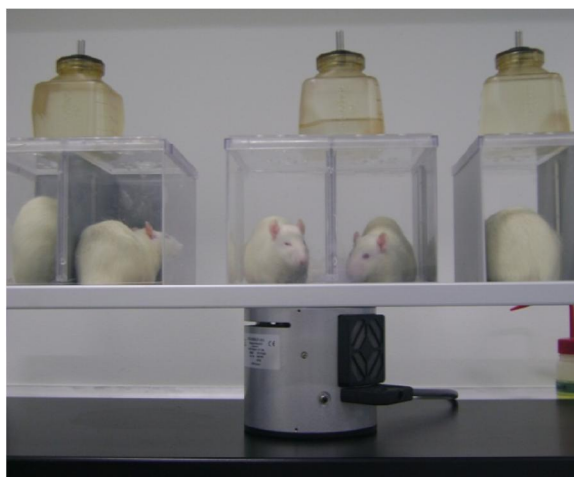
3.3.3 Determinação da hiperalgesia térmica

A avaliação da hiperalgesia térmica foi realizada por meio do teste plantar de Hargreaves et al. (1984)⁷⁹. Esse teste consiste no aquecimento, por meio de fonte de luz infravermelha dirigida, da região plantar da pata traseira do rato, até que o animal apresente o comportamento da retirada da pata ou o aquecimento da pata atinja o limite de tempo predeterminado.

Os animais foram colocados em compartimentos de acrílico individual e posicionados sobre uma superfície de vidro especial, que permite a passagem de forma homogênea da luz e do calor, durante cinco minutos, para adaptação ao ambiente. Após esse período, uma fonte de luz infravermelha, colocada sob cada uma das patas traseiras do animal, é acionada juntamente com um cronômetro eletrônico, até que o animal retire a pata, quando, então, a fonte de luz e o relógio param automaticamente. Na situação em que o animal não apresentar reação, é estipulado um tempo limite máximo de corte do experimento de 15.1 segundos para a preservação da sua integridade física.

Os resultados foram avaliados por meio de comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 5 - Teste plantar



3.4 Avaliação Funcional

Para avaliação da atividade funcional foi utilizado o índice funcional do isquiático (IFC). Nessa avaliação, são analisadas as pegadas das patas posteriores dos animais em uma passarela de madeira. As impressões das pegadas foram obtidas pelo método proposto por De Medinaceli et al. (1984)⁸⁰, que emprega tiras de papel impregnado com azul de bromofenol. Para a impressão das pegadas, azul de bromofenol (forma anidra) (Sol-Tech -Brasil) foi dissolvido a 1% em acetona absoluta. Essa solução tem cor alaranjada. As folhas de papel foram mergulhadas nesta solução e posteriormente secas ao ar livre. Depois de secas, as folhas de papel foram cortadas em tiras de 44 cm de comprimento por 8,7 cm de largura e estocadas em embalagens plásticas, para evitar o contato com a umidade. A passarela (44 cm X 8,7 cm) foi construída em madeira, de acordo com De Medinaceli et al. (1984), sendo fechada nas laterais e dotada de uma casinhola ao final, onde o animal, após percorrer todo seu comprimento, encontra grãos de ração^{80; 81} (Figura 6).

Antes do início dos experimentos, os animais foram treinados a caminhar na passarela. Foram considerados aptos para o experimento os animais que percorressem a passarela, da abertura inicial até a casinhola, sem parar ou retornar em direção ao início da passarela.

Figura 6 - Vista geral da passarela



Para a realização dos experimentos, as patas posteriores dos animais foram umedecidas em água, para possibilitar a marcação das folhas tingidas. Os seguintes parâmetros foram mensurados nas pegadas obtidas: (1) comprimento da pegada (PL, do inglês *print length*); (2) espalhamento total dos dedos, do 1° ao 5° (TS, do inglês *total spread of toes*) e (3) espalhamento dos dedos intermediários, do 2° ao 4° (IT, do inglês *intermediate toes*). Para a obtenção das medidas, foi utilizado paquímetro eletrônico (MYTUTOYO - Brasil). Estes dados foram coletados e analisados para a pata não operada (NPL, NTS e NIT) e operada (EPL, ETS e EIT) (Figura 7).

Os dados obtidos foram analisados por meio da equação desenvolvida por De Medinaceli et al. (1984)⁸⁰ e adaptada por Bain et al. (1989)⁸² e Hare et al. (1992)⁸⁰, como se segue:

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

Onde:

N= Normal

E= Experimental

PL= Comprimento da pata

TS= Espalhamento total dos dedos

IT= Espalhamento dos dedos intermediários

Os resultados obtidos com esta equação são expressos como percentual negativo da função normal, em que 0 (zero) corresponde à função normal, ou ausência de deficiência, e - 100 (menos cem) corresponde à disfunção total.

As mediadas foram realizadas antes (medida basal) e em diferentes tempos após a cirurgia ou tratamentos.

Figura 7 - Esquema da impressão em papel da pata



Esquema da impressão em papel da pata de um rato normal (A) e com lesão do nervo isquiático (B)
Fonte: Reis et al. (2008)⁸³.

3.5 Tratamentos farmacológicos

Para avaliar o envolvimento de prostanóides nos fenômenos nociceptivos induzidos pela compressão do nervo isquiático, foi utilizada Indometacina (Sigma Chem. Co., EUA), um anti-inflamatório não esteroideal (AINE), na dose de 4 mg/Kg, i.v., administrada 60 minutos antes da avaliação dos fenômenos nociceptivos e funcional.

Para avaliar o envolvimento da liberação de opióides endógenos nessas mesmas condições experimentais, os animais foram tratados com Naloxona (Nx) (Cloridrato de naloxona, Sigma Chemical CO., EUA), na dose de 5,0 mg/Kg, s.c., administrada 60 minutos antes da avaliação dos fenômenos nociceptivos e funcional.

Os grupos controles receberam salina 0,9% ou tris (1M, pH 8,0) nas mesmas condições do grupo experimental correspondente.

Foi também utilizado um grupo controle adicional, constituído por animais tratados com morfina (M) (sulfato de morfina, Protequim Brasil), na dose de 5,0 mg/Kg, s.c., administrada 60 minutos antes da avaliação dos fenômenos nociceptivos e funcional.

3.6 Protocolos de tratamento

Ultrassom terapêutico: o protocolo consistiu em tratamentos diários, a partir da 24^a hora após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias. As aplicações duraram 2 minutos. Foi utilizado o equipamento Avatar V (KLD Biosistemas - Brasil) devidamente calibrado pelo fabricante e aferido no Laboratório de Ultrassom da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Foi utilizado transdutor (cabeçote) com frequência de 1 MHz, área de radiação efetiva (ERA) de 0,99 cm², no modo pulsado (1:5 ou 20 %) e com intensidade variada dependendo do grupo experimental, ou seja, 0,20 W/cm², 0,50 W/cm² e 1,0 W/cm² (Figura 8). O meio de acoplamento foi o gel a base de água. O cabeçote foi colocado em posição perpendicular e movimentos circulares foram realizados. A contenção do animal foi manual, sem a necessidade de anestesia.

A potência média do equipamento foi aferida previamente ao experimento, com o auxílio do medidor de potência.

Figura 8 - Equipamento ultrassom terapêutico



Laser de baixa potência: o protocolo consistiu em tratamentos intercalados (dia sim, dia não), a partir do primeiro dia do pós-operatório, perdurando por 21 dias. Foi utilizado o Laser Arseneto de Gálio Alumínio (GaAsAl) (DMC ®, São Carlos- Brasil) (Figura 9) pulsátil, com comprimento de onda de 830 nm, potência instantânea 100 mW, tempo de exposição e densidade de energia com intensidade variada, dependendo do grupo experimental (Tabela 1). Foi utilizada a técnica pontual, em que são aplicados três pontos do lado esquerdo e 3 pontos do lado direito da cicatriz cirúrgica (total de 6 pontos). A contenção do animal foi manual, sem a necessidade de anestesia.

A potência média do equipamento foi aferida previamente ao experimento, com o auxílio do medidor de potência.

Figura 9 - Equipamento Laser GaAsAl



Tabela 2 - Protocolo de irradiação do Laser de baixa potência.

Densidade de Energia	Tempo	Área irradiada	Aplicação
107 J/cm ² (3 J)	30 s	0,028 cm ²	Pontual
214 J/cm ² (6 J)	60 s	0,028 cm ²	Pontual
714 J/cm ² (20,4 J)	200 s	0,028 cm ²	Pontual

J: Joule; s: segundos; cm²: centímetros quadrados.

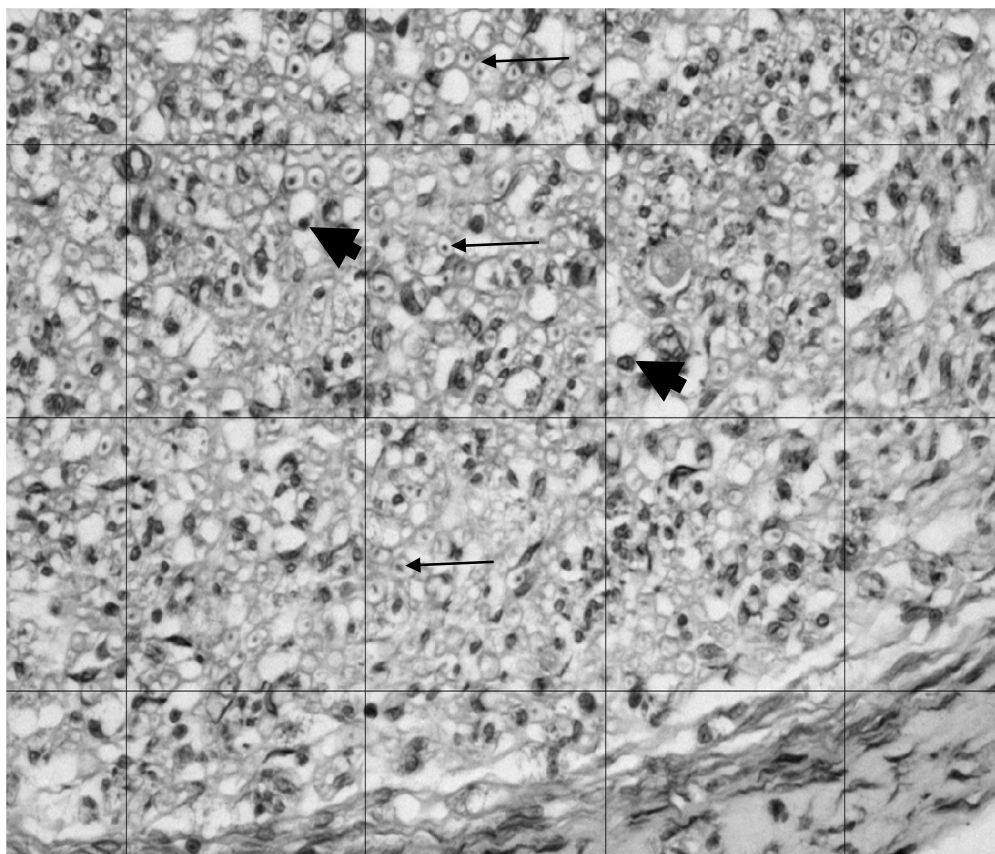
3.7 Análise histológica

Após eutanásia, o nervo isquiático foi dissecado desde sua origem até sua trifurcação, na fossa poplítea, visualizando assim o ponto de pinçamento. Foi realizada a secção dessa área e os fragmentos foram colocados imediatamente em cassetes individuais, identificados. Os cassetes foram mergulhados em solução fixadora de Bouin (ácido pícrico, ácido acético, formalina) por 24 horas. Posteriormente foram lavados em água corrente e o material foi transferido para concentrações diferentes de etanol (50%, 70%, 80%, 90% e 100%). Para diafanização, foram realizados dois banhos de xilol (15 minutos cada). Em seguida o material foi impregnado em parafina líquida, durante 3 horas. Os blocos obtidos após impregnação em parafina foram aparados e cortados em micrótomato rotativo, na espessura de 10 μm . Em seguida as secções foram colocadas em lâminas de vidro previamente revestidas com albumina, secadas e coradas pelo método convencional de hematoxilina-eosina.

As secções histológicas foram avaliadas em microscópio de luz com objetiva de 10 e 40X e aumento final de 100 e 400x, respectivamente, acoplado ao *software Image-Pro Plus 4.1*.

A análise morfológica foi realizada a partir da captura da imagem de cada fascículo, com o maior aumento. Cortes com artefatos de técnica grosseiros (rachaduras, dobras, coloração pobre) foram descartados nessa fase. O próximo passo consistiu da captura sequencial de áreas internas de cada fascículo, que foram convertidas em imagens 32-bit e limpas de qualquer vaso sanguíneo, fibras degeneradas e artefatos. Foram fotografados cinco campos aleatórios, tomando-se cuidado para não haver repetição de imagem. Para isso utilizamos um recurso do programa que gera uma grade, com linhas horizontais e verticais, formando quadrados de forma homogênea. As fibras mielinizadas individuais foram indicadas pelo cursor, contadas automaticamente, sendo então calculado o valor médio de cinco cortes de cada segmento do nervo (Figura 10).

Figura 10 - Esquema ampliado da contagem das fibras mielínicas



Axônios (setas finas) e núcleos das células de Schwann (seta grossa).

3.8 Grupos experimentais

O estudo foi realizado em três etapas: caracterização do modelo experimental, definição das dosimetrias dos recursos físicos e a aplicação conjunta destes recursos. Os animais foram distribuídos em diferentes grupos experimentais, conforme os procedimentos descritos abaixo:

Para a caracterização do modelo experimental

Grupo Lesado: constituído por animais submetidos ao procedimento cirúrgico para pinçamento do nervo, porém não submetidos a nenhum tipo de tratamento (n= 5 animais).

Grupo Sham: constituído por animais que passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, porém o nervo isquiático não foi pinçado. Esses animais não receberam nenhum tipo de tratamento (n= 5 animais).

Grupo Naive: constituído por animais que não passaram por nenhum procedimento cirúrgico e não receberam nenhum tipo de tratamento (n= 4 animais).

Grupo AINEs: constituído por animais submetidos ao procedimento cirúrgico e que receberam diariamente, durante 8 dias (a partir do primeiro dia do pós-operatório), indometacina administrada 60 minutos antes da avaliação dos fenômenos nociceptivos e parâmetro funcional (n= 5 animais).

Grupo controle AINEs: constituído por animais que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que receberam diariamente indometacina nas mesmas condições experimentais (n= 5)

Grupo Tris: constituído por animais submetidos ao procedimento cirúrgico e que receberam diariamente, durante 8 dias (a partir do primeiro dia do pós-operatório), Tris (diluyente da Indometacina) administrada 60 minutos antes da avaliação dos fenômenos nociceptivos e parâmetro funcional (n= 5 animais).

Grupo controle Tris: constituído por animais que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que receberam diariamente Tris, nas mesmas condições experimentais (n= 5 animais).

Grupo Morfina: grupo controle positivo, constituído por animais submetidos ao procedimento cirúrgico e que receberam diariamente, durante 9 dias (a partir do primeiro dia do pós-operatório), administrada 60 minutos antes da avaliação dos fenômenos nociceptivos e parâmetro funcional (n= 5 animais).

Grupo controle Morfina: grupo controle positivo, constituído por animais que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que receberam diariamente morfina nas mesmas condições experimentais (n= 5 animais).

Grupo Salina: constituído de animais submetidos procedimento cirúrgico e que receberam diariamente, durante 9 dias (a partir do primeiro dia do pós- operatório), salina, administrada 60 minutos antes da avaliação dos fenômenos nociceptivos e parâmetro funcional (n= 5 animais).

Grupo controle Salina: constituído de animais que não foram submetidos procedimento cirúrgico e que receberam diariamente salina, nas mesmas condições experimentais (n= 5 animais).

Definição das dosimetrias dos recursos físicos

Grupo UST – 0.20 W/cm²: constituído por animais submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com UST - dosimetria 0.20 W/cm² (n= 5 animais).

Grupo UST – 0.50 W/cm²: constituído por animais submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com UST - dosimetria 0.50 W/cm² (n= 5 animais).

Grupo UST – 1.0 W/cm²: constituído por animais submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com UST - dosimetria 1.0 W/cm² (n= 5 animais).

Grupo controle positivo UST: constituído por animais que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com UST desligado (simulado) (n= 5 animais).

Grupo controle negativo UST: constituído por animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com UST desligado (simulado) (n= 5 animais).

Os tratamentos com o UST tiveram início 24 horas após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias consecutivos.

Grupo LBP – 3 J: constituído por animais submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com LBP - dosimetria 3 J (n= 5 animais).

Grupo LBP – 6 J: constituído por animais submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com LBP - dosimetria 6 J (n= 5 animais).

Grupo LBP – 20.4 J: constituído por animais submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com LBP - dosimetria 20.4 J (n= 5 animais).

Grupo controle positivo LBP: constituído por animais que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com LBP desligado (simulado) (n= 5 animais).

Grupo controle negativo LBP: constituído por animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com LBP desligado (simulado) (n= 5 animais).

Os tratamentos com o LBP tiveram início 24 horas após o procedimento cirúrgico. O LBP foi aplicado em dias alternados (dia sim dia não), nos 21 dias subsequentes ao procedimento cirúrgico.

Aplicação conjunta dos recursos físicos

Grupo UST+LBP: constituído por animais submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com UST (dosimetria 1.0 W/cm²) e com LBP (6 J) (n= 5 animais).

Grupo controle positivo UST+LBP: constituído por animais que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com os recursos físicos desligados (simulado) (n= 5 animais).

Grupo controle negativo UST+LBP: constituído por animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com os recursos físicos desligados (simulado) (n= 5 animais).

Grupo Naloxona: constituído por animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que receberam Naloxona no primeiro dia pós-operatório e que foram tratados com os recursos (n= 5 animais).

Grupo Naive Naloxona: constituído por animais que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico, que foram tratados com os recursos físicos desligados (simulado) e que receberam Naloxona 10 mg/kg, s.c., no primeiro dia pós-operatório e administrada 30 minutos antes da avaliação dos fenômenos nociceptivos e parâmetro funcional (n= 5 animais).

Grupo Salina: constituído de animais submetidos procedimento cirúrgico e que receberam salina, no primeiro dia pós-operatório, administrada 60 minutos antes da avaliação dos fenômenos nociceptivos e parâmetro funcional (n= 5 animais).

Os tratamentos com o UST+LBP tiveram início 24 horas após o procedimento cirúrgico. A aplicação do UST foi realizada em dias consecutivos e a do LBP, em dias alternados (dia sim, dia não).

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância associada ao teste de Tukey, para comparação de mais de duas médias. O índice de significância foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos fenômenos nociceptivos e da alteração funcional induzidos pelo pinçamento do nervo isquiático de ratos

Após adaptação prévia dos animais aos testes comportamentais e funcional, os valores basais da resposta dos animais para cada um dos testes, foram determinados. Em seguida, foram realizados os procedimentos cirúrgicos específicos para cada grupo. Os animais foram reavaliados 7, 14 e 21 dias após a cirurgia, para verificação de possíveis alterações do limiar nociceptivo e da função motora.

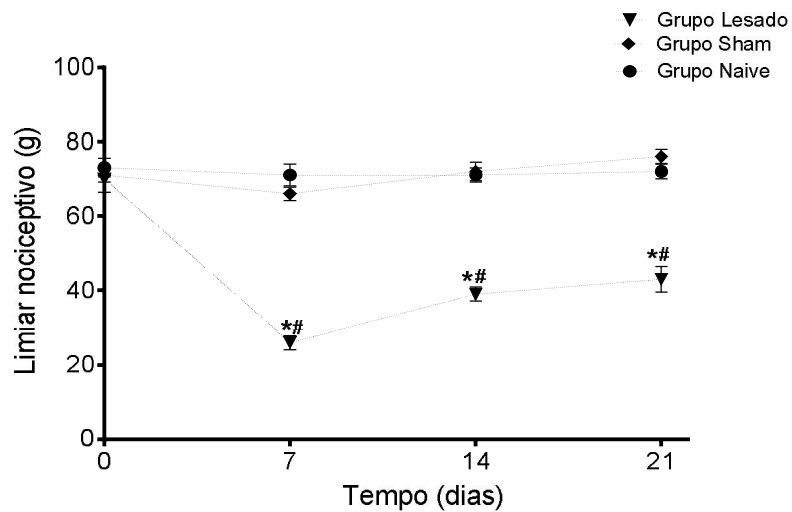
4.1.1 Caracterização dos fenômenos nociceptivos

4.1.1.1 *Hiperalgisia mecânica*

O pinçamento do nervo acarretou diminuição significativa do limiar nociceptivo dos animais (grupo GL), quando comparado com a medida inicial (basal) ou com os grupos Sham (GS) e Naive (GN), caracterizando o fenômeno de hiperalgisia. Esse fenômeno foi detectado durante todo o período de observação (Figura 11). Houve diferença estatística, entre o 7º e 21º dias. O pico de hiperalgisia ocorreu no 7º dia, regredindo parcialmente, a seguir.

Com relação aos GS e GN, não foram observadas diferenças significativas entre as medidas iniciais e as medidas obtidas nos demais períodos (Figura 11).

Figura 11 - Hiperalgesia mecânica induzida pelo pinçamento do nervo isquiático de ratos.



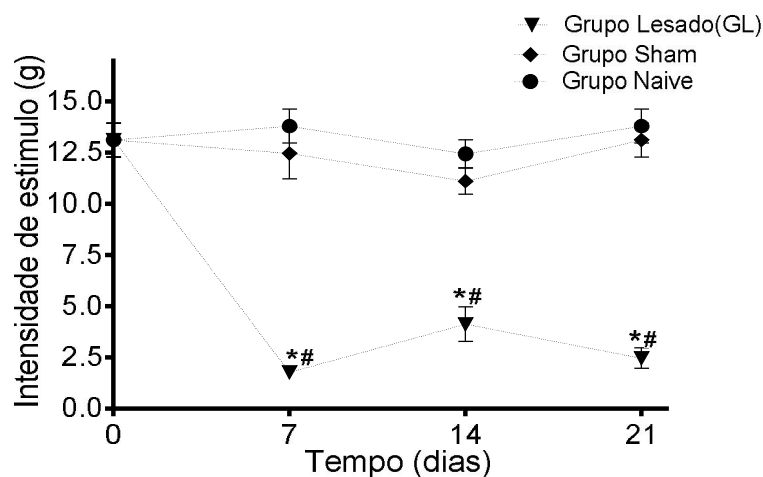
O limiar nociceptivo, avaliado pelo teste de pressão de pata e expresso (em gramas - g), foi determinado antes (tempo zero – medida inicial), 7, 14 e 21 dias após a lesão. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação com a medida inicial (basal); # $p < 0.05$ por comparação com os grupos Sham e Naive.

4.1.1.2 Alodinia mecânica

O pinçamento do nervo acarretou diminuição na intensidade do estímulo tátil necessário para induzir a resposta da retirada da pata, no GL, quando comparado com a medida inicial (basal) ou com os GS e GN, caracterizando o fenômeno de alodinia. Esse fenômeno persistiu até o 21º dia pós-operatório (Figura 12).

Com relação aos GS e GN, não foram observadas diferenças estatísticas entre as medidas iniciais e as medidas obtidas nos demais períodos (Figura 12).

Figura 12 - Alodinia mecânica induzida pelo pinçamento do nervo isquiático de ratos.

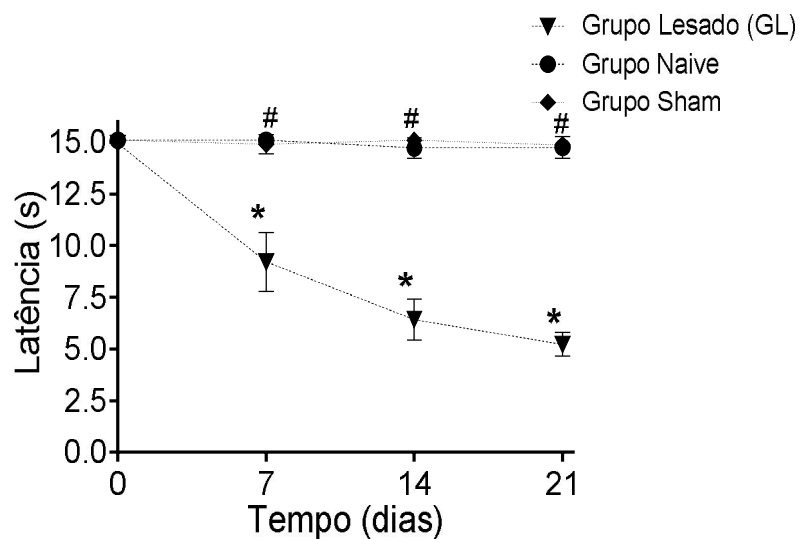


O limiar de resposta ao estímulo tátil (filamentos de von Frey) está representado como a intensidade do estímulo (em gramas - g) necessária para induzir a retirada da pata. As medidas foram realizadas antes (tempo zero), 7, 14 e 21 dias após o pinçamento do nervo isquiático. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação com a medida inicial (basal); # $p < 0.05$ por comparação com os grupos Sham e Naive.

4.1.1.3 Hiperalgisia térmica

Os animais submetidos à cirurgia apresentaram diminuição significativa da latência de resposta ao estímulo térmico, em relação aos animais não-operados. Foi observada diminuição significativa do grupo Lesado em relação a medida inicial e aos grupos controles, Sham e Naive em todos os períodos de avaliação. Não foi observada diferença estatística entre os grupos controles (Sham e Naive) (Figura 13).

Figura 13 - Hiperalgisia térmica induzida pelo pinçamento do nervo isquiático de ratos.



O limiar de resposta ao estímulo térmico foi avaliado pelo teste plantar e expresso em latência (segundos - s) para a resposta de retirada da pata, foi determinado antes (tempo zero – medida inicial), 7, 14 e 21 dias após a lesão. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. *p <0.05 por comparação com a medida inicial (basal); # p <0.05 por comparação com os grupos Sham e Naive.

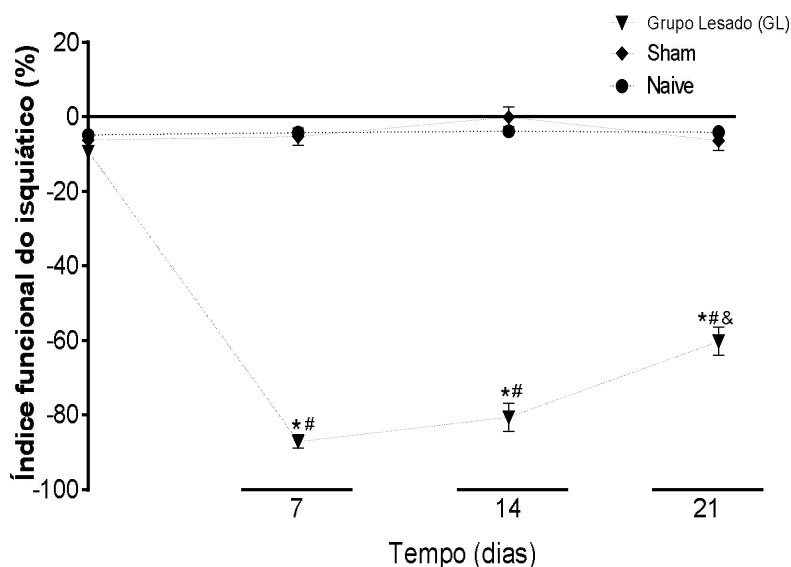
4.1.2 Avaliação funcional: índice funcional do isquiático (IFC)

As observações realizadas logo após o procedimento cirúrgico, e também durante todo o período de observação (21 dias), mostraram que os animais do GL não se apoiavam sobre a pata operada, apresentando dedos em completa adução e flacidez da pata.

A avaliação funcional mostrou haver diferenças significativas para esse grupo, quando comparado à medida inicial e também com os grupos GS e GN, detectadas a partir do 7º dia do período pós-operatório (Figura 14). Contudo, quando se realizou a comparação entre os diferentes períodos, foi observada recuperação parcial do índice funcional do grupo GL, estatisticamente significativa no 21º dia, quando comparado ao 7º dia do pós-operatório (Figura 14).

Com relação aos GS e GN, não foram observadas diferenças estatísticas entre as medidas iniciais e as medidas obtidas nos demais períodos de observação (Figura 14).

Figura 14 - Disfunção motora induzida pelo pinçamento do nervo isquiático de ratos.



Para a avaliação funcional foi utilizado o índice funcional do isquiático (IFC). O resultado obtido expressa um percentual negativo da função normal, em que 0 (zero) corresponde à função normal, ou ausência de deficiência, e -100 (menos cem) corresponde à disfunção total. O IFC foi avaliado 7, 14 e 21 dias após a cirurgia. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0.05$ por comparação com os grupos Sham e Naive; & $p < 0.05$ por comparação com o 7º dia.

4.2 Efeito do tratamento com Indometacina sobre os fenômenos nociceptivos e as alterações funcionais causadas pelo pinçamento do nervo

Para avaliar o envolvimento dos prostanóides na nocicepção causada pelo pinçamento do nervo isquiáticos, foi utilizada Indometacina administrada diariamente, administrada a partir do primeiro dia pós-operatório, 60 min antes das avaliações.

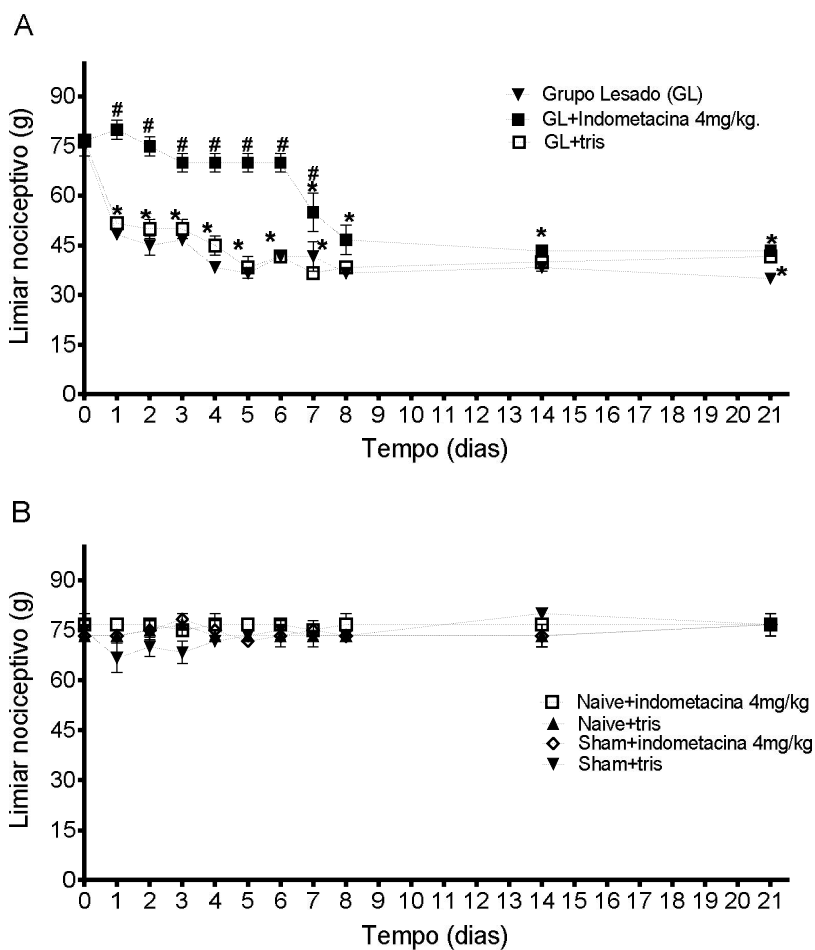
4.2.1 Caracterização dos fenômenos nociceptivos

4.2.1.1 Efeito sobre a hiperalgesia mecânica

O pinçamento do nervo acarretou diminuição significativa do limiar nociceptivo dos animais (grupo GL), quando comparado com a medida inicial (tempo 0), caracterizando o fenômeno de hiperalgesia (Figura 15-A). A administração do anti-inflamatório não esteroide (indometacina) reverteu a hiperalgesia até o 6º dia do pós-operatório. No sétimo dia foi observada inibição parcial desse fenômeno. A partir do oitavo dia não foi mais detectado efeito anti-hiperalgésico para a indometacina (Figura 15 – A). Baseado nesses resultados, a administração de indometacina foi interrompida nesse dia, para evitar a manifestação de possíveis efeitos adversos desse fármaco. A administração de Tris, nas mesmas condições experimentais, não interferiu com a hiperalgesia acarretada pela lesão nervosa.

Não foram observadas diferenças significativas nos grupos Sham+indo e Sham+Tris, quando comparado às medidas iniciais. Como controle adicional, foram realizadas avaliações do limiar nociceptivo de animais Naive tratados com indometacina ou tris, nas mesmas condições experimentais. Os resultados mostraram que o tris e a indometacina, per se, não interferem com o limiar nociceptivo dos animais (Figura 15 – B).

Figura 15 - Efeito do tratamento com indometacina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.



O limiar nociceptivo, avaliado pelo teste de pressão de pata e expresso em gramas, foi determinado antes (tempo zero) e diariamente, por 21 dias após a lesão. Indometacina, ou Tris, foram administrados i.v., diariamente, durante 8 dias, a partir do primeiro dia do pós-operatório, 60 min. antes de cada avaliação. Painel A: grupo submetido à lesão; Painel B: grupo de animais naive (não manipulados cirurgicamente) e sham (falso-operados). Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo GL.

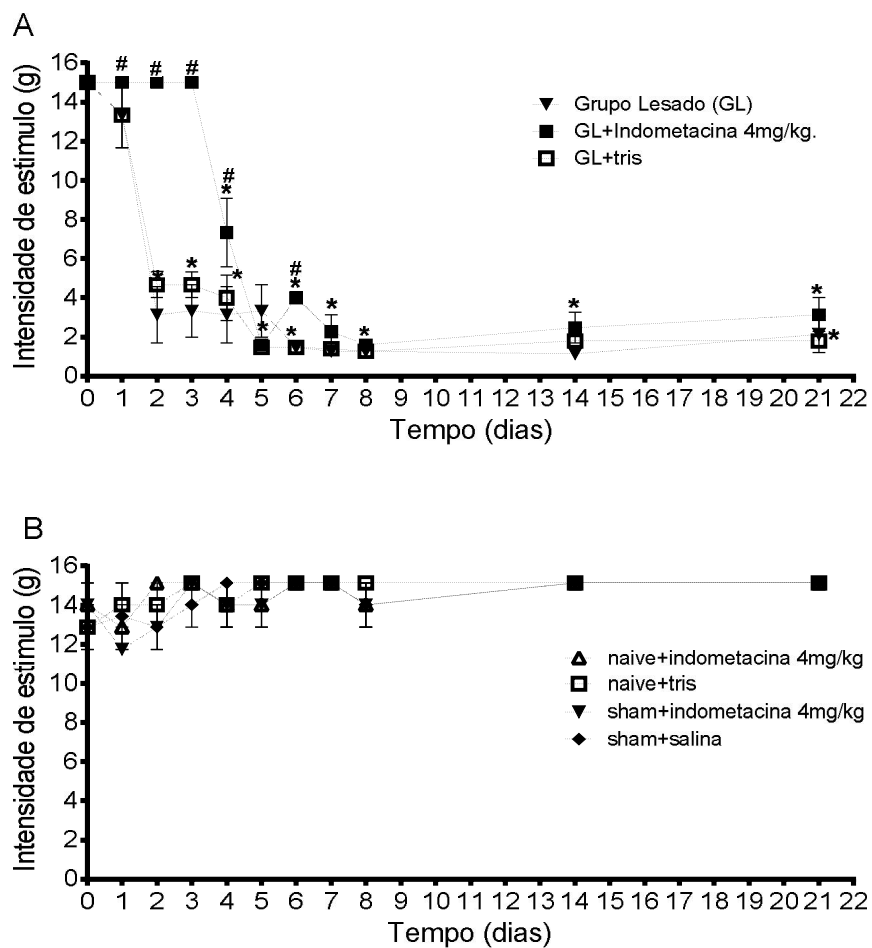
4.2.1.2 Efeito sobre a alodinia mecânica

O pinçamento do nervo acarretou diminuição na intensidade do estímulo tátil necessário para induzir a resposta de retirada da pata, quando comparado com a medida inicial (tempo 0), caracterizando o fenômeno de alodinia. Esse fenômeno persistiu até o 21º dia pós-operatório (Figura 16-A).

A administração de Indometacina reverteu significativamente, a alodinia acarretada pela lesão do nervo, quando comparado ao grupo GL. Essa reversão foi observada apenas quando o anti-inflamatório foi administrado até o 4º dia do período pós-operatório. A administração do diluente (Tris) não interferiu com a alodinia causada pela lesão do nervo (Figura 16 - A).

Não foram observadas diferenças significativas nos grupos Sham+indo e Sham+Tris, quando comparado com as medidas iniciais. Como controle adicional, foram realizadas avaliações do limiar nociceptivo de animais Naive tratados com indometacina ou tris, nas mesmas condições experimentais. Os resultados mostraram que os diluentes e a indometacina, per se, não interferem com o limiar de resposta dos animais (Figura 16 – B).

Figura 16 - Efeito do tratamento com indometacina sobre a alodinia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.



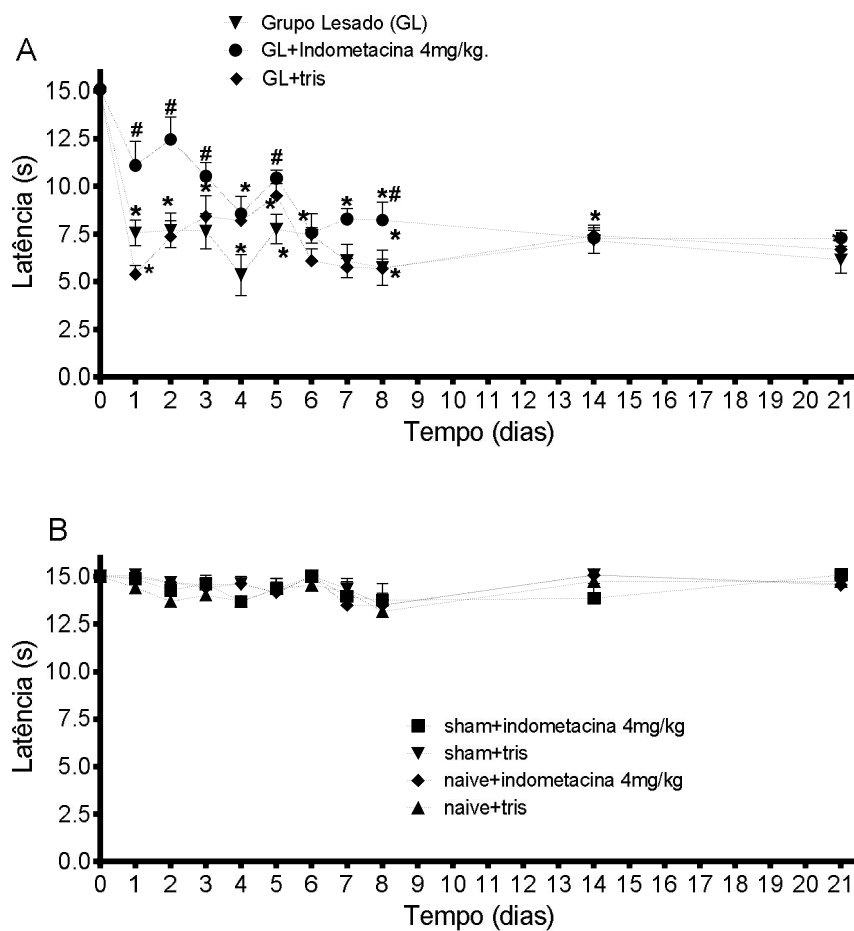
O limiar de resposta ao estímulo tátil (filamentos de von Frey) está representado como a intensidade de estímulo (g) necessária para induzir a retirada da pata. As medidas foram realizadas antes (tempo zero), e diariamente, por 21 dias após o pinçamento do nervo isquiático. Indometacina, ou Tris, foram administrados i.v., diariamente, durante 8 dias, a partir do primeiro dia do pós-operatório, 60 min. antes de cada avaliação. Painele A: grupo submetido à lesão; Painele B: grupo de animais naive (não manipulados cirurgicamente) e sham (falso-operados). Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação com a medida inicial (0); # por comparação com o grupo GL.

4.2.1.3 Efeito sobre a hiperalgesia térmica

Os animais submetidos à cirurgia apresentaram diminuição significativa da latência de resposta de retirada da pata ao estímulo térmico, em relação à medida inicial, em todos os períodos de avaliação evidenciando o fenômeno de hiperalgesia térmica (Figura 17-A). A administração de Indometacina reverteu parcialmente, porém significativamente, a hiperalgesia térmica acarretada pela lesão do nervo, quando comparado ao grupo GL e seu diluente. Essa reversão foi observada apenas quando o anti-inflamatório foi administrado até o 5º dia do período pós-operatório. A administração do diluente (Tris) não interferiu com a hiperalgesia térmica causada pela lesão do nervo (Figura 17 - A).

Não foram observadas diferenças significativas nos grupos Sham+indo e Sham+Tris, quando comparado com as medidas iniciais. Como controle adicional, foram realizadas avaliações do limiar nociceptivo de animais Naive tratados com indometacina ou diluente, nas mesmas condições experimentais. Os resultados mostraram que os diluentes e a indometacina, per se, não interferem com o limiar de resposta dos animais (Figura 17 – B).

Figura 17 - Efeito do tratamento com indometacina sobre a hiperalgesia térmica induzida pelo pinçamento do nervo isquiático de ratos.



O limiar de resposta ao estímulo térmico foi avaliado pelo teste plantar, e determinado antes (tempo zero) e diariamente, por 21 dias após a lesão, e expresso em latência (segundos - s). Indometacina ou tris foram administradas i.v., diariamente, por 8 dias, a partir do primeiro dia do pós-operatório, 60 min. antes de cada avaliação. Painele A: grupo submetido à lesão; Painele B: grupo de animais naive (não manipulados cirurgicamente) e sham (falso-operados). Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo GL.

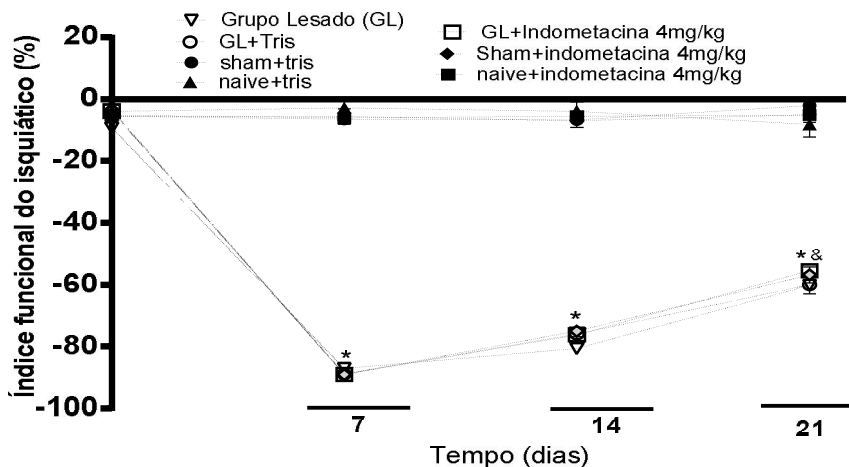
4.2.2 Efeito do tratamento com Indometacina sobre o índice funcional do isquiático (IFC) de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático

As avaliações realizadas logo após o procedimento cirúrgico, e também durante todo o período de observação (21 dias), mostraram que os animais do GL não se apoiavam sobre a pata operada, apresentando dedos em completa adução e flacidez da pata.

A avaliação funcional mostrou haver diferenças significativas para esse grupo, quando comparado à medida inicial, detectadas a partir do 7º dia do período pós-operatório (Figura 18). Contudo, quando se realizou a comparação entre os diferentes períodos, foi observada recuperação parcial do índice funcional, que foi significativa no 21º dia, quando comparado ao 7º dia do pós-operatório. A administração de Indometacina ou tris não interferiu com a manifestação das alterações funcionais ou a recuperação dessas alterações. (Figura 18).

Não foram observadas diferenças significativas nos grupos Sham+indo e Sham+tris, quando comparado com as medidas iniciais. Como controle adicional, foram realizadas avaliações do limiar nociceptivo de animais Naive tratados com indometacina ou diluente, nas mesmas condições experimentais. Os resultados mostraram que a indometacina e o tris, per se, não interferem com o IFC dos animais (Figura 18).

Figura 18 - Efeito do tratamento com indometacina sobre a alteração do índice funcional de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático.



Para a avaliação funcional foi utilizado o índice funcional do isquiático (IFC). O resultado expressa um percentual negativo da função normal, em que 0 (zero) corresponde à função normal, ou ausência de deficiência, e -100 (menos cem) corresponde à disfunção total. O IFC foi determinado no 7º, 14º e 21º dias após a cirurgia. Indometacina, ou Tris, foram administrados i.v., diariamente, por 8 dias, a partir do primeiro dia do pós-operatório. Nos dias da avaliação funcional, o inibidor foi administrado 60 min. antes de cada avaliação. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); & $p < 0,05$ por comparação com o 7º dia.

4.3 Efeito do tratamento com morfina sobre os fenômenos nociceptivos e as alterações funcionais originadas pelo pinçamento do nervo

Neste estudo, foi também avaliado o efeito da morfina, um fármaco usualmente utilizado no tratamento de dores persistentes. O opióide foi administrado diariamente, a partir do primeiro dia pós-operatório, 60 minutos antes das avaliações comportamentais.

4.3.1 Caracterização dos fenômenos nociceptivos

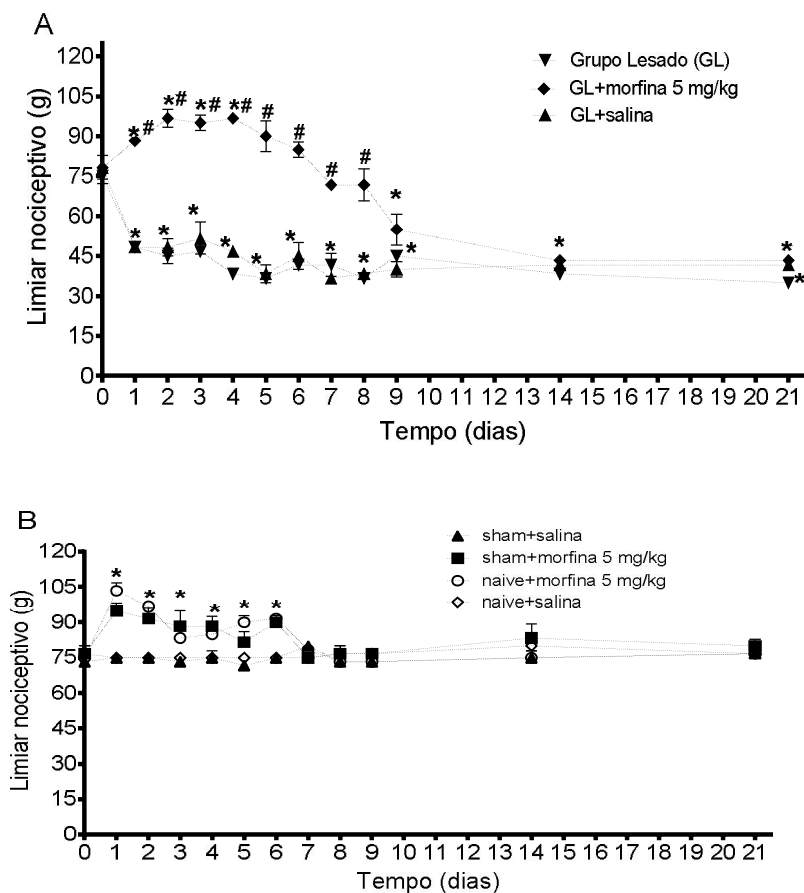
4.3.1.1 Efeito sobre a hiperalgesia mecânica

O pinçamento do nervo acarretou diminuição significativa do limiar nociceptivo dos animais, quando comparado com a medida inicial (tempo 0), caracterizando o fenômeno de hiperalgesia (Figura 19-A).

A administração de sulfato de morfina diariamente, 60 minutos antes das avaliações inibiu a hiperalgesia até o oitavo dia de avaliação. Além da reversão desse fenômeno, o opióide acarretou aumento significativo, do limiar nociceptivo dos animais, quando comparado a medida basal (tempo 0), até o 4º dia do pós-operatório (Figura 19 – A). A administração de salina, nas mesmas condições experimentais, não interferiu com a hiperalgesia acarretada pelo pinçamento do nervo. Como controle adicional, foram realizadas avaliações do limiar nociceptivo de animais Naive e Sham tratados com sulfato de morfina ou salina, nas mesmas condições experimentais. Os resultados mostraram aumento significativo do limiar nociceptivo de animais tratados com a morfina, quando comparado aos valores basais (tempo 0), perdurando até o sexto dia. Por outro lado, o tratamento com salina não interferiu, per se, com o limiar nociceptivo dos animais (Figura 19 – B).

Baseado nos dados obtidos, o tratamento com morfina foi interrompido no 9º dia do pós-operatório.

Figura 19 - Efeito do tratamento com morfina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.



O limiar nociceptivo, avaliado pelo teste de pressão de pata e expresso em gramas (g), foi determinado antes (tempo zero) e diariamente, por 21 dias após a lesão após a lesão. Morfina ou salina foram administradas s.c., diariamente, por 9 dias, a partir do primeiro dia do pós-operatório, 60 min. antes de cada avaliação. Painele A: grupo submetido à lesão; Painele B: grupo de animais naive (não manipulados cirurgicamente) e sham (falso-operados). Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0.05$ por comparação com o grupo GL

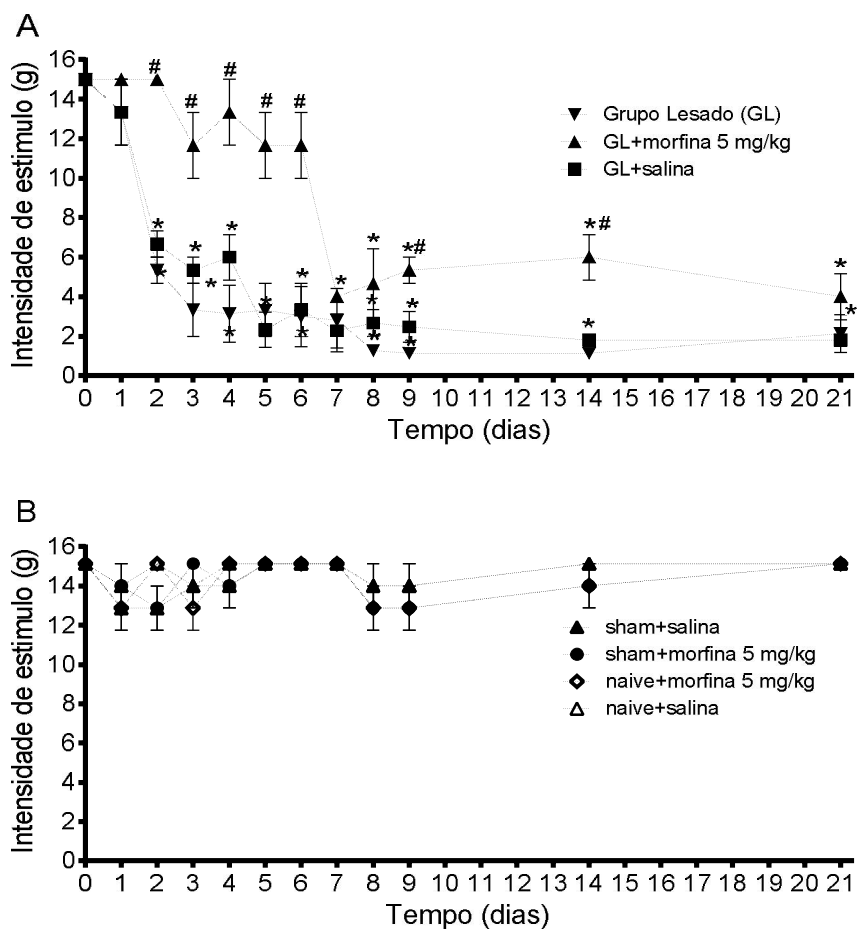
4.3.1.2 Efeito sobre a alodinia mecânica

O pinçamento do nervo acarretou diminuição na intensidade do estímulo tátil necessário para induzir a resposta da retirada da pata, quando comparado com a medida inicial (tempo 0), caracterizando o fenômeno de alodinia. Esse fenômeno persistiu até o 21º dia pós-operatório (Figura 20-A).

A administração de sulfato de morfina diariamente, 60 minutos antes das avaliações inibiu a alodinia até o sexto dia de avaliação. A administração de salina, nas mesmas condições experimentais, não interferiu com a alodinia acarretada pelo pinçamento do nervo (Figura 20 - A).

Não foram observadas diferenças significativas nos grupos Sham+Morfina e Sham+Salina, quando comparado com as medidas iniciais. Como controle adicional, foram realizadas avaliações do limiar nociceptivo de animais Naive tratados com sulfato de morfina ou salina, nas mesmas condições experimentais. Os resultados mostraram que a morfina e a salina, per se, não interferem com o limiar de resposta dos animais (Figura 20 – B).

Figura 20 - Efeito do tratamento com sulfato de morfina sobre a alodinia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.



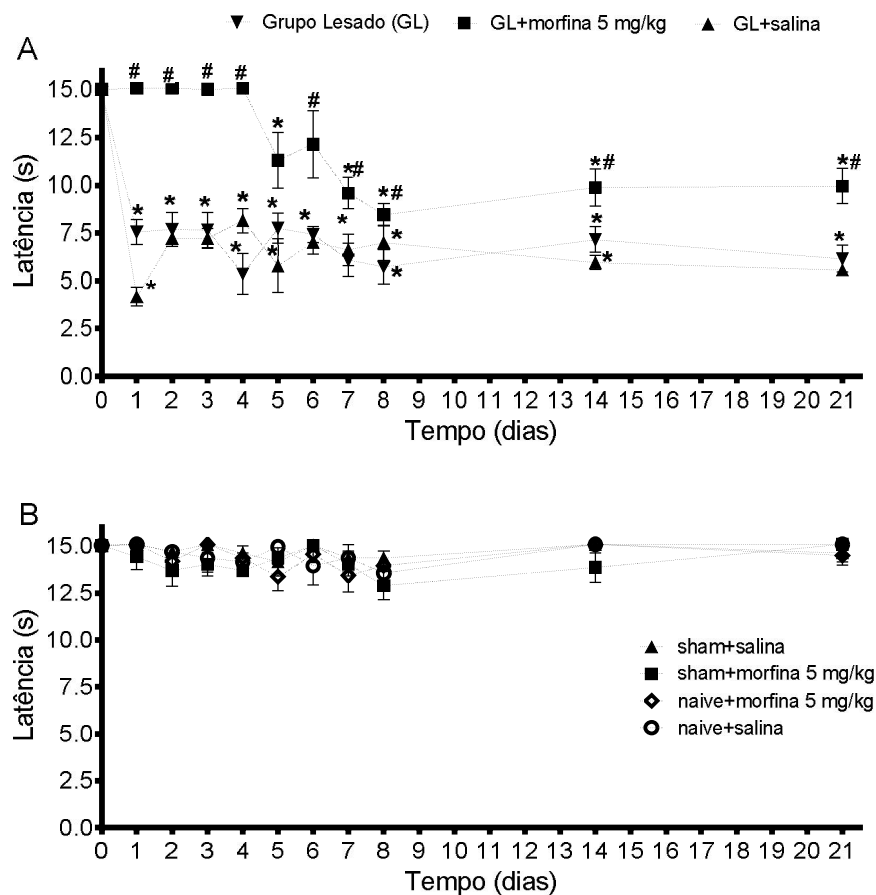
O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em grama (g) necessária para induzir a retirada da pata. As medidas foram realizadas antes (tempo zero), e diariamente, por 21 dias após o pinçamento do nervo isquiático. Morfina ou salina foram administradas s.c., diariamente, por 9 dias, a partir do primeiro dia do pós-operatório, 60 min. antes de cada avaliação. Painel A: grupo submetido à lesão; Painel B: grupo de animais naive (não manipulados cirurgicamente) e sham (falso-operados). Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. *p < 0,05 por comparação com a medida inicial (0); # p < 0,05 por comparação com o grupo GL.

4.3.1.3 Efeito sobre a hiperalgesia térmica

Os animais submetidos à cirurgia apresentaram diminuição significativa da latência de resposta de retirada da pata ao estímulo térmico, em relação à medida inicial, em todos os períodos de avaliação evidenciando o fenômeno de hiperalgesia térmica (Figura 21-A). A administração de sulfato de morfina diariamente, 60 minutos antes das avaliações inibiu a hiperalgesia térmica até o quarto dia de avaliação. A administração do diluente (Salina) não interferiu com a hiperalgesia causada pela lesão do nervo (Figura 21 - A).

Não foram observadas diferenças significativas nos grupos Sham+morfina e Sham+Salina, quando comparado com as medidas iniciais. Como controle adicional, foram realizadas avaliações do limiar nociceptivo de animais Naive tratados com a morfina e a salina, nas mesmas condições experimentais. Os resultados mostraram que a morfina e a salina, per se, não interferem com o limiar de resposta dos animais (Figura 21 – B).

Figura 21 - Efeito do tratamento com sulfato de morfina sobre a hiperalgesia térmica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.



O limiar de resposta ao estímulo térmico foi avaliado pelo teste plantar, e determinado antes (tempo zero) e diariamente, por 21 dias após a lesão, e expresso em latência (segundos - s). Morfina ou salina foram administradas s.c., diariamente, por 9 dias, a partir do primeiro dia do pós-operatório, 60 min. antes de cada avaliação. Paineil A: grupo submetido à lesão; Paineil B: grupo de animais naive (não manipulados cirurgicamente) e sham (falso-operados). Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo GL.

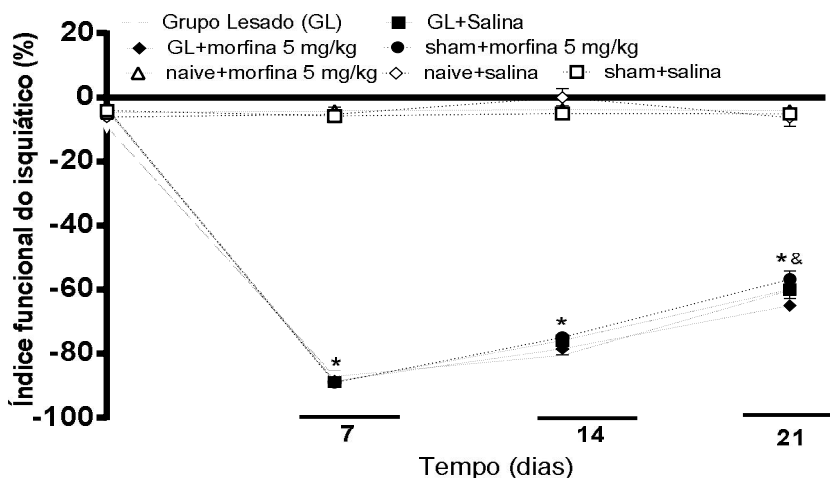
4.3.2 Efeito do tratamento com sulfato de morfina sobre o índice funcional do isquiático (IFC) de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático

As avaliações realizadas logo após o procedimento cirúrgico, e também durante todo o período de observação (21 dias), mostraram que os animais do GL não se apoiavam sobre a pata operada, apresentando dedos em completa adução e flacidez da pata.

A avaliação funcional mostrou haver diferenças significativas para esse grupo, quando comparado à medida inicial, detectadas a partir do 7º dia do período pós-operatório. Contudo, quando se realizou a comparação entre os diferentes períodos, foi observada recuperação parcial do índice funcional, que foi significativa no 21º dia, quando comparado ao 7º dia do pós-operatório. A administração de morfina ou salina não interferiu com a manifestação das alterações funcionais ou a recuperação dessas alterações (Figura 22).

Não foram observadas diferenças significativas nos grupos Sham+morfina e Sham+salina, quando comparado com as medidas iniciais. Como controle adicional, foram realizadas avaliações do limiar nociceptivo de animais Naive tratados com morfina ou salina, nas mesmas condições experimentais. Os resultados mostraram que a morfina e a salina, per se, não interferem com IFC dos animais (Figura 22).

Figura 22 - Efeito do tratamento com sulfato de morfina sobre a alteração do índice funcional de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático.



Para a avaliação funcional foi utilizado o índice funcional do isquiático (IFC). O resultado expressa um percentual negativo da função normal, em que 0 (zero) corresponde à função normal, ou ausência de deficiência, e -100 (menos cem) corresponde à disfunção total. O IFC foi determinado no 7º, 14º e 21º dias após a cirurgia. Morfina ou salina foram administradas s.c., diariamente, durante 9 dias. Nos dias das avaliações, o opióide foi administrado 60 min. antes de cada avaliação. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); & $p < 0,05$ por comparação com a medida do sétimo dia pós-operatório.

4.4 Análise histológica do nervo isquiático submetido ao pinçamento

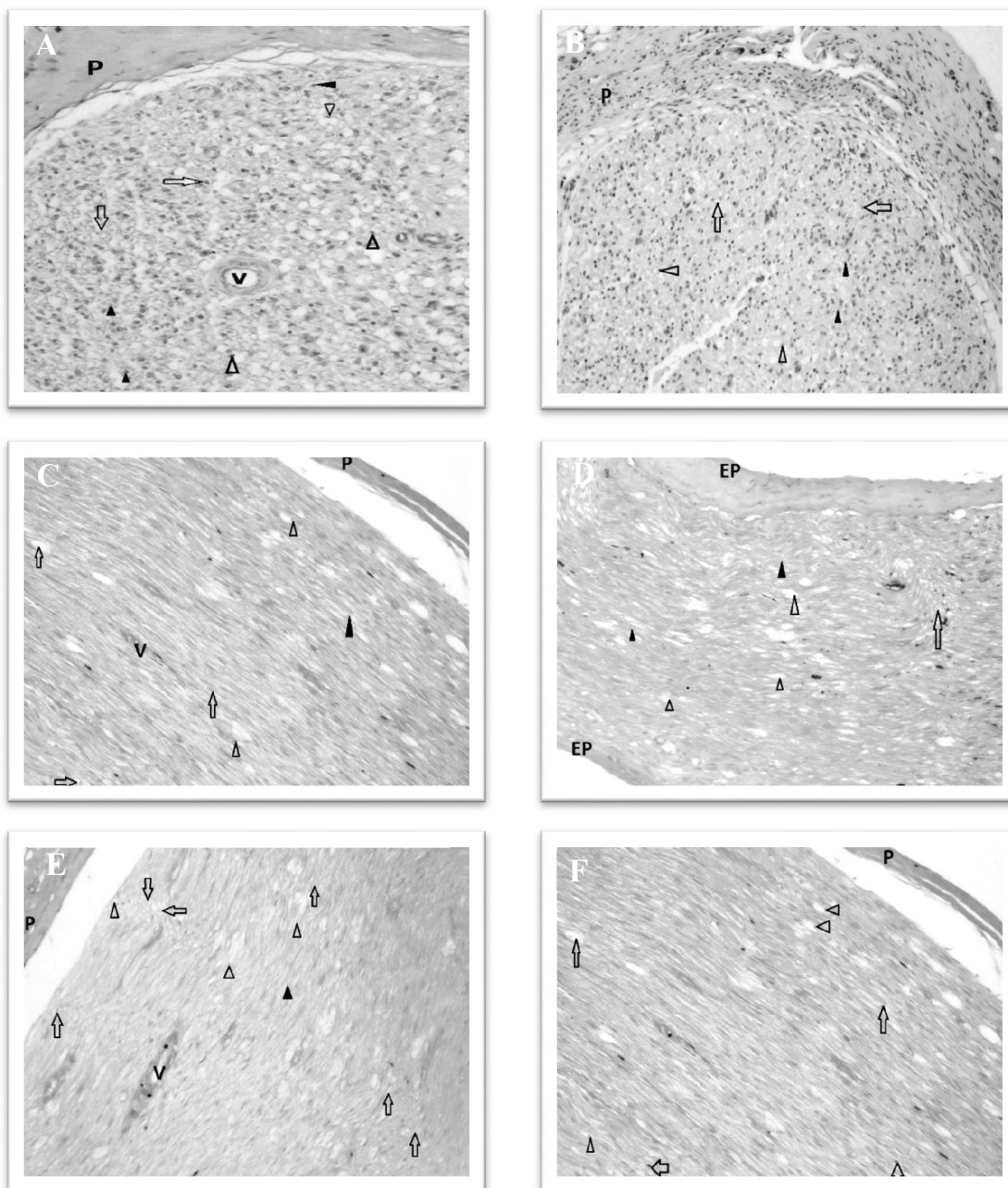
Nossos resultados estão apresentados tendo como base o estudo da morfologia da parte distal do coto proximal ao pinçamento do nervo isquiático, devidamente localizado pelo fio de sutura.

O nervo isquiático dos animais dos grupos naive e sham apresentou distribuição regular de fibras mielínicas de diferentes diâmetros, havendo proporcionalidade entre o tamanho de fibras e a espessura da bainha de mielina (figura 23 A e B respectivamente).

No grupo lesado, observou-se diminuição do tamanho das fibras mielínicas e também alteração no formato das fibras nervosas, indicando processo degenerativo (figura 23 – C).

Essas características foram observadas também nos grupo tratados com indometacina e morfina, demonstrando que a administração dos fármacos não interferiu com o processo degenerativo.

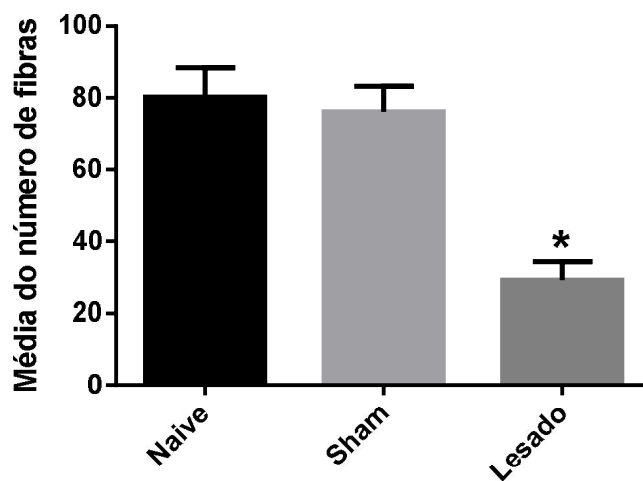
Figura 23 - Fotomicrografia do nervo isquiático.



Fotomicrografia de cortes semifinos de nervo isquiático, corados com eosina-hematoxilina e transformadas em imagens de 32-bit. A) Fibras do coto proximal do nervo de um animal do grupo naive (controle) em secção transversal. Observar a regularidade da disposição das fibras. B) Fibras do coto proximal do nervo de um animal do grupo sham (controle) em secção transversal. Observar a regularidade da disposição das fibras. C, D, E, F) Fibras do coto proximal do nervo de um animal do grupo lesado+salina, lesado+tris, lesado+indometacina e lesado+morfina, respectivamente, em secção transversal. Observar a irregularidade da disposição das fibras mielinizadas. Morfina foi administrada s.c., diariamente, por 9 dias, a partir do primeiro dia do pós-operatório. Indometacina foi administrada i.v., diariamente, por 8 dias, a partir do primeiro dia do pós-operatório. No 21º dia do pós-operatório foi realizada a eutanásia e o nervo isquiático foi dissecado para a obtenção do tecido. Aumento 100 X. EP: Epineuro; P: Perineuro; V: Vaso; Seta: fibras mielinizadas; Cabeça de seta cheia: axônio; Cabeça de seta vazia: núcleo da célula de Schwann

Após 21 dias pós-operatórios, houve diminuição significativa de fibras mielínicas do grupo lesado em comparação aos grupos Naive e Sham (Figura 24).

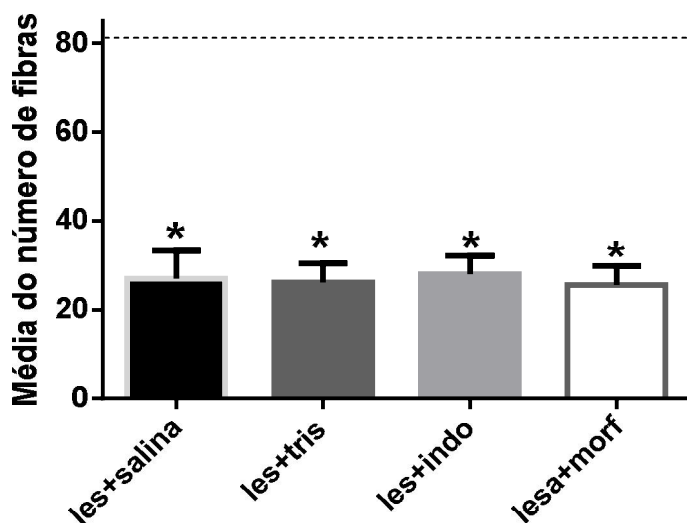
Figura 24 - Representação gráfica da contagem de fibras mielínicas dos grupos Naive, Sham e Lesado.



Para análise morfométrica, foram fotografados cinco campos aleatórios da imagem. Para isso utilizamos um recurso do programa que gera uma grade, com linhas horizontais e verticais, formando quadrados de forma homogênea. As fibras mielinizadas individuais foram indicadas pelo cursor, contadas automaticamente e foi então calculado um valor médio de cinco cortes de cada segmento do nervo. No 21º dia do pós-operatório foi realizada a eutanásia e o nervo isquiático foi dissecado para a obtenção do tecido. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Naive.

O tratamento com indometacina ou morfina não interferiu com o número de fibras mielinizadas, indicando que esses fármacos não interferem com a regeneração nervosa periférica (Figura 25).

Figura 25 - Representação gráfica da contagem de fibras mielínicas dos grupos tratados com indometacina e morfina.



Para análise morfométrica, foram fotografados cinco campos aleatórios da imagem. Para isso utilizamos um recurso do programa que gera uma grade, com linhas horizontais e verticais, formando quadrados de forma homogênea. As fibras mielinizadas individuais foram indicadas pelo cursor, contadas automaticamente e foi então calculado um valor médio de cinco cortes de cada segmento do nervo. Linha pontilhada representa a média do número de fibras do grupo Naive (controle). Morfina foi administrada s.c., diariamente, por 9 dias, a partir do primeiro dia do pós-operatório. Indometacina foi administrada i.v., diariamente, por 8 dias, a partir do primeiro dia do pós-operatório. No 21º dia do pós-operatório foi realizada a eutanásia e o nervo isquiático foi dissecado para a obtenção do tecido. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Naive. les: lesão nervosa; indo- indometacina; morf-morfina:

4.5 Definições dos parâmetros do ultrassom terapêutico

Os grupos experimentais descritos a seguir foram tratados com o UST, uma vez ao dia, por 21 dias consecutivos. A aplicação do ultrassom foi iniciada 24 horas após o procedimento cirúrgico e cada aplicação teve duração de 2 minutos. Os animais foram submetidos aos testes nociceptivos e à avaliação funcional no 7º, 14º e 21º dias após a cirurgia. Como controle, o grupo Lesado foi submetido ao processo de contensão manual para o tratamento com o UST, porém o aparelho foi mantido desligado (simulando um tratamento).

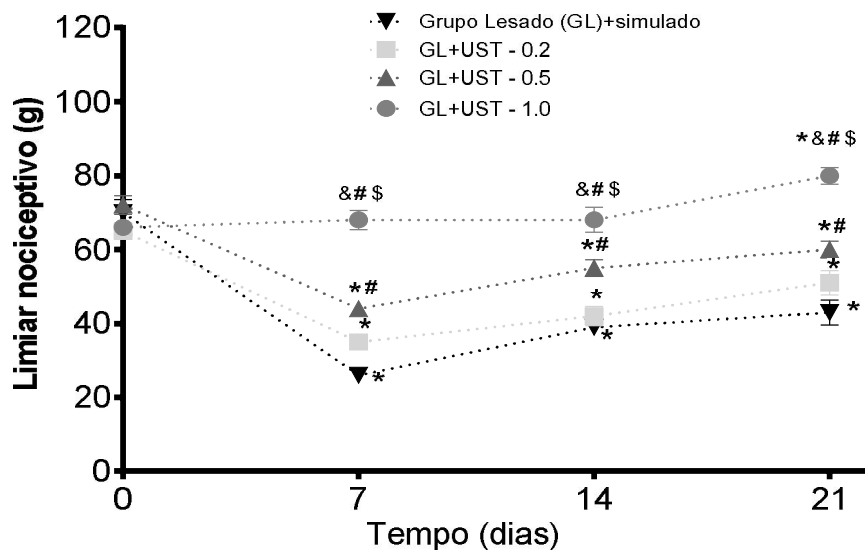
4.5.1 Efeito do UST nos fenômenos nociceptivos induzidos pela lesão do nervo isquiático

4.5.1.1 Efeito sobre a hiperalgesia mecânica

O pinçamento do nervo acarretou diminuição significativa do limiar nociceptivo dos animais (grupo GL+simulado), quando comparado com a medida inicial (basal), caracterizando o fenômeno de hiperalgesia. Esse fenômeno foi detectado durante todo o período de observação (Figura 26).

O tratamento com UST-0.2 não interferiu significativamente com a hiperalgesia mecânica, quando comparado ao grupo GL+simulado. Por outro lado, os animais tratados com UST-0.5 e UST-1.0 apresentaram aumento significativo do limiar nociceptivo, em todo o período de observação, quando comparado ao grupo GL+simulado. Para o grupo UST-0.5, a reversão da hiperalgesia foi parcial, uma vez que foram detectadas diferenças significativas do limiar nociceptivo em relação aos valores basais. Por outro lado, para os animais do grupo UST-1.0, além do efeito anti-hiperalgésico, foi também observado efeito antinociceptivo, caracterizado pelo aumento significativo do limiar nociceptivo, em comparação com a medida basal (Figura 26).

Figura 26 - Efeito do ultrassom terapêutico sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.



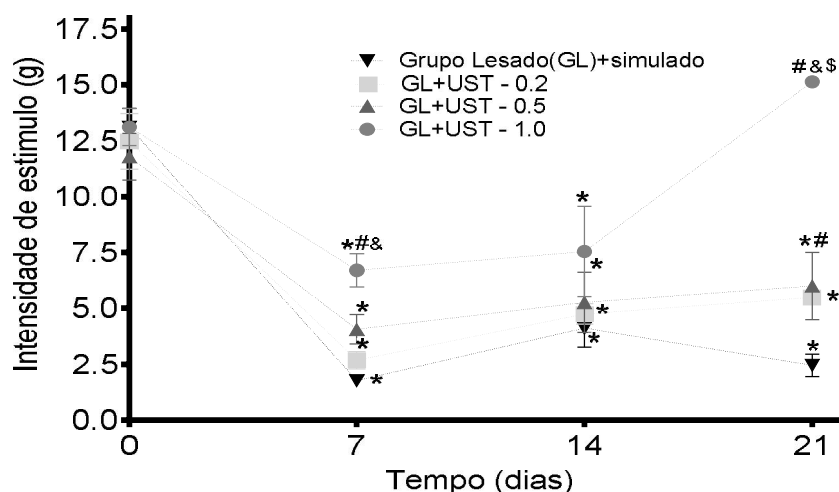
O limiar nociceptivo, avaliado pelo teste de pressão de pata e expresso em gramas (g), foi determinado antes (tempo zero) e 7, 14 e 21 dias após o pinçamento do nervo isquiático. O tratamento com UST teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias consecutivos. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo GL+simulado; & $p < 0,02$ por comparação com o grupo UST-0.2; \$ $p < 0,05$ por comparação com o grupo UST-0.5.

4.5.1.2 Efeito sobre a alodinia mecânica

O pinçamento do nervo acarretou diminuição na intensidade do estímulo tátil necessário para induzir a resposta da retirada da pata, quando comparado com a medida inicial (basal), caracterizando o fenômeno de alodinia. Esse fenômeno persistiu até o 21º dia pós-operatório (Figura 27).

Os animais tratados com UST apresentaram, quando comparado ao grupo GL+simulado, inibição da alodinia, de forma dose- e tempo-dependentes, sendo que para a dose de 1.0, foi detectada reversão total desse fenômeno no 21º dia do pós-operatório (Figura 27).

Figura 27 - Efeito do ultrassom terapêutico sobre a alodinia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.

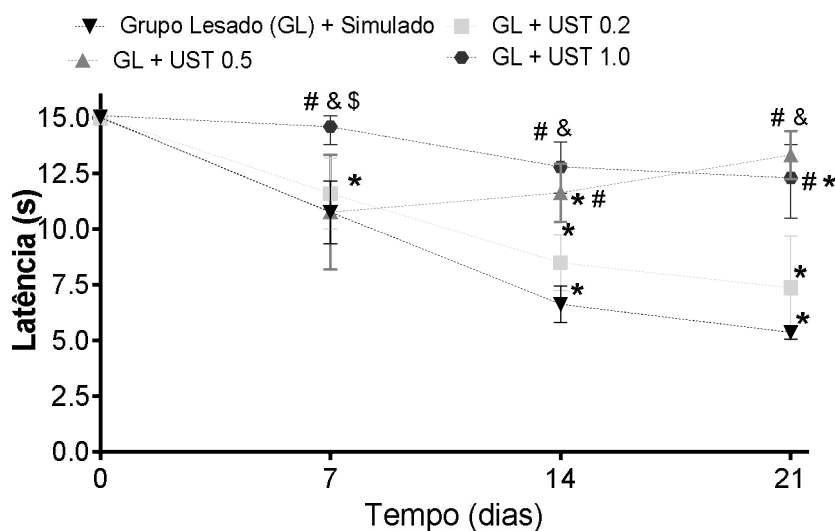


O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo (em gramas - g) necessária para induzir a retirada da pata. As medidas foram realizadas antes (tempo zero) e 7, 14 e 21 dias após o pinçamento do nervo isquiático. O tratamento com UST teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias consecutivos. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o GL+simulado; & $p < 0,02$ por comparação com o grupo UST-0.2; \$ $p < 0,05$ por comparação com o grupo UST-0.5.

4.5.1.3 Efeito sobre a hiperalgesia térmica

Os animais submetidos à cirurgia apresentaram diminuição significativa da latência de resposta ao estímulo térmico, em relação à medida basal, evidenciando o fenômeno de hiperalgesia térmica (Figura 28). O tratamento UST-0.2 não interferiu significativamente, com a hiperalgesia térmica, quando comparado ao GL+simulado. Por outro lado, os animais tratados com UST-0.5 e UST-1.0 apresentaram aumento significativo do limiar nociceptivo, em todo o período de observação, quando comparado ao grupo GL+simulado. Nestes grupos, o tratamento acarretou a reversão da hiperalgesia foi total, uma vez que não foram detectadas diferenças significativas em relação aos valores basais (Figura 28).

Figura 28 - Efeito do tratamento com ultrassom terapêutico sobre a hiperalgesia térmica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.

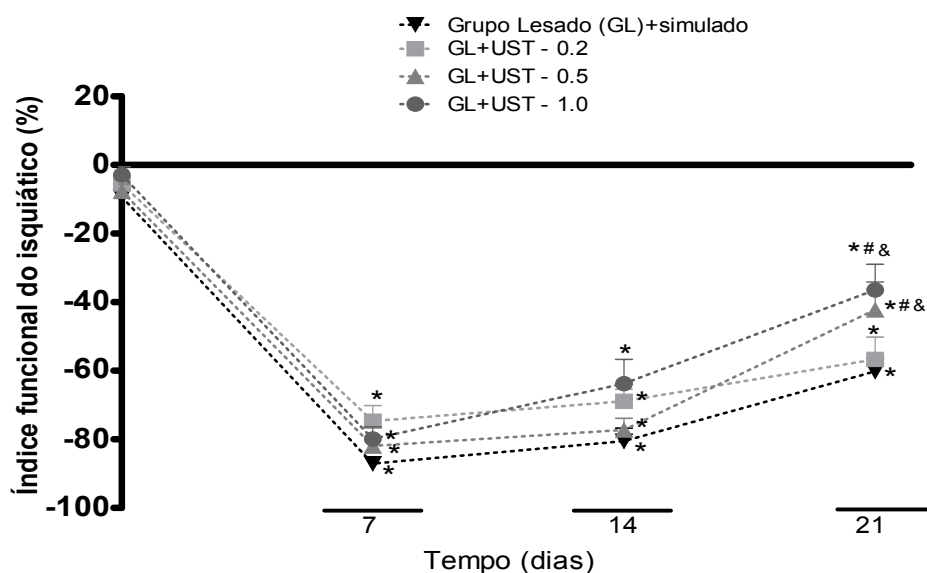


O limiar nociceptivo foi avaliado pelo teste plantar e está expresso em latência (segundos - s). As medidas foram realizadas antes (tempo zero) e diariamente, durante 21 dias após o pinçamento do nervo isquiático. O tratamento com UST teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias consecutivos. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo GL+simulado; & $p < 0,02$ por comparação com o grupo UST-0.2; \$ $p < 0,05$ por comparação com o grupo UST-0.5.

4.5.2 Efeito do tratamento com ultrassom terapêutico sobre o índice funcional do isquiático (IFC) de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático

Os animais tratados com UST 1.0 apresentaram inibição parcial, mas significativa, das alterações funcionais. Essa inibição foi detectada no 21º dia do período pós-operatório. Para as demais doses do UST, não foram observadas diferenças significativas do IFC, quando comparado ao grupo GL+simulado (Figura 29).

Figura 29 - Efeito do tratamento com UST sobre o índice funcional de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático.



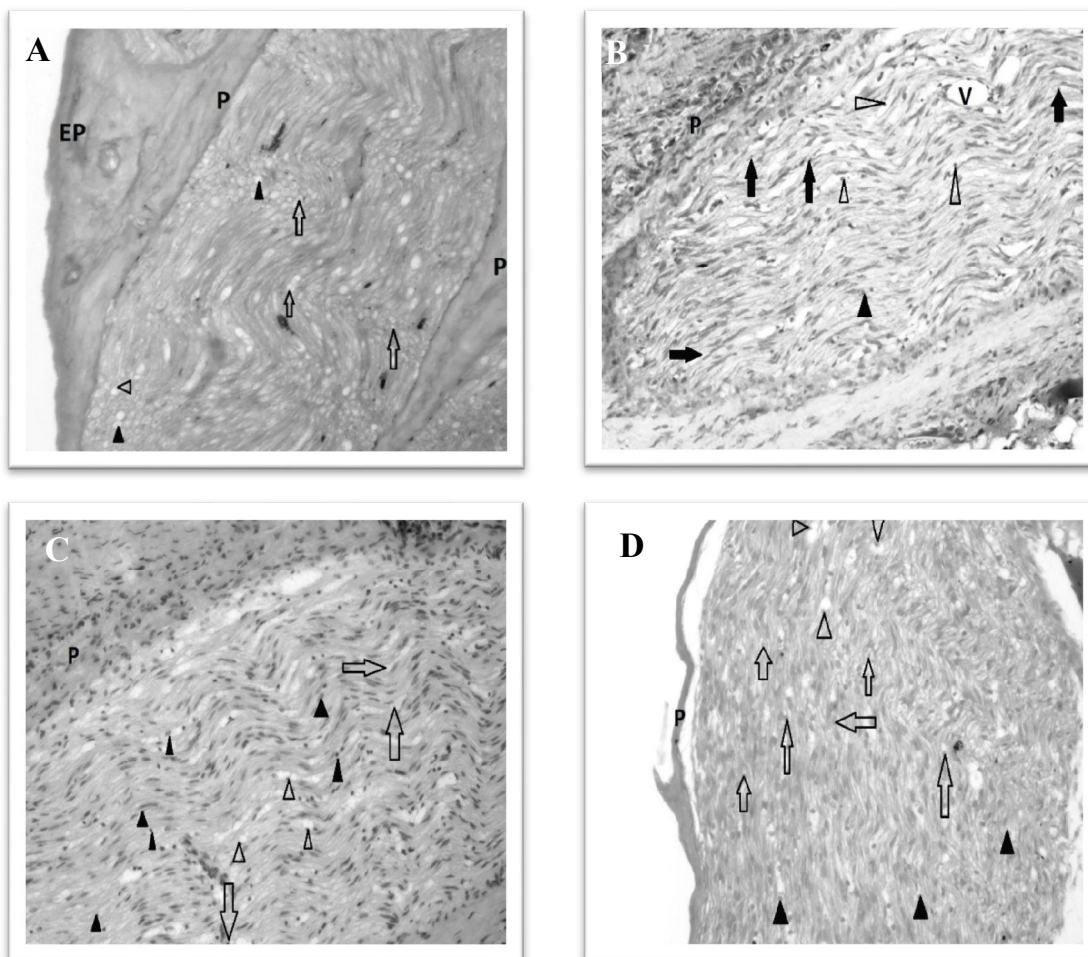
Para a avaliação funcional foi utilizado o índice funcional do isquiático (IFC). O resultado obtido expressa um percentual negativo da função normal, em que 0 (zero) corresponde à função normal, ou ausência de deficiência, e -100 (menos cem) corresponde à disfunção total. O tratamento com UST teve início 24 horas após o esmagamento do nervo isquiático, perdurando por 21 dias consecutivos. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o GL+simulado; & $p < 0,02$ por comparação com o grupo UST-0.2; \$ $p < 0,05$ por comparação com o grupo UST-0.5.

4.5.3 Efeito do tratamento com UST sobre as alterações histológicas causadas pelo pinçamento do nervo isquiático Análise histológica do nervo isquiático após tratamento com UST

Nossos resultados estão apresentados tendo como base o estudo da morfologia da parte distal do coto proximal ao pinçamento do nervo isquiático, devidamente localizado pelo fio de sutura.

O nervo isquiático dos animais que foram tratados com UST apresentou distribuição regular de fibras mielínicas de diferentes diâmetros, havendo proporcionalidade entre o tamanho de fibras e a espessura da bainha de mielina (Figura 30 –B,C,D). Por outro lado, no grupo lesado+simulado, observou-se diminuição do tamanho das fibras mielínicas e também alteração no formato das fibras nervosas, indicando processo degenerativo (figura 30 – A).

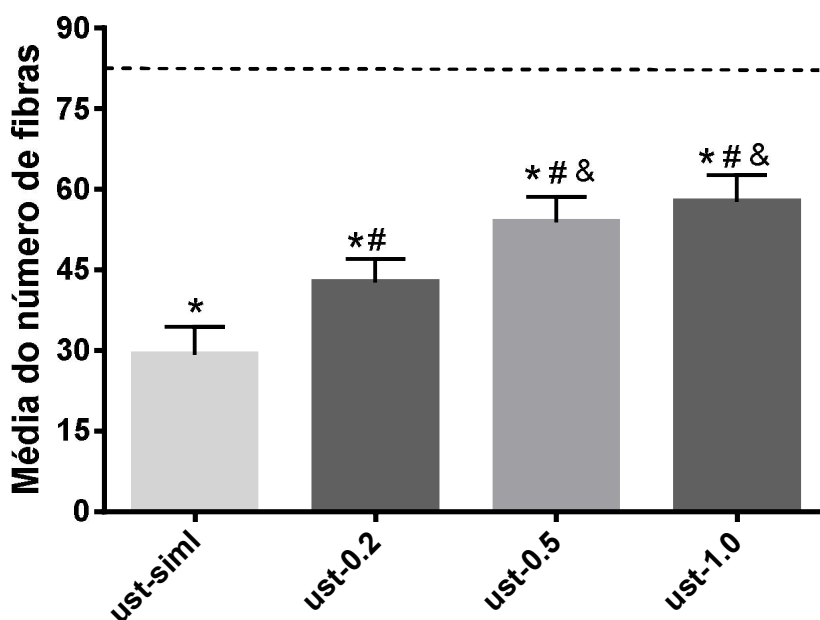
Figura 30 - Fotomicrografia do nervo isquiático de animais tratados com UST e simulado.



Fotomicrografia de cortes semifinos de nervo isquiático, corados com eosina-hematoxilina e transformadas em imagens de 32-bit. A) Fibras do coto proximal do nervo de um animal do grupo simulado em secção transversal, observar a irregularidade da disposição das fibras. B) Fibras do coto proximal do nervo de um animal do grupo UST-0.2, em secção transversal. C) Fibras do coto proximal do nervo de um animal do grupo UST-0.5, em secção transversal. D) Fibras do coto proximal do nervo de um animal do grupo UST-1.0, em secção transversal. Observar a regularidade da disposição e quantidade das fibras (BCD) após o tratamento com UST. Os tratamentos tiveram início no 1º dia pós-operatório perdurando 21 dias consecutivos. No 21º dia pós-operatório foi realizada a eutanásia e o nervo isquiático foi dissecado para a obtenção do tecido. Aumento 100 X. EP: Epineuro; P: Perineuro; V: Vaso; Seta: fibras mielinizadas; Cabeça de seta cheia: axônio; Cabeça de seta vazia: núcleo da célula de Schwann

A análise dos resultados mostrou que o tratamento com UST acarreta aumento significativo do número de fibras mielínicas, em comparação com o grupo GL + simulado (Figura 31). Os grupos que receberam UST - 0.5 e 1.0 apresentaram aumento significativo do número de fibras em relação ao UST-0.2. Para todos os tratamentos, a reversão foi parcial, uma vez que houve diferença significativa no número de fibras mielinizadas, em comparação com o grupo Naive (Figura 31).

Figura 31 - Representação gráfica do efeito do tratamento com UST sobre o número de fibras mielínicas.



Para análise morfométrica, foram fotografados cinco campos aleatórios da imagem. Para isso utilizamos um recurso do programa que gera uma grade, com linhas horizontais e verticais, formando quadrados de forma homogênea. As fibras mielinizadas individuais foram indicadas pelo cursor, contadas automaticamente e foi então calculado um valor médio de cinco cortes de cada segmento do nervo. A linha pontilhada representa a média do número de fibras do grupo Naive (controle). Os tratamentos tiveram início no 1º dia pós-operatório, perdurando por 21 dias consecutivos. No 21º dia do pós-operatório foi realizada a eutanásia e o nervo isquiático foi dissecado para a obtenção do tecido. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Naive; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo Simulado; & $p < 0,05$ em comparação ao grupo UST - 0.2. siml: tratamento simulado.

4.6 Definições dos parâmetros do Laser de baixa potência

Os grupos experimentais descritos a seguir foram tratados com o *LASER* de baixa potência, em dias intercalados (dia sim, dia não). O tratamento foi iniciado 24 horas após o procedimento cirúrgico e persistiu até o 21º dia do período pós-operatório. Os animais foram submetidos aos testes nociceptivos e a avaliação funcional, no 7º, 14º e 21º dias após a cirurgia. Como controle, o grupo Lesado foi submetido ao processo de contensão manual para o tratamento com o LBP, porém o aparelho foi mantido desligado (simulando um tratamento).

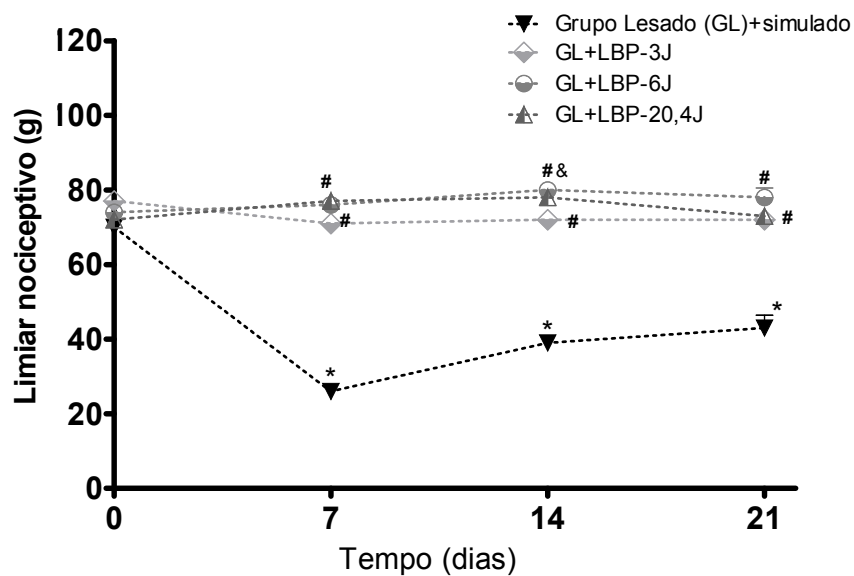
4.6.1 Efeito do *LASER* de baixa potência nos fenômenos nociceptivos induzidos pela lesão do nervo isquiático

4.6.1.1 Efeito sobre a hiperalgesia mecânica

O pinçamento do nervo acarretou diminuição significativa do limiar nociceptivo dos animais (grupo GL+simulado), quando comparado com a medida inicial (tempo 0), caracterizando o fenômeno de hiperalgesia. Esse fenômeno foi detectado durante todo o período de observação (Figura 32).

O tratamento com o LBP reverteu, durante todo o período de observação, a hiperalgesia mecânica induzida pelo pinçamento do nevo. Foi observada diferença significativa dos grupos LBP-6J e LBP-20,4J quando comparado ao grupo LBP-3 J, no 14º dia do período pós-operatório (Figura 32).

Figura 32 - Efeito do Laser de baixa potência sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.



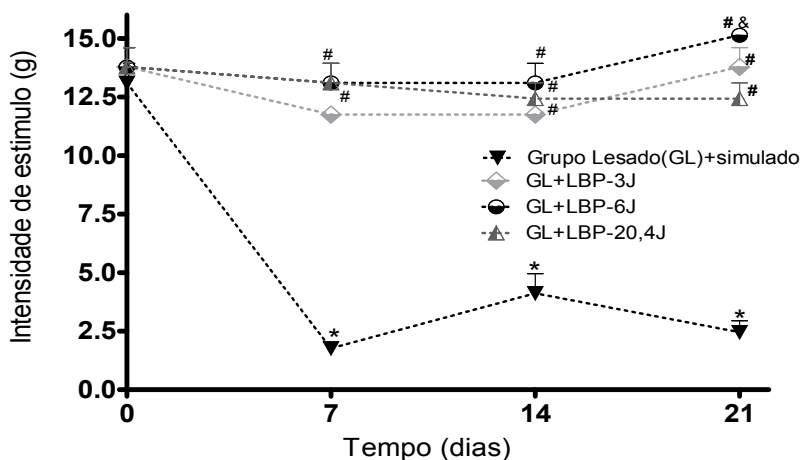
O limiar nociceptivo, avaliado pelo teste de pressão de pata e expresso em gramas (g), foi determinado antes (tempo zero) e 7, 14 e 21 dias após o pinçamento do nervo isquiático. O tratamento com LBP teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, foi realizado em dias intercalados, e perdurou até o 21º dia do período pós-operatório. Os resultados representam a média e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo GL+simulado; & por comparação com o grupo LBP-3 J.

4.6.1.2 Efeito sobre a alodinia mecânica

O pinçamento do nervo acarretou diminuição na intensidade do estímulo tátil necessário para induzir a resposta da retirada da pata, quando comparado com a medida inicial (basal), caracterizando o fenômeno de alodinia. Esse fenômeno persistiu até o 21º dia pós-operatório (Figura 33).

O tratamento com o LBP reverteu, durante todo o período de observação, a alodinia mecânica induzida pelo pinçamento do nevo. Em relação à dosimetria, houve diferença significativa entre os grupos LBP-6 J e LBP-20,4 J, no 21º dia do pós-operatório (Figura 33).

Figura 33 - Efeito do Laser de baixa potência sobre a alodinia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.



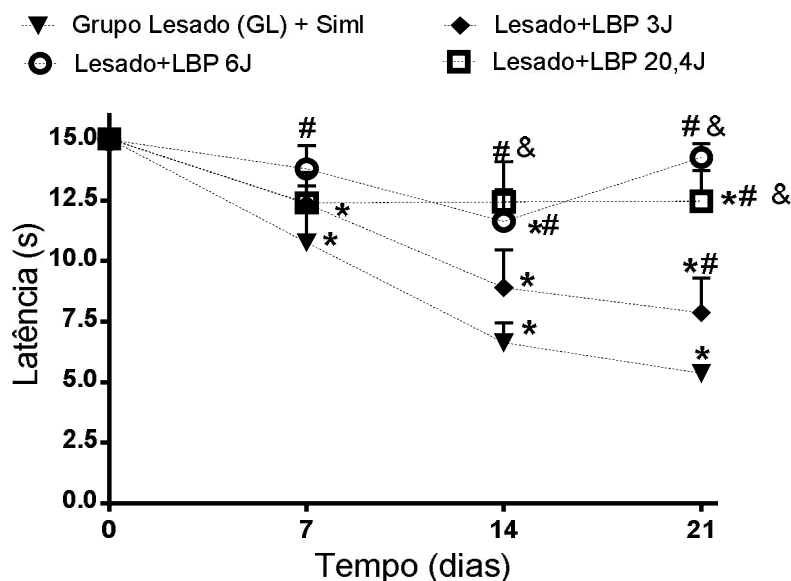
O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo (em gramas - g) necessária para induzir a retirada da pata. As medidas foram realizadas antes (basal) e 7, 14 e 21 dias após o pinçamento do nervo isquiático. O tratamento com LBP teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, foi realizado em dias intercalados, e perdurou até o 21º dia do período pós-operatório. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o GL+simulado; & $p < 0,02$ por comparação com o grupo LBP -20,4 J.

4.6.1.3 Efeito sobre a hiperalgesia térmica

Os animais submetidos à cirurgia apresentaram, durante todo o período de observação, diminuição significativa da latência de resposta ao estímulo térmico, em relação à medida basal, evidenciando o fenômeno de hiperalgesia térmica (Figura 34).

O tratamento com LBP – 3J não interferiu significativamente com a hiperalgesia térmica, quando comparado ao grupo GL+simulado. Por outro lado, os animais tratados com LBP – 6 J e LBP – 20,4 J apresentaram aumento significativo do limiar nociceptivo, em todo o período de observação, quando comparado ao grupo GL+simulado. Para o grupo LBP – 6 J, houve reversão total do fenômeno de hiperalgesia, uma vez que não foram detectadas diferenças significativas em relação ao valor basal, em todo o período de observação (Figura 34).

Figura 34 - Efeito do tratamento com laser de baixa potência sobre a hiperalgesia térmica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.



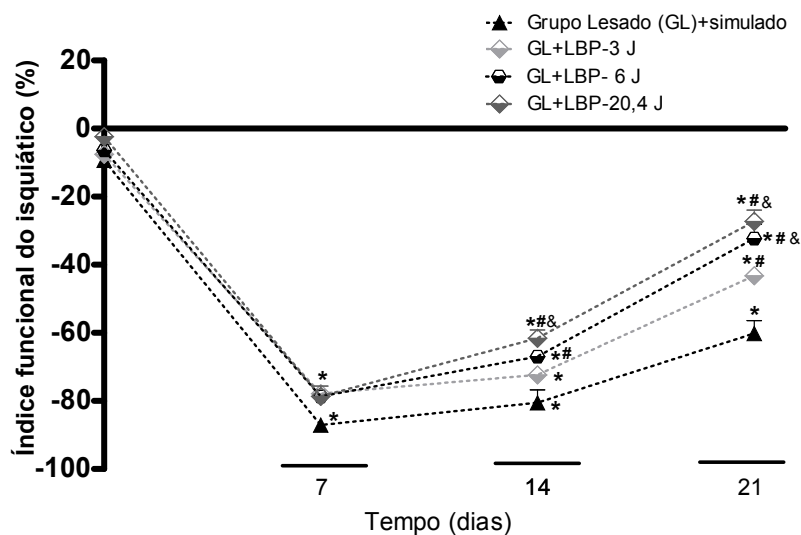
O limiar nociceptivo foi avaliado pelo teste plantar e está expresso em latência (segundos - s). As medidas foram realizadas antes (tempo zero) e diariamente, durante 21 dias após o pinçamento do nervo isquiático. O tratamento com LBP teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias intercalados. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo GL+simulado; & $p < 0,05$ por comparação com o grupo LBP – 3J.

4.6.2 Efeito do laser de baixa potência sobre as alterações do índice funcional do isquiático (IFC)

Os animais tratados com LBP-6 J e LBP-20,4 J apresentaram inibição parcial, mas significativa, em relação ao GL+simulado, das alterações funcionais causadas pelo pinçamento do nervo isquiático. Essa inibição foi detectada a partir do 14º dia do período pós-operatório. No 21º dia, todos os grupos tratados com LBP apresentaram diminuição parcial, mas significativa, das alterações funcionais (Figura 35).

Em relação à dosimetria, houve diferença significativa entre os grupos LBP-3 J e LBP-6J (no 21º dia) e entre os grupos LBP-3 J e LBP-20,4 J, no 14º e 21º dias (Figura 35).

Figura 35 - Efeito do laser de baixa potência sobre a alteração do índice funcional de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático



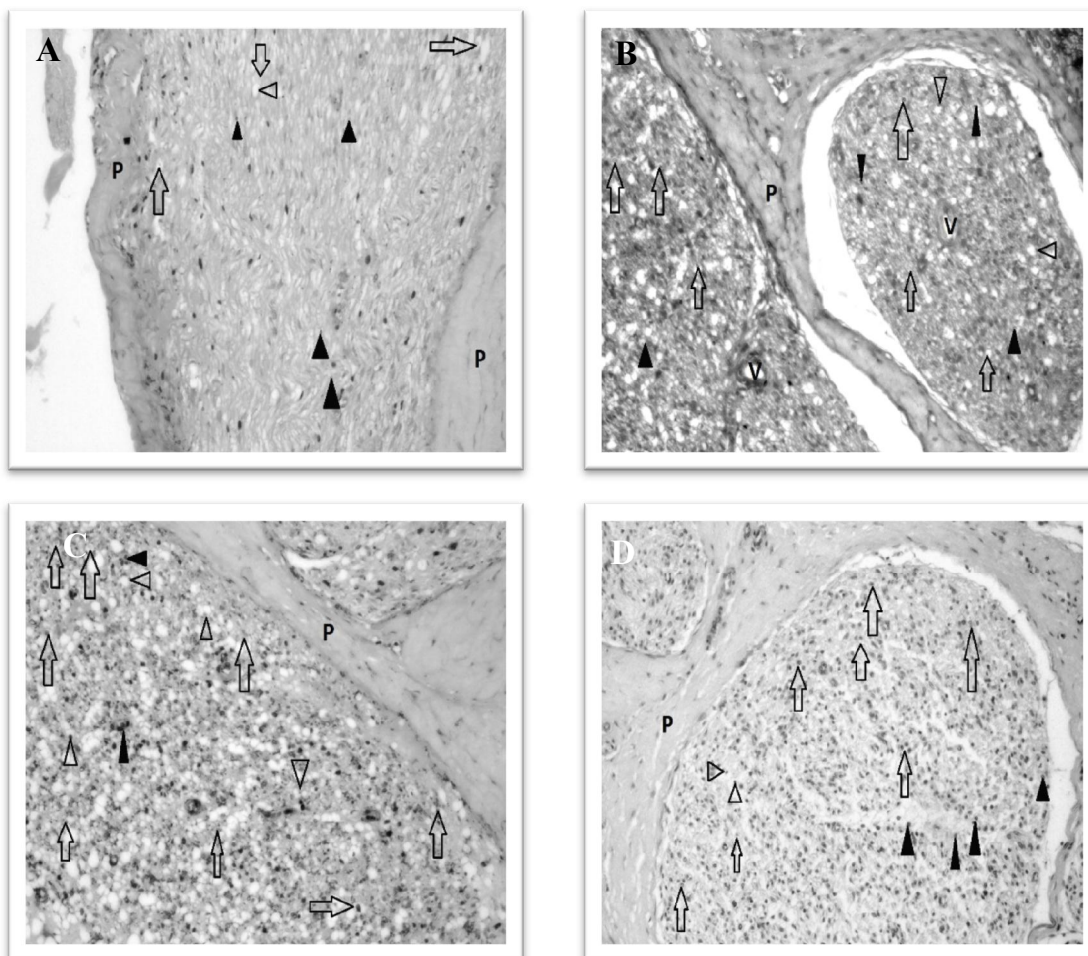
Para a avaliação funcional foi utilizado o índice funcional do isquiático (IFC). O resultado obtido expressa um percentual negativo da função normal, em que 0 (zero) corresponde à função normal, ou ausência de deficiência, e -100 (menos cem) corresponde à disfunção total. O tratamento com LBP teve início 24 horas após o pinçamento do nervo isquiático, foi realizado em dias intercalados, e perdurou até o 21º dia do período pós-operatório. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o GL+lesado; & $p < 0,02$ por comparação com o grupo LBP-3 J.

4.6.3 Efeito do tratamento com o LBP sobre as alterações histológicas induzidas pelo pinçamento do nervo isquiático.

Nossos resultados estão apresentados tendo como base o estudo da morfologia da parte distal do coto proximal ao pinçamento do nervo isquiático, devidamente localizado pelo fio de sutura.

Os animais dos grupos tratados com LBP apresentaram distribuição regular de fibras mielínicas de diferentes diâmetros, havendo proporcionalidade entre o tamanho de fibras e a espessura da bainha de mielina (Figura 36 – B,C,D). Por outro lado, no grupo lesado+simulado, observou-se diminuição do tamanho das fibras mielínicas e também alteração no formato das fibras nervosas, indicando processo degenerativo (figura 36 – A).

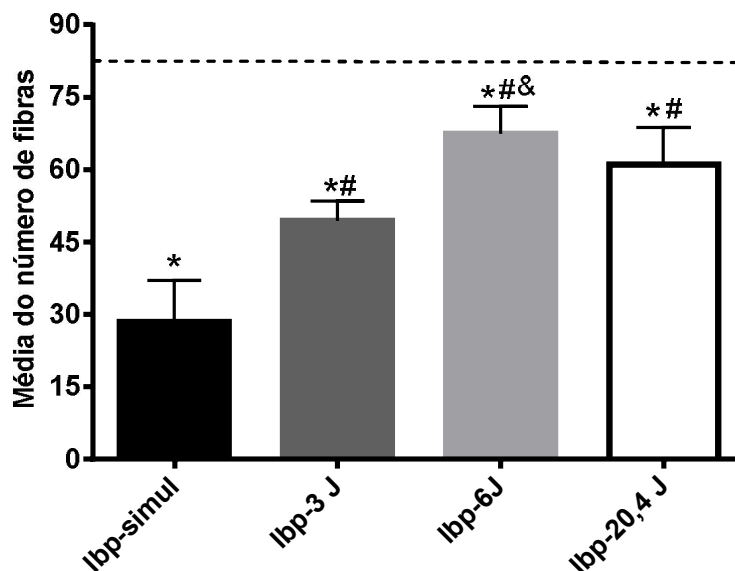
Figura 36 - Efeito do tratamento com LBP sobre as alterações histológicas causadas pelo pinçamento do nervo isquiático.



Fotomicrografia de cortes semifinos de nervo isquiático, corados com eosina-hematoxilina e transformadas em imagens de 32-bit. A) Fibras do coto proximal do nervo de um animal do grupo lesado+ simulado em secção transversal. Observar a irregularidade da disposição das fibras. B) Fibras do coto proximal do nervo de um animal do grupo LBP – 3 J em secção transversal. C) Fibras do coto proximal do nervo de um animal do grupo LBP – 6J, em secção transversal. D) Fibras do coto proximal do nervo de um animal do grupo LBP – 20,4 J em secção transversal. Observar a regularidade da disposição e quantidade de fibras (BCD) após o tratamento com LBP. Os tratamentos tiveram início no 1º dia pós-operatório, em dias intercalados, durante 21 dias. No 21º dia do pós-operatório foi realizada a eutanásia e o nervo isquiático foi dissecado para a obtenção do tecido. Aumento 100 X. P: Perineuro; V: Vaso; Seta: fibras mielinizadas; Cabeça de seta cheia: axônio; Cabeça de seta vazia: núcleo da célula de Schwann.

Os grupos que receberam LBP - 0.5 e 1.0 apresentaram aumento significativo do número de fibras em relação ao LBP-0.2. Para todos os tratamentos, a reversão foi parcial, uma vez que houve diferença significativa no número de fibras mielinizadas, em comparação com o grupo Naive (Figura 37).

Figura 37 - Representação gráfica do efeito do tratamento com LBP sobre o número de fibras mielínicas.



Para análise morfométrica, foram fotografados cinco campos aleatórios da imagem. Para isso utilizamos um recurso do programa que gera uma grade, com linhas horizontais e verticais, formando quadrados de forma homogênea. As fibras mielinizadas individuais foram indicadas pelo cursor, contadas automaticamente e foi então calculado um valor médio de cinco cortes de cada segmento do nervo. A linha pontilhada representa a média do número de fibras do grupo Naive (controle). Os tratamentos tiveram início no 1º dia do pós-operatório, em dias intercalados, durante perdurando 21 dias. No 21º dia do pós-operatório foi realizada a eutanásia e o nervo isquiático foi dissecado para a obtenção do tecido. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Naive; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo Simulado; & $p < 0,05$ em comparação ao grupo LBP - 3J. simul: tratamento simulado.

4.7 Efeito da associação do Ultrassom terapêutico e Laser de baixa potência sobre os fenômenos nociceptivos e as alterações funcionais causadas pelo pinçamento do nervo

Os grupos experimentais descritos a seguir foram tratados com o Ultrassom terapêutico (1.0 W/cm², 21 dias consecutivos a partir do 1º dias pós-operatório) e Laser de baixa potência (6 J, 21 dias intercalados a partir do 1º dia pós operatório). Os animais foram submetidos aos testes nociceptivos e à avaliação funcional, no 7º, 14º 21º dias após a cirurgia.

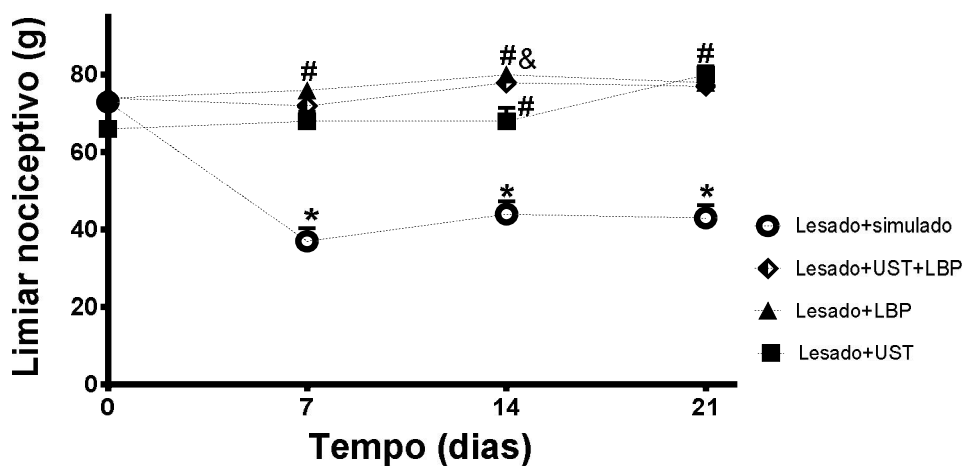
4.7.1 Efeitos da associação do UST e LBP nos fenômenos nociceptivos induzidos pela lesão do nervo isquiático

4.7.1.1 Efeito sobre a hiperalgesia mecânica

O pinçamento do nervo acarretou diminuição significativa do limiar nociceptivo dos animais (grupo GL+simulado), quando comparado com a medida inicial (basal), caracterizando o fenômeno de hiperalgesia. Esse fenômeno foi detectado durante todo o período de observação (Figura 38).

O tratamento associado UST+LBP, bem como o tratamento de cada um dos recursos terapêuticos, administrados isoladamente, reverteram, durante todo o período de observação, a hiperalgesia mecânica induzida pelo pinçamento do nevo (Figura 38).

Figura 38 - Efeito da associação do UST+LBP sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.



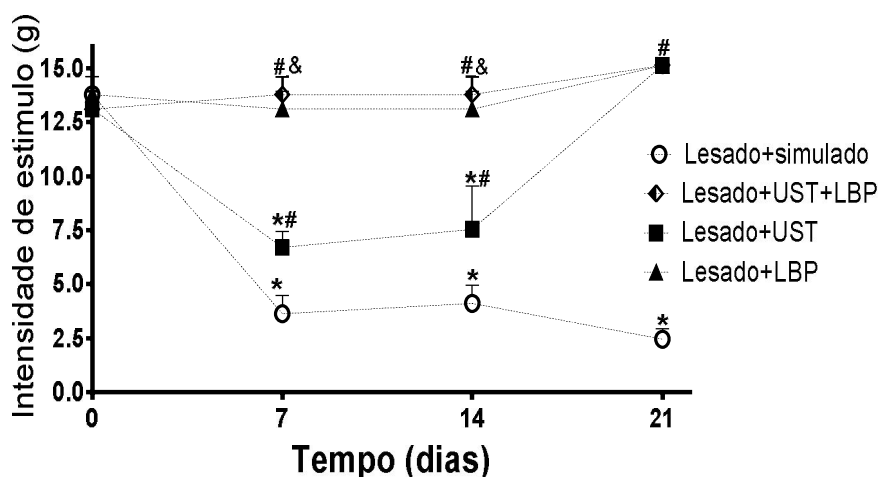
O limiar nociceptivo, avaliado pelo teste de pressão de pata e expresso em gramas (g), foi determinado antes (tempo zero) e 7, 14 e 21 dias após o pinçamento do nervo isquiático. O tratamento com UST teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias consecutivos. O tratamento com LBP teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, foi realizado em dias intercalados, e perdurou até o 21º dia do período pós-operatório. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo Lesado+simulado; & $p < 0,05$ por comparação com o grupo UST.

4.7.1.2 Efeito sobre a alodinia mecânica

O pinçamento do nervo acarretou diminuição na intensidade do estímulo tátil necessário para induzir a resposta da retirada da pata, quando comparado com a medida inicial (basal), caracterizando o fenômeno de alodinia. Esse fenômeno persistiu até o 21º dia pós-operatório (Figura 39).

O tratamento associado UST+LBP reverteu, durante todo o período de observação, a alodinia mecânica induzida pelo pinçamento do nevo. O mesmo foi observado para os animais tratados com o LBP. Para o grupo UST, a reversão total desse fenômeno ocorreu apenas no último dia de avaliação (21º dia pós-operatório).

Figura 39 - Efeito do tratamento associado UST+LBP sobre a alodinia mecânica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.



O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo (em gramas - g) necessária para induzir a retirada da pata. As medidas foram realizadas antes (basal) e 7, 14 e 21 dias após o pinçamento do nervo isquiático. O tratamento com UST teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias consecutivos. O tratamento com LBP teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, foi realizado em dias intercalados, e perdurou até o 21º dia do período pós-operatório. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo Lesado+simulado; & $p < 0,05$ por comparação com o grupo UST.

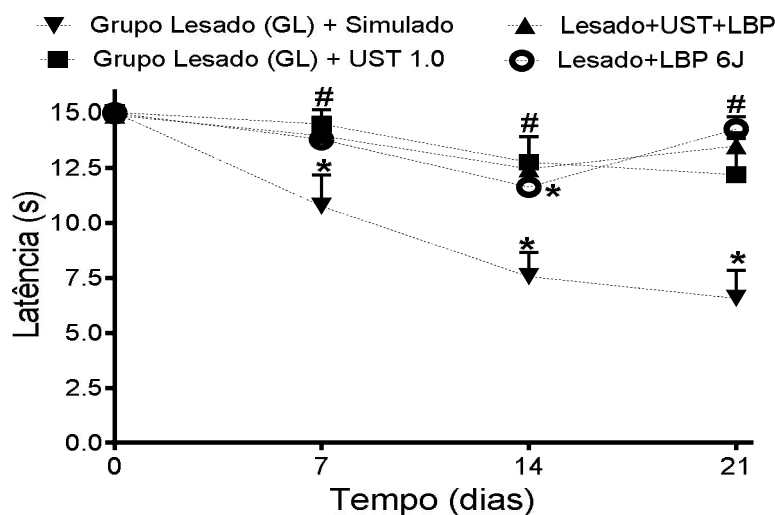
4.7.1.3 Efeito sobre a hiperalgesia térmica

Os animais submetidos à cirurgia apresentaram, durante todo o período de observação, diminuição significativa da latência de resposta ao estímulo térmico, em relação à medida basal, evidenciando o fenômeno de hiperalgesia térmica (Figura 40).

O tratamento associado UST+LBP e o tratamento com o UST reverteram, durante todo o período de observação, a hiperalgesia térmica, quando comparado com o grupo Lesado+simulado. Para o grupo LBP, a reversão total desse fenômeno ocorreu apenas no 7º e 21º dias da avaliação (Figura 40).

Em comparação com a aplicação isolada de cada um dos recursos físicos, o efeito do tratamento associado UST + LBP não foi estatisticamente diferente (Figura 40).

Figura 40 - Efeito do tratamento associado UST+LBP sobre a hiperalgesia térmica induzida pela lesão do nervo isquiático de ratos.

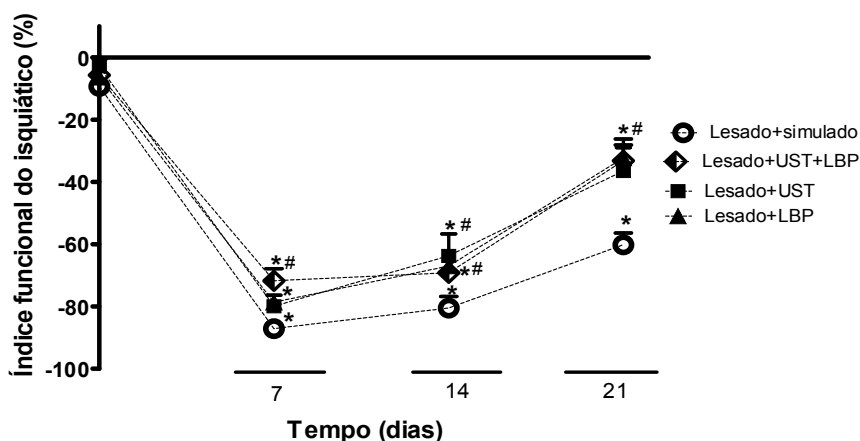


O limiar nociceptivo, avaliado pelo teste plantar e expresso em latência (segundos), as medidas foram realizadas antes (tempo zero), e diariamente após o pinçamento do nervo isquiático. O tratamento com UST teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias consecutivos. O tratamento com LBP teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, foi realizado em dias intercalados, e perdurou até o 21º dia do período pós-operatório. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo lesado+simulado.

4.7.2 Efeito da associação do UST + LBP sobre as alterações do índice funcional do isquiático (IFC)

Os animais tratados com UST+LBP apresentaram reversão parcial, mas significativa das alterações do IFC causadas pelo pinçamento do nervo isquiático, em todo o período de observação. Contudo, essa reversão não foi significativamente diferente daquela observada para os tratamentos administrados individualmente (Figura 41).

Figura 41 - Efeito do Laser de baixa potência sobre a alteração do índice funcional de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático.



Para a avaliação funcional foi utilizado o índice funcional do isquiático (IFC). O resultado obtido expressa um percentual negativo da função normal, em que 0 (zero) corresponde à função normal, ou ausência de deficiência, e -100 (menos cem) corresponde à disfunção total. O tratamento com UST teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias consecutivos. O tratamento com LBP teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, foi realizado em dias intercalados, e perdurou até o 21º dia do período pós-operatório. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo lesado+simulado;

4.8 Análise do envolvimento de opióides endógenos nos efeitos causados pelo UST e/ou LBP

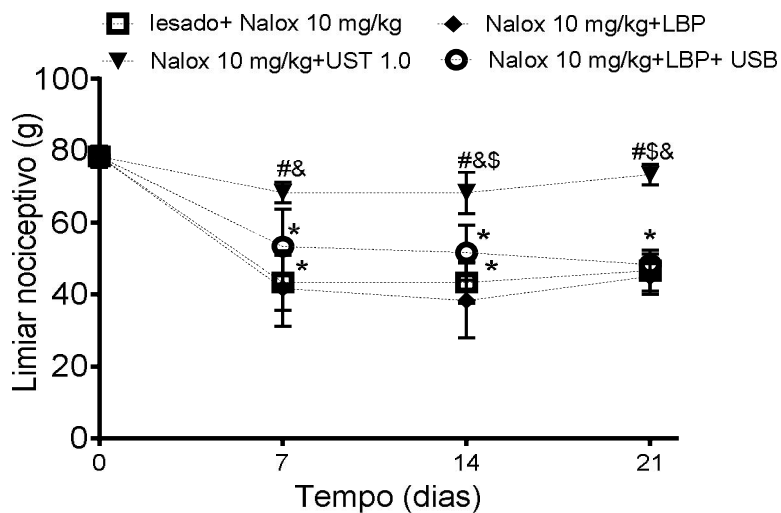
Para avaliar o envolvimento de opióides endógenos nos efeitos acarretados pelo tratamento com UST e LBP, foi utilizada naloxona (10 mg/kg, s.c.), um antagonista de receptores opióides. Essa dose foi testada, em estudo piloto, e não inferiu, per se, no limiar nociceptivo de ratos naïve.

4.8.1 Fenômenos nociceptivos

4.8.1.1 Hiperalgisia mecânica

A administração de naloxona não interferiu, per se, com a hiperalgisia mecânica induzida pelo pinçamento do nervo isquiático durante todo o período de observação (Figura 42). A administração de naloxona reverteu o efeito anti-hiperalgésico do LBP e inibiu parcialmente a antinocicepção causada pela associação do UST e LBP. Por outro lado, o antagonista opióide não interferiu com a ação anti-hiperalgésica do UST (Figura 42).

Figura 42 - Envolvimento de opióides endógenos no efeito anti-hiperalgésico do UST e/ou LBP



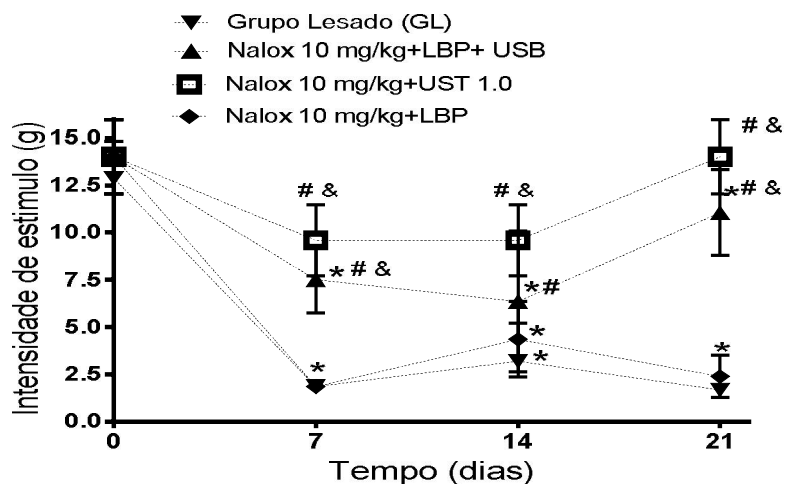
O limiar nociceptivo, avaliado pelo teste de pressão de pata e expresso em gramas (g), foi determinado antes (tempo zero) e 7, 14 e 21 dias após a lesão. O tratamento com UST teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias consecutivos. O tratamento com LBP teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, foi realizado em dias intercalados, e perdurou até o 21º dia do período pós-operatório. Naloxona (Nalox) 10 mg/kg, s.c, administrada 30 minutos antes das avaliações. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo Lesado+nalox; & $p < 0,05$ por comparação com o grupo LBP; \$ $p < 0,05$ por comparação com o grupo UST+LBP.

4.8.1.2 Alodinia mecânica

A administração de naloxona não interferiu, per se, com a alodinia mecânica induzida pelo pinçamento do nervo isquiático (Figura 43).

A administração de naloxona reverteu o efeito anti-alodínico do LBP e inibiu parcialmente o efeito do tratamento associado UST+LBP. Por outro lado, o antagonista opióide não interferiu com o efeito anti-alodínico causado pelo UST (Figura 43).

Figura 43 - Envolvimento de receptores opióides no feito anti-alodínico do UST e/ou LBP.



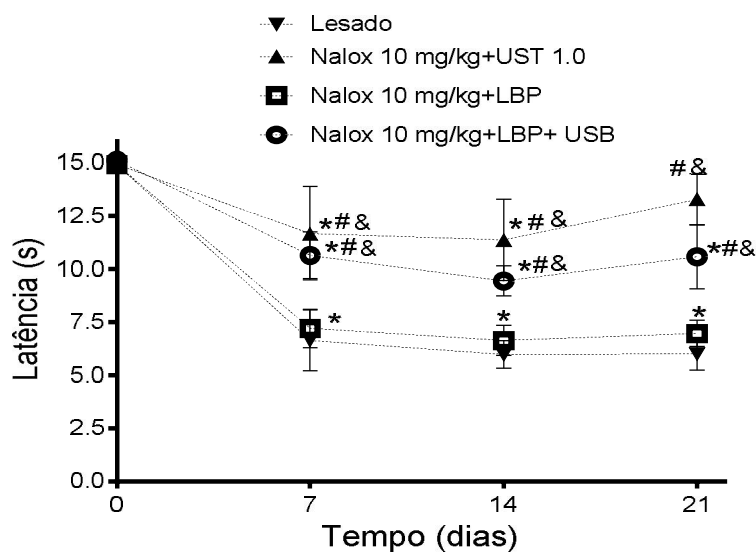
O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo (em gramas - g) necessária para induzir a retirada da pata. As medidas foram realizadas antes (basal) e 7, 14 e 21 dias após o pinçamento do nervo isquiático. O tratamento com UST teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias consecutivos. O tratamento com LBP teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, foi realizado em dias intercalados, e perdurou até o 21º dia do período pós-operatório. Naloxona (Nalox) 10 mg/kg, s.c, administrada 30 minutos antes das avaliações. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo Lesado+nalox; & $p < 0,05$ por comparação com o grupo LBP.

4.8.1.3 Hiperálgia térmica

A administração de naloxona não interferiu, per se, com a hiperálgia térmica induzida pelo pinçamento do nervo isquiático (Figura 44).

A administração de naloxona reverteu o efeito anti-hiperálgico do LBP e inibiu parcialmente o efeito do tratamento associado UST+LBP. Por outro lado, o antagonista opióide não foi capaz de inibir o efeito anti-hiperálgico causado pelo o tratamento com UST (Figura 44).

Figura 44 - Envolvimento de receptores opióides no efeito anti-hiperálgico do UST e/ou LBP

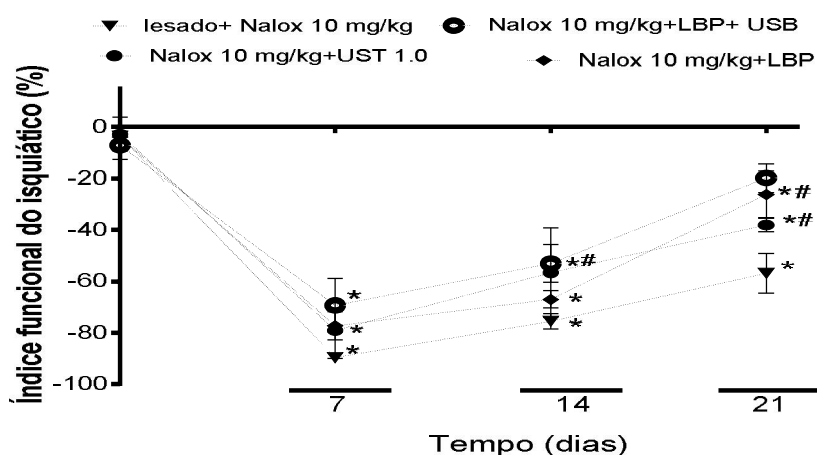


O limiar nociceptivo, avaliado pelo teste plantar, está expresso em latência (segundos - s). As medidas foram realizadas antes (tempo 0) e 7, 14 e 21 dias após o pinçamento do nervo isquiático. O tratamento com UST teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias consecutivos. O tratamento com LBP teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, foi realizado em dias intercalados, e perdurou até o 21º dia do período pós-operatório. Naloxona (Nalox) 10 mg/kg, s.c, administrada 30 minutos antes das avaliações. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo Lesado+nalox; & $p < 0,05$ por comparação com o grupo LBP.

4.8.2 Índice funcional do isquiático (IFC)

A administração de naloxona não interferiu, per se, com o aparecimento das alterações funcionais ou a recuperação dessas alterações. Da mesma forma, o antagonista opióide não alterou o efeito dos tratamentos USB e LBP, administrados isoladamente ou em associação (Figura 45).

Figura 45 - Efeito da naloxona sobre a alteração do índice funcional de ratos submetidos à lesão do nervo isquiático.



Para a avaliação funcional foi utilizado o índice funcional do isquiático (IFC). O resultado obtido expressa um percentual negativo da função normal, em que 0 (zero) corresponde à função normal, ou ausência de deficiência, e -100 (menos cem) corresponde à disfunção total. O tratamento com UST teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, perdurando por 21 dias consecutivos. O tratamento com LBP teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico, foi realizado em dias intercalados, e perdurou até o 21º dia do período pós-operatório. Naloxona (Nalox) 10 mg/kg, s.c, administrada 30 minutos antes das avaliações. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (0); # $p < 0,05$ por comparação com o grupo lesado+nalox

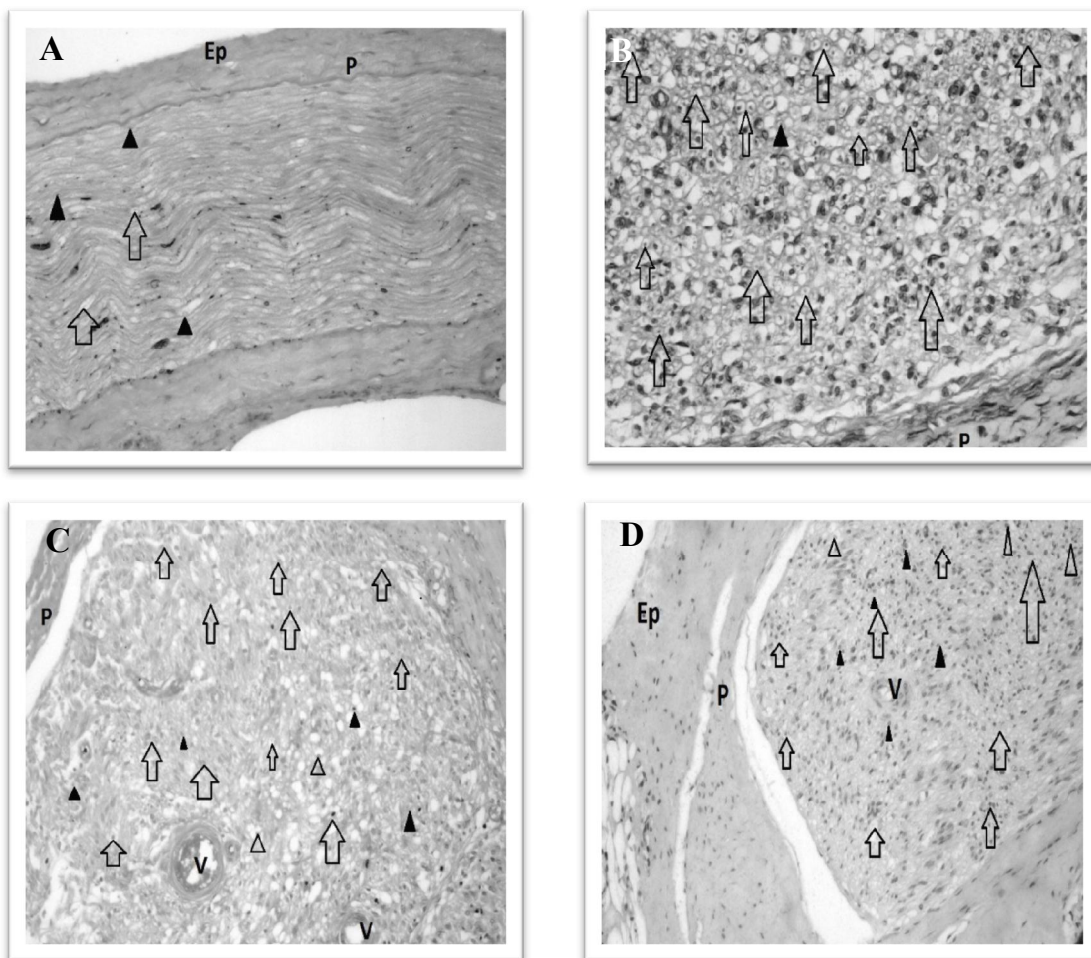
4.9 Efeito da associação UST+LPB sobre as alterações histológicas do nervo isquiático submetido ao pinçamento.

Nossos resultados estão apresentados tendo como base o estudo da morfologia da parte distal do coto proximal ao pinçamento do nervo isquiático, devidamente localizado pelo fio de sutura.

O nervo isquiático dos animais dos grupos tratados com UST associado ao LBP apresentou distribuição regular de fibras mielínicas de diferentes diâmetros, havendo proporcionalidade entre o tamanho de fibras e a espessura da bainha de mielina (Figura 46 – B). A administração de naloxona e salina não interferiu com os efeitos do UST+LBP (Figura 46 – C e D respectivamente).

No grupo lesado+simulado, observou-se diminuição do tamanho das fibras mielínicas e também alteração no formato das fibras nervosas, indicando a permanência de processo degenerativo (figura 46 – A).

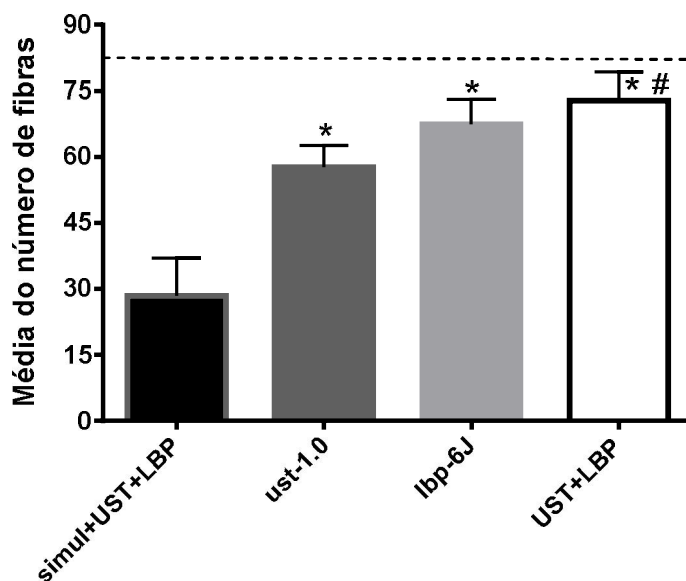
Figura 46 - Fotomicrografia do nervo isquiático de animais tratados com UST+LBP



Fotomicrografia de cortes semifinos de nervo isquiático, corados com eosina-hematoxilina e transformadas em imagem de 32-bit. A) Fibras do coto proximal do nervo de um animal do grupo lesado+simulado em secção transversal. Observar a irregularidade da disposição das fibras. B) Fibras do coto proximal do nervo de um animal do grupo UST+LBP em secção transversal. C) Fibras do coto proximal do nervo de um animal dos grupos UST+LBP+naloxona em corte transversal. D) Fibras do coto proximal do nervo de um animal dos grupos UST+LBP+salina em corte transversal. Observar a regularidade da disposição e quantidade de fibras (BCD) após o tratamento associado. Os tratamentos tiveram início no 1º dia pós-operatório perdurando até o 21º do pós-operatório. O LBP foi aplicado em dias intercalados, e o UST, durante 21 dias consecutivos. Naloxona (Nalox) 10 mg/kg, s.c, administrada 30 minutos antes das avaliações. No 21º dia do pós-operatório foi realizada a eutanásia e o nervo isquiático foi dissecado para a obtenção do tecido. Aumento 100 X. P: Perineuro; V: Vaso; Seta: fibras mielinizadas; Cabeça de seta cheia: axônio; Cabeça de seta vazia: núcleo da célula de Schwann

Os animais tratados com o UST associado ao LBP apresentaram aumento significativo do número de fibras mielinizadas, em relação ao grupo controle. Ainda, foi detectada diferença significativa no número de fibras mielinizadas entre o grupo UST+LBP e o grupo UST (Figura 47).

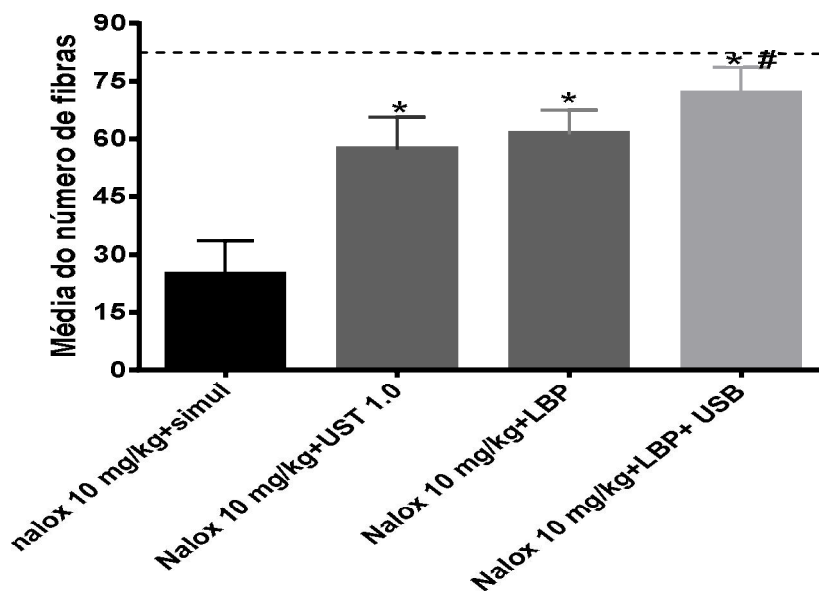
Figura 47 - Representação gráfica do efeito do tratamento com UST+LBP sobre o número de fibras mielínicas.



Para análise morfológica, foram fotografados cinco campos aleatórios da imagem. Para isso utilizamos um recurso do programa que gera uma grade, com linhas horizontais e verticais, formando quadrados de forma homogênea. As fibras mielinizadas individuais foram indicadas pelo cursor, contadas automaticamente e foi então calculado um valor médio de cinco cortes de cada segmento do nervo. A linha pontilhada representa a média do número de fibras do grupo Naive (controle). Os tratamentos tiveram início no 1º dia pós-operatório perdurando até o 21º do pós-operatório. O LBP foi aplicado em dias intercalados, e o UST, durante 21 dias consecutivos. Naloxona (Nalox) 10 mg/kg, s.c, administrada 30 minutos antes das avaliações. No 21º dia do pós-operatório foi realizada a eutanásia e o nervo isquiático foi dissecado para a obtenção do tecido. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Lesado+simulado; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo UST-1.0

A administração previa de naloxona não interferiu com os efeitos dos tratamentos com UST e/ou LBP (Figura 48).

Figura 48 – Efeito da naloxona sobre a contagem de fibras mielínicas dos grupos tratados com UST+LBP.



Para análise morfométrica, foram fotografados cinco campos aleatórios da imagem. Para isso utilizamos um recurso do programa que gera uma grade, com linhas horizontais e verticais, formando quadrados de forma homogênea. As fibras mielinizadas individuais foram indicadas pelo cursor, contadas automaticamente e foi então calculado um valor médio de cinco cortes de cada segmento do nervo. A linha pontilhada representa a média do número de fibras do grupo Naive (controle). * $p < 0,05$ em comparação ao grupo lesado; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo UST 1.0 Os tratamentos tiveram início no 1º dia pós-operatório perdurando até o 21º do pós-operatório. O LBP foi aplicado em dias intercalados, e o UST, durante 21 dias consecutivos. Naloxona (Nalox) 10 mg/kg, s.c, administrada 30 minutos antes das avaliações. No 21º dia do pós-operatório foi realizada a eutanásia e o nervo isquiático foi dissecado para a obtenção do tecido.

5 DISCUSSÃO

O sucesso da recuperação funcional e do controle da dor, na vigência de lesão nervosa, depende de diversos fatores, como a idade, natureza, tipo e extensão da lesão, tipo e diâmetro das fibras nervosas afetadas, distância entre o local da lesão e o corpo celular do neurônio afetado, tempo transcorrido entre a lesão e o início do tratamento e a escolha adequada do tratamento^{6; 84; 85}.

Após a lesão de um nervo periférico, vários eventos complexos são observados. Os fenômenos que ocorrem durante o processo regenerativo, se manifestam de maneira sincronizada e são caracterizados por fagocitose (por macrófagos) dos axônios em degeneração, proliferação das células de Schwann, síntese de fatores de crescimento no coto distal, entre outros. Esses eventos favorecem a formação de um microambiente adequado para o crescimento axonal e para a resposta regenerativa do nervo, após a lesão⁸⁶.

A lesão do tipo axoniotmese, definida como lesão no nervo periférico em que há ruptura da continuidade axonal, com degeneração walleriana distal²⁹, é um modelo considerado ideal em estudos experimentais, pois não há secção total do nervo. Neste tipo de lesão preservam-se os envoltórios conjuntivos, com degeneração completa do axônio e da bainha de mielina no segmento distal à lesão. A preservação dos envoltórios conjuntivos permite o direcionamento adequado dos axônios em crescimento, favorecendo a reinervação⁸⁷. Lesões do tipo axoniotmese são as mais comumente observadas na clínica de fisioterapia e, conseqüentemente, as mais estudadas⁸⁸.

As lesões do tipo axoniotmese são observadas, por exemplo, em modelos experimentais de pinçamento de nervo, como o modelo por nós empregado. A lesão por pinçamento tem a vantagem de não envolver as variáveis detectadas em outros modelos lesão, como, por exemplo, na lesão por secção seguida de sutura¹⁸. Na lesão por pinçamento do nervo, apesar de haver dano ou morte dos axônios distais ao local da lesão, os corpos das células neurais normalmente sobrevivem e os revestimentos do tecido conjuntivo do nervo permanecem intactos. Neste modelo, não há a necessidade de tratamento cirúrgico, pois as bainhas dos tecidos conjuntivos que permanecem intactos, guiam o brotamento dos axônios aos órgãos/tecidos³¹. Cabe ressaltar ainda, que, em decorrência da semelhança anatômica com o nervo isquiático de humanos, modelos experimentais de compressão do nervo isquiático em ratos, como o realizado no presente estudo, vêm sendo utilizados para avaliar a dor neuropática e seu controle, recuperação motora e também a regeneração nervosa⁸⁹.

Mazzer et al. (2006)⁸⁸ observaram, em modelo de pinçamento (cargas de 500 a 15.000 g, 10 minutos, pinça hemostática de Crile) do nervo isquiático de ratos, que a lesão nervosa é diretamente proporcional à carga aplicada e que uma carga de 500 g já induz dano severo⁸⁸. No modelo experimental por nós utilizado, uma carga estática de 5000 g foi aplicada no nervo, por um período de 5 minutos, utilizando uma pinça regulável e calibrada previamente. Esta pinça muito simples, tanto no desenho, como na confecção, foi desenvolvida baseado na técnica descrita por Monte-Raso et al. (2009)⁹⁰. Foi possível, nas nossas condições experimentais, realizar a calibragem da pinça, feita por meio de uma máquina universal de ensaios, que permite a adoção de cargas variando de alguns gramas a quilogramas.

O modelo de pinçamento do nervo, ora empregado, mostrou-se eficaz na indução de manifestações compatíveis com lesão nervosa periférica, uma vez que os animais apresentaram marcante alteração funcional e fenômenos nociceptivos (hiperalgesia mecânica e térmica, além de alodinia mecânica), ambos de longa duração (21 dias). É importante salientar que os fenômenos nociceptivos foram detectados já a partir do 1º dia do pós-operatório (dados não mostrados).

A dor neuropática periférica é mediada por diferentes mecanismos, que ocorrem em diversas áreas do sistema nervoso e em diferentes tempos após a lesão. Assim, a caracterização dos mecanismos envolvidos nesse fenômeno requer a utilização de modelos experimentais que mimetizem, tanto quanto possível, as diferentes alterações fisiopatológicas detectadas nos pacientes⁹¹. A maioria dos modelos experimentais descritos na literatura envolve lesões periféricas traumáticas (lesão constritiva crônica/CCI), metabólicas (causadas, por exemplo, por estreptozotocina, para mimetizar neuropatia diabética) ou tóxicas (causadas, por exemplo, por análogos de glutamato)⁹². A lesão por compressão tem mostrado ser um modelo adequado em estudos experimentais, particularmente em pesquisas sobre a terapêutica da lesão dos nervos periféricos⁸⁸.

Em relação à caracterização da recuperação das lesões nervosas periféricas, diferentes métodos têm sido utilizados, como por exemplo, análises histológicas do tecido afetado eletrofisiologia e a análise funcional do nervo^{3; 93; 94; 95}. Os resultados presentemente obtidos mostraram que, nas nossas condições experimentais, o pinçamento do nervo isquiático acarretou alterações motoras, detectadas pelo índice funcional do isquiático. Foi também detectada recuperação funcional parcial, porém significativa, no 21º dia do período pós-operatório (quando comparado ao 7º dia). Os resultados presentemente descritos corroboram os dados obtidos por Monte-Raso et al. (2009)⁹⁰. Nesse estudo, o IFC foi medido por quatro examinadores distintos, antes e depois da indução de lesão por esmagamento do nervo

isquiático, com carga de 5.000 g. É importante salientar que, nesse estudo, as mediadas não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os avaliadores, sugerindo que o modelo experimental é plenamente reproduzível.

No nosso estudo, as alterações funcionais foram acompanhadas por alterações histopatológicas (diminuição significativa do número de fibras mielínicas e irregularidade da distribuição das fibras), as quais podem ter contribuído para o déficit motor.

A reinervação, em termos de correspondência anatômica e funcional, é um problema chave para a recuperação funcional após lesões dos nervos periféricos. A manutenção de uma distribuição padrão normal dos fascículos distais após a lesão do nervo, é importante para permitir a projeção topográfica precisa de axônios em regeneração⁹⁶. Nesse sentido a regeneração do coto proximal é orientada pelos tubos endoneurais, favorecendo a correta reinervação⁹⁷.

É importante mencionar que, apesar da recuperação funcional, os fenômenos nociceptivos foram detectados durante todo o período de observação (21 dias). Esse fato pode ter contribuído para a recuperação parcial do déficit motor. Tem sido observado que a análise da locomoção serve como um método alternativo para avaliar a nocicepção⁹⁸.

No presente estudo, a padronização de 21 dias de duração do experimento, considerou os resultados obtidos por Gorio et al. (1983)⁹⁹. Estes autores observaram, 10 dias após axoniotmese, ausência de axônios no músculo desnervado de ratos. Contudo, 15 dias após a indução da lesão, os autores observaram que 25% das fibras estavam reinervadas por mais de um axônio e que, entre 21 e 25 dias, a maioria das fibras musculares estava poliinervada. Aos 26 dias da lesão, era evidente a emissão sináptica e, por volta de 90 dias, as junções neuromusculares já estavam recuperadas. Cabe ressaltar que os esses autores utilizaram, como modelo de axoniotmese, a ressecção do nervo periférico no nível de L5, diferentemente do modelo por nós empregado. Nas nossas condições experimentais, observamos diminuição significativa no número de fibras mielínicas no local da lesão, mesmo após os 21 dias.

Como mencionado na Introdução, a reparação funcional e o controle da dor após lesão nervosa, dependem de diversos fatores, incluindo o tipo de conduta terapêutica. Este fato reforça a importância da avaliação de resultados de trabalhos que estudam formas de intervenção terapêutica após lesão do sistema nervoso periférico. Outro fator a ser considerado é a resposta inflamatória. Há relatos sugerindo que essa resposta pode desempenhar papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática decorrente de lesão periférica do nervo^{42; 43}. Assim, no intuito de ampliar a caracterização do nosso modelo experimental, investigamos, no presente estudo, o envolvimento de mediadores

inflamatórios (prostanóides) no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática e disfunção motora. Para esta avaliação, foi utilizada indometacina, inibidor não seletivo da ciclooxigenase, administrada diariamente, 1 h antes das avaliações comportamentais. Esse tratamento reverteu, parcialmente, os fenômenos nociceptivos, até o 7º dia do período pós-operatório. Estes dados sugerem que os prostanóides estão envolvidos na inflamação acarretada pela cirurgia e esmagamento do nervo, contribuindo em parte, para a hiperalgesia mecânica, térmica e alodinia observadas nos períodos iniciais desse processo. Esses resultados corroboram dados obtidos por Gutierrez et al. (2008)⁴⁷, que observaram em modelo de constrição crônica do nervo do nervo isquiático de ratos, que a administração de indometacina inibe a hiperalgesia e alodinia mecânicas até o 7º dia do período pós-operatório⁴⁷. Alguns dados de literatura têm mostrado de que a administração periférica de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) alivia a dor crônica, como a decorrente de neuralgia pós-herpética, distrofia simpático-reflexa e dor neurogênica crônica. No entanto, os AINEs não são atualmente considerados como um tratamento eficaz para causalgia ou outras formas de dor neuropática¹⁰⁰.

Na clínica médica, a terapia farmacológica tem sido a principal forma de tratamento da dor neuropática, sendo alguns anticonvulsivantes, como a carbamazepina e a fenitoína, considerados drogas de primeira escolha. A utilização de fármacos opióides também é indicada para o controle da dor neuropática¹⁰¹. Entretanto, pesquisas por novos tratamentos têm sido conduzidas devido aos efeitos colaterais significativos advindos do uso destes diferentes fármacos, e em alguns casos, à ineficácia do tratamento^{102; 103}.

Em nosso estudo, utilizamos a morfina, o protótipo dos fármacos opióides, para avaliarmos o efeito de drogas analgésicas nesse tipo de dor neuropática. Os resultados mostraram que este opióide é efetivo em inibir os fenômenos nociceptivos decorrentes da lesão nervosa, até o oitavo dia do tratamento. Dados de literatura têm indicado que a eficácia da morfina pode variar, dependendo do modelo experimental de indução de dor neuropática e do tipo de estímulo nocivo aplicado¹⁰⁴. Contudo, nas nossas condições experimentais, não é possível inferir se a perda da eficácia da morfina seja decorrente da progressão da lesão nervosa e/ou do desenvolvimento de tolerância ao efeito antinociceptivo, usualmente detectado após o tratamento prolongado com esse opióide¹⁰⁵. É importante ressaltar que no nosso estudo, os resultados obtidos em um grupo controle adicional, em que animais naïve foram tratados com morfina e avaliados, quanto a o limiar nociceptivo, no teste de pressão da pata, mostraram que a morfina acarretou aumento do limiar, em relação à medida basal, apenas até o 6º dia do tratamento, sugerindo o possível desenvolvimento de tolerância, após

esse período. Contudo, no nosso estudo, não foi avaliada a resposta dos animais à doses maiores de morfina, após esse período, para confirmar o desenvolvimento desse fenômeno.

Em relação às alterações funcionais, os tratamentos farmacológicos (indometacina e morfina) não interferiram com a evolução da recuperação motora nesse modelo experimental. Piesla et al. (2009)⁹⁸, avaliando o efeito de diferentes fármacos analgésicos na alteração da marcha e na hiperalgesia em ratos submetidos a diferentes tipos de dor inflamatória ou neuropática, observaram que a indometacina e morfina reduziram a dor e as alterações da marcha causadas pelo processo inflamatório agudo e que a alteração da marcha estava correlacionada com a presença de dor. Por outro lado nos modelos de dor neuropática, o tratamento com gabapentina e duloxetina causaram antinocicepção, mas não interferiram com as alterações na marcha, sugerindo que nestes modelos as alterações locomotoras são decorrentes de alterações no sistema motor⁹⁸.

Adicionalmente às abordagens farmacológicas, recursos físicos vêm sendo utilizados para o tratamento de lesões de nervos, músculos, pele, ossos, cartilagem. Tem sido evidenciado que esses tratamentos podem acelerar a reparação tecidual nas diferentes fases do processo (inflamação, proliferação e remodelamento tecidual)^{34; 58; 68; 106}. Um desses recursos é o ultrassom terapêutico (UST). Dados de literatura tem mostrado que o UST é capaz de causar antinocicepção, em decorrência de seu efeito mecânico (atérmico). O UST altera o potencial da membrana celular e mecanismos de transporte celular⁵⁸, além de reduzir a expressão de NOS neuronal na medula espinal^{34; 106}. Outro tratamento físico que vem sendo estudado é o Laser de baixa potência. A radiação Laser apresenta efeitos primários (bioquímico, bioelétrico e bioenergético), que ocorrem na célula, promovendo aumento do metabolismo, aumento da proliferação, maturação e locomoção de fibroblastos e linfócitos, incremento da reabsorção de fibrina, aumento da quantidade de tecido de granulação e diminuição da liberação de mediadores inflamatórios, acelerando assim o processo de cicatrização. O reparo tecidual mediado pelo Laser tem sido bastante estudado, porém, com resultados controversos e pouco reprodutíveis, devido à falta de detalhes sobre os parâmetros físicos utilizados nos experimentos. Vários pesquisadores têm mostrado a necessidade da existência de protocolos padronizados e a investigação controlada das alterações observadas^{19; 20; 53}. Cabe ressaltar que, apesar da existência de dados de literatura mostrando o efeito do UST e LBP na recuperação das lesões nervosas, não existem estudos sobre a efetividade da aplicação conjunta do UST e LBP na dor neuropática e nas alterações funcionais decorrentes de lesão nervosa periférica. Uma vez que a avaliação da efetividade do tratamento conjunto desses dois recursos foi um dos nossos objetivos, realizamos inicialmente, a padronização dos

parâmetros mais adequados do UST e do Laser, administrados separadamente, para a recuperação funcional e controle da nocicepção decorrente da lesão por pinçamento do nervo isquiático. A intensidade e tempo de tratamentos utilizados no nosso estudo, estiveram baseados em dados de literatura. Assim, foram propostos três protocolos para cada tipo de recurso físico. Estes protocolos se basearam na capacidade de indução de regeneração nervosa e recuperação funcional, por cada um desses tratamentos.

Nas nossas condições experimentais, foi observada ação antinociceptiva para o UST. Nos testes de avaliação nociceptiva (hiperalgesia mecânica, térmica, e alodinia) aqui empregados, o UST-1.0 acarretou reversão total da hipernocicepção, indicando ser essa dose a mais indicada para o tratamento da dor nesse tipo de lesão. Estes resultados são importantes particularmente pelo fato de que, até o presente momento, não foram encontrados dados na literatura sobre a efetividade do UST no controle da dor decorrente de pinçamento do nervo isquiático. Estes dados sugerem que o ultrassom pode ser um instrumento útil e eficaz no tratamento e controle da dor observada em neuropatias por compressão. Estudos evidenciando o efeito do UST em modelos de dor neuropática utilizam, por exemplo, como modelo de neuropatia aquela causada pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) em ratos. Ciena et al. (2009)³³ compararam duas diferentes dosimetrias de potência (0,5 W/cm² ou 1,0 W/cm²; modo contínuo; com início no terceiro dia pós-operatório, perdurando por 10 dias consecutivos, com o tempo de 5 minutos de aplicação) sobre a nocicepção (tempo de elevação da pata) causada pela CCI. O tratamento com UST inibiu a nocicepção causada por esse tipo de lesão. No grupo tratado foi observada ainda, recuperação funcional mais precoce e eficiente ³³. Resultados semelhantes foram obtidos por Lopes (2006)¹⁰⁷. Esses autores observaram que o UST (frequência 100 Hz, intensidades 0,4 W/cm² e 0,3 W/cm², modo pulsado, aplicado por 2 minutos, por 10 dias consecutivos, iniciando-se o tratamento no 14º dia pós-operatório) reverte a hiperalgesia térmica em ratos submetidos à constrição crônica do nervo infraorbitário (dor neuropática trigeminal). Este efeito não é mediado pela liberação de opióides endógenos, uma vez que não foi revertido pela administração de naloxona, um antagonista de receptores opióides. Os autores sugerem que o UST pode ser um recurso potencialmente útil e eficaz no tratamento da neuralgia do trigêmeo ¹⁰⁷. Esses dados corroboram nossos resultados, uma vez que observamos que o efeito antinociceptivo provocado pelo UST não é mediado pela liberação de opióides endógenos.

Além do efeito sobre a nocicepção causada pelo esmagamento do nervo isquiático, avaliamos também o efeito do UST sobre a regeneração nervosa e recuperação motora. A maioria dos estudos sobre a regeneração dos nervos periféricos emprega métodos

histomorfométricos, histomorfológicos e eletrofisiológicos, os quais podem ser correlacionados com a recuperação funcional correspondente. Nossos resultados mostraram que o UST-1.0, na frequência de 1 MHz, modo pulsado, intensidade 1.0 W/cm², durante 2 minutos, aplicado por 21 dias consecutivos, foi superior aos demais grupos UST, no restabelecimento da função; contudo, esse restabelecimento foi parcial. Da mesma forma, a análise histomorfométrica revelou que no grupo tratado com o UST há regularidade da disposição das fibras, bem como aumento das fibras nervosas mielínicas. Dados de literatura têm mostrado que a recuperação funcional depende do protocolo de tratamento utilizado e o tipo de lesão. Comparando diversas intensidades de UST, Mourad et al. (2000)¹⁷ sugeriram que o melhor protocolo de tratamento, que resultou na aceleração da recuperação funcional, após esmagamento do nervo isquiático, apresentou as seguintes características: intensidade 0,25 W/cm², frequência 2,25 MHz e tempo de aplicação de 1 minuto, por um período de 30 dias, três vezes por semana, a partir do 3º dia pós-operatório. Os resultados mostraram aceleração significativa da recuperação funcional (que foi parcial), no 14º dia após a lesão por pinçamento, enquanto que no grupo sem tratamento, essa recuperação parcial foi observada a partir do 18º dia¹⁷. Crisci et al. (2002)¹⁵, avaliaram os efeitos do UST pulsado após neurotomia do nervo isquiático, por meio de histomorfologia e histomorfometria. Os autores observaram que após 12 dias consecutivos de tratamento, com duração de 20 min, houve rápida regeneração nervosa. Estas observações estão baseadas na contagem de diferentes tipos de componentes de fibra dos nervos mistos e da recuperação morfológica dos mesmos, em comparação com os nervos dos animais controle¹⁰⁸. Em outro estudo experimental sobre a influência do ultrassom terapêutico sobre a regeneração do nervo isquiático submetido à lesão por esmagamento (15.000g durante 10 minutos), os autores avaliaram a recuperação funcional e morfológica, além de correlacionaram os dados do IFC e morfometria. O IFC melhorou progressivamente para ambos os nervos tratados e não tratados, mas de um modo mais acentuado e significativo para os nervos tratados. A densidade de fibras nervosas não retornou ao normal, mas aumentou significativamente nos nervos tratados, com predominância de fibras de pequeno diâmetro e de bainha de mielina típicos da regeneração dos nervos. Os autores concluem que a baixa intensidade do ultrassom terapêutico acelera a regeneração nervosa¹⁸. Chen et al. (2010)⁶⁰, utilizando outros parâmetros do UST (intensidade 0,25 W/cm², frequência 2,25 MHz e tempo de aplicação de 1 minuto, por um período de 30 dias), em modelo de pinçamento do nervo isquiático, obtiveram resultados semelhantes, uma vez que foi detectada recuperação significativa da função, mas a partir da terceira semana pós-tratamento. Recentemente, um estudo pioneiro objetivou analisar em ratos submetidos ao

esmagamento do nervo isquiático, os efeitos de parâmetros alterados da radiação ultrassônica. Após axoniotmese (esmagamento), os animais foram expostos à radiação ultrassônica alterando frequências, intensidades e tempo de exposição. Os resultados do índice funcional do isquiático mostraram a efetividade dos tratamentos na recuperação funcional. Estes autores sugerem ainda que os efeitos não térmicos do ultrassom são superiores aos seus efeitos térmicos¹⁰⁹.

É importante salientar que a literatura tem mostrado também resultados diferentes e conflitantes para o efeito do UST na regeneração nervosa periférica^{18; 33; 60; 110}. Tal fato pode ser explicado pelos diferentes parâmetros utilizados nas aplicações do UST. Há grande dificuldade na padronização dos protocolos experimentais, gerando deficiências metodológicas que tornam difícil determinar parâmetros confiáveis e estabelecer a segurança e a eficácia de um recurso terapêutico. Cabe ressaltar que a eficácia do UST tem sido demonstrada apenas para a regeneração nervosa, havendo poucos estudos sobre o controle da nocicepção.

Outro recurso físico que vem sendo estudado em modelos experimentais de axoniotmese é o laser de baixa potência¹¹¹. Geralmente, a fototerapia é aplicada por via transcutânea no local da lesão, com emissão de luz contínua, comprimentos de onda entre 600 a 904 nm, iniciando-se o tratamento no primeiro dia pós-operatório¹.

Em estudo piloto realizado no início do desenvolvimento do nosso projeto, o tratamento com o LBP foi feito, da mesma forma que para o UST, envolvendo aplicação diária, por 21 dias consecutivos. Contudo, foi observado que a irradiação aplicada todos os dias acarretava alto índice de autofagia/autotomia, agitação e agressividade dos animais. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por Rochkind et al. (2009)¹¹², que também observaram estes fenômenos para o tratamento diário.

Por esse motivo, modificamos o protocolo de tratamento, com aplicações intercaladas (dia sim, dia não).

No presente estudo, utilizamos três doses diferentes do LBP. Este protocolo esteve baseado em dados controversos da literatura indicando que: (a) a exposição prolongada ao laser associada à utilização de equipamentos de alta potência era necessário para obter uma resposta celular adequada ou (b) que um tempo menor de exposição associado a equipamentos de baixa e média potência, acarreta maior absorção do laser, induzindo assim respostas celulares mais satisfatórias¹¹³.

Do mesmo modo que para o UST, procuramos, inicialmente, padronizar os parâmetros mais adequados do Laser para a recuperação funcional e o controle da nocicepção, no nosso modelo de lesão nervosa.

Em relação à recuperação funcional, os resultados mostraram que os grupos tratados com LBP, 6 e 20,4 J, apresentam restabelecimento da função, que foi parcial, mas significativo, no 14º dia pós-cirúrgico. Ainda, ao final do período experimental, foi observada recuperação significativamente superior para o grupo LBP-6 J, quando comparado aos demais grupos, na avaliação histomorfológica.

Estudos realizados por Rochkind et al. (2009)¹¹² evidenciaram que os efeitos do LBP dependem da dose. Estes autores avaliaram, em cultura de fibroblastos, a ação de diferentes comprimentos de onda e de doses de LBP administrados. Os resultados mostraram que o melhor comprimento de onda foi de 630 (em comparação com 360 nm e 780 nm), o qual gerou número maior de mitoses destas células. A maior efetividade foi detectada para a dose 1,5 J. Esses autores observaram que a aplicação de doses baixas promove a regulação da oxirredução do metabolismo celular, enquanto doses elevadas podem causar danos fotodinâmicos¹¹².

No nosso estudo, foi empregado o LBP ArGaAL com comprimento de onda de 830 nm. Nestas condições observamos que a dose de 6 J interferiu com a nocicepção e as alterações histopatológicas.

Uma revisão crítica da literatura mostrou que em 80% dos estudos experimentais de axoniotmese, a laser terapia é efetiva em acarretar regeneração nervosa periférica. Em um estudo mais recente, Andraus et al. (2010)¹ concluíram que o LBP acelera e, provavelmente, potencializa o processo de recuperação do nervo fibular de ratos, no 21º dia após a lesão por pinçamento. No estudo conduzido por esses autores, foi utilizado o mesmo aparelho do nosso estudo, mas com densidade de energia diferente (140 J/cm²)¹. O mesmo foi observado nos estudos realizados por Barbosa et al. (2010)²⁰, Santos et al. (2012)¹¹⁴ e Hsieh et al. (2012)¹¹⁵, utilizando dosagens e aparelhos diferentes. Por outro lado, em estudo realizado por Bagis et al.⁵, não foi detectada nenhuma evidência de melhora na regeneração nervosa, o que pode ser atribuído, entretanto, ao tempo curto de tratamento (7 dias consecutivos).

Em relação aos fenômenos nociceptivos, observamos, no presente estudo, que o LBP causa antinocicepção. Os mecanismos exatos pelos quais o LBP alivia a dor não são ainda totalmente conhecidos. Tem sido demonstrado que a fototerapia aumenta a microcirculação local e sistêmica, reduzindo assim a dor. O aumento do fluxo sanguíneo está associado com a síntese de óxido nítrico (NO) e vários dados de literatura têm mostrado que o NO causa

analgésia¹¹⁶. Outros estudos demonstraram que o LBP modula a síntese de mediadores da inflamação, como por exemplo, reduzindo a síntese/liberação de prostaglandina E2. Além disso, tem sido postulado que a fotoestimulação induz reações fotoquímicas, alterando os gradientes de Ca^{2+} , Na^{+} e K^{+} e assim, reduzindo o limiar de ativação dos nociceptores¹¹⁷.

A aplicação local do LBP promove a liberação periférica de opióides, particularmente de β -endorfina, das células do sistema imunológico¹¹⁸. Baseado nestes dados, avaliamos a possível participação dos opióides endógenos no efeito antinociceptivo do Laser de baixa potência. Os resultados mostraram que a naloxona reverte o efeito do LBP, sugerindo o envolvimento de opióides endógenos nesse efeito. Cabe ressaltar que no presente estudo, não avaliamos quais opióides endógenos estão envolvidos no efeito antinociceptivo do laser. Resultados semelhantes foram observado por Meireles et al. (2012)¹¹⁹, que evidenciaram o envolvimento de opióides endógenos no efeito antinociceptivo do LBP em um modelo experimental de artrite em joelhos de ratos. Por outro lado, estudo realizado por Ferreira et al. (2005)²¹, utilizando modelo de hiperalgesia induzida por carragenina, mostrou que a irradiação acarreta efeito analgésico e antiedematogênico. Contudo, nesse modelo, o efeito analgésico do laser não é mediado pela ativação de receptores opióides periféricos, uma vez que não foi revertido pela administração local de naloxona. Cabe ressaltar ainda, que o equipamento utilizado por esses autores (Laser Hélio-Neônio – 632,8 nm) é indicado para lesões cutâneas, diferentemente do equipamento utilizado no nosso estudo.

Em relação à utilização de diferentes equipamentos, Bjordal et al. (2003)¹²⁰, analisando o efeito da transmissão, através da pele (primeira barreira para o laser), de diferentes tipos de Laser, observaram que a perda de energia para o laser contínuo HeNe (632nm), é de 90%, para o Laser contínuo GaAlAs (820 nm) e o laser infravermelho Nd:YAG (1064 nm), a perda é de 80%, enquanto que para o Laser infravermelho pulsado GaAs (904 nm), é de 50%. Essa diferença deve-se ao pulsar e pode ser atribuído ao fenômeno da fotodegradação. Nesse fenômeno, o primeiro impulso forte “branqueia” (clareia) a barreira opaca do tecido, favorecendo a menor perda de energia na segunda passagem de impulsos¹²¹.

Os resultados presentemente obtidos, em conjunto, indicam que o UST e o LBP, nas nossas condições experimentais, são efetivos no controle da nocicepção induzida pelo pinçamento do nervo isquiático e parcialmente efetivos na recuperação funcional. Estes resultados sugerem ainda, que a terapia Laser é mais efetiva em interferir com os fenômenos nociceptivos e também com as alterações histopatológicas acarretadas pelo esmagamento do nervo isquiático, comparativamente ao UST. Dados de literatura sobre estudos comparativos entre os dois agentes físicos, aplicados em modelos de lesão óssea, musculotendíneas e em

culturas de fibroblastos tem também mostrado diferenças na eficácia desses agentes^{122; 123; 124; 125; 126; 127}. A recuperação funcional e regeneração neuronal foi estudada por Oliveira et al. (2012)¹²⁶, que observaram melhor recuperação neuromotora, após lesão por compressão do nervo isquiático, para a laserterapia, quando comparado à aplicação do ultrassom¹²⁸. Não foram encontrados relatos na literatura atual, dos efeitos UST, comparativamente ao LBP, sobre as alterações histopatológicas e comportamentais (antinocicepção) comparativos, em modelos de lesão nervosa periférica.

Uma vez determinadas as doses efetivas do UST e LBP neste modelo de lesão nervosa, a próxima etapa desse estudo foi verificar se a aplicação conjunta dos dois agentes físicos favoreceria a melhor recuperação funcional dos animais submetidos à lesão.

As terapias combinadas são prática comum no dia a dia do fisioterapeuta, porém poucos são os relatos sobre a utilização conjunta do UST e LBP^{125; 127} no tratamento de diferentes patologias^{122; 127}, não sendo ainda, encontrado relatos sobre a associação dos agentes físicos aplicados à nocicepção e recuperação funcional. Nas nossas condições experimentais, selecionamos as doses de 1.0 W/cm² para o UST e de 6 J para o LBP, que foram aquelas que induziram melhor efeito nos parâmetros presentemente avaliados. Nossos resultados evidenciaram que a aplicação conjunta dos recursos físicos promoveu modificações das alterações histopatológicas. Foram observados aumento maior da quantidade de fibras mielínicas e alteração na morfologia na disposição das fibras, em comparação a aplicação individual. Em comparação ao grupo naive, não foi observada diferença estatisticamente significativa destes parâmetros, demonstrado os efeitos benéficos da terapia combinada. No entanto, em relação à antinocicepção ou recuperação funcional, a aplicação conjunta do Laser e UST não acarretou efeitos diferentes daqueles obtidos após a aplicação individual de cada um dos recursos físicos. Cabe ressaltar que, em relação aos fenômenos nociceptivos, os tratamentos em separado, já haviam causado reversão destes fenômenos. Em relação à função motora, a ausência de recuperação mais significativa deste parâmetro, quando da utilização dos tratamentos em associação, pode ser decorrente do fato do pinçamento do nervo isquiático induzir diminuição marcante das fibras mielínicas, não havendo tempo hábil para o brotamento axonal.

Os receptores opióides contribuem, pelo menos em parte, para o efeito antinociceptivo causado pela aplicação conjunta dos recursos físicos, uma vez que esse efeito foi parcialmente inibido pela naloxona.

Os resultados presentemente obtidos indicam que o pinçamento do nervo isquiático de ratos acarreta fenômenos nociceptivos de longa duração e alterações motoras e

histopatológicas, compatíveis com neuropatia periférica. Os dados sugerem ainda que o UST e o LBP são efetivos no controle deste tipo de dor neuropática e parcialmente efetivos na recuperação funcional. A associação dos recursos físicos mostra-se mais eficaz na regeneração nervosa, podendo conseqüentemente, acarretar melhor recuperação funcional.

6 CONCLUSÃO

O modelo de lesão nervosa periférica utilizado neste estudo (pinçamento do nervo isquiático de ratos), resultou em marcante disfunção motora e nocicepção (hiperalgesia térmica e mecânica, alodinia mecânica), de longa duração. Os fenômenos nociceptivos foram parcialmente inibidos por indometacina, indicando a contribuição de prostanóides para a gênese destes fenômenos. O tratamento com morfina causou antinocicepção, indicando que este tipo de dor neuropática pode ser inibida por essa classe de drogas. Esses dados, em conjunto, sugerem que, nas nossas condições experimentais, o pinçamento do nervo isquiático resultou em um modelo de neuropatia. A aplicação do Ultrassom terapêutico e do Laser de baixa potência é eficaz no controle da dor neuropática resultante do pinçamento do nervo isquiático. A aplicação conjunta destes recursos favorece o processo de regeneração nervosa, podendo contribuir para o restabelecimento da função motora.

REFERÊNCIAS*

- 1 ANDRAUS, R.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. A irradiação local com o laser de baixa potência acelera a regeneração do nervo fibular de ratos. **Acta Ortop. Bras.**, v. 18, n. 3, p. 152-157, 2010.
- 2 ROBINSON, L. R. traumatic injury to peripheral nerves. **Suppl. Clin. Neurophysiol.**, v. 57, p. 173-186, 2004. ISSN 1567-424X (Print) 1567-424X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16124144> >. Aceso em 21/06/2010.
- 3 EVANS, G. R. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. **Anat. Rec.**, v. 263, n. 4, p. 396-404, Aug 1 2001. ISSN 0003-276X (Print) 0003-276X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500817> >. Aceso em 21/06/2010.
- 4 BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgical Focus**, v. 16, n. 5, p. 1-7, 2004. ISSN 1092-0684.
- 5 KÜHLEIN, H. et al. Nerve Injury Evoked Loss of Latexin Expression in Spinal Cord Neurons Contributes to the Development of Neuropathic Pain. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e19270, 2011. ISSN 1932-6203.
- 6 MARTINS, R. S. et al. Mecanismos básicos da regeneração de nervos. **Arq. Bras. Neurocir**, v. 24, n. 1, p. 20-25, 2005. ISSN 0103-5355.
- 7 SILVA, C. K.; CAMARGO, E. A. Mecanismos Envolvidos na Regeneração de Lesões Nervosas Periféricas. **Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 1, 2010. ISSN 2176-9206.
- 8 MAX, M. B. et al. Effects of desipramine, amitriptyline, and fluoxetine on pain in diabetic neuropathy. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 19, p. 1250-1256, 1992. ISSN 0028-4793.
- 9 SERPELL, M. Gabapentin in neuropathic pain syndromes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Pain**, v. 99, n. 3, p. 557-566, 2002. ISSN 0304-3959.
- 10 MEIER, T. et al. Efficacy of lidocaine patch 5% in the treatment of focal peripheral neuropathic pain syndromes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Pain**, v. 106, n. 1-2, p. 151-158, 2003. ISSN 0304-3959.
- 11 MENDONÇA, A. C.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 129, n. 2, p. 183-190, 2003. ISSN 0165-0270.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- ¹² SOBRAL, L. et al. Exercício imediato versus tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese: análise histomorfométrica e funcional. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12, n. 4, p. 311-316, 2008. ISSN 1413-3555.
- ¹³ ATTAL, N. et al. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. **European Journal of Neurology**, v. 13, n. 11, p. 1153-1169, 2006. ISSN 1468-1331.
- ¹⁴ CHAN, Y. S. et al. Using low-intensity pulsed ultrasound to improve muscle healing after laceration injury: an in vitro and in vivo study. **Ultrasound Med. Biol.**, v. 36, n. 5, p. 743-751, May 2010. ISSN 1879-291X (Electronic) 0301-5629 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381949> >. Acesso em 21/06/2010.
- ¹⁵ CRISCI, A. R.; FERREIRA, A. L. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates the regeneration of the sciatic nerve after neurotomy in rats. **Ultrasound Med. Biol.**, v. 28, n. 10, p. 1335-1341, Oct 2002. ISSN 0301-5629 (Print) 0301-5629 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467860> >. Acesso em 21/06/2010.
- ¹⁶ JOHNS, L. D. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. **J. Athl. Train.**, v. 37, n. 3, p. 293-299, Jul 2002. ISSN 1938-162X (Electronic) 1062-6050 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16558674 >. Acesso em 21/06/2010.
- ¹⁷ MOURAD, P. D. et al. Ultrasound accelerates functional recovery after peripheral nerve damage. **Neurosurgery**, v. 48, n. 5, p. 1136, 2001. ISSN 0148-396X.
- ¹⁸ RASO, V. V. et al. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? **J Neurosci Methods**, v. 142, n. 2, p. 185-92, Mar 30 2005. ISSN 1872-678X (Electronic) 0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15698658> >.
- ¹⁹ BAE, C. S.; LIM, S. C.; KIN, K. Y. Effect of GaAS laser on the regeneration of injured sciatic nerves of rat. **In Vivo, Athens**, v. 18, n. 4, p. 489-95, 2004.
- ²⁰ BARBOSA, R. I. et al. Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers Med. Sci.**, v. 25, n. 3, p. 423-430, May 2010. ISSN 1435-604X (Electronic) 0268-8921 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20135336> >. Acesso em 21/06/2010.
- ²¹ FERREIRA, D. M. et al. Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low-level laser therapy on acute inflammatory pain. **Photomed Laser Surg.**, v. 23, n. 2, p. 177-81, 2005.
- ²² SPINNER, M.; SPENCER, P. S. Nerve compression lesions of the upper extremity: a clinical and experimental review. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 104, p. 46, 1974.

- 23 WILLIAMS, P. et al. **Gray anatomia 37. ed**: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1995.
- 24 MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional, 2. a edição, Ed**: Atheneu 1993.
- 25 SCHÜNKE, M. et al. **Prometheus atlas de anatomia: anatomia geral e aparelho locomotor.** 2006. ISBN 8527712180.
- 26 LE BEAU, J. M.; ELLISMAN, M. H.; POWELL, H. C. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. **Journal of Neurocytology**, v. 17, n. 2, p. 161-172, 1988. ISSN 0300-4864.
- 27 DELMOTTE, A. et al. Physiology of the injured peripheral nerve]. **Neuro-Chirurgie**, v. 55, p. S13, 2009. ISSN 0028-3770.
- 28 LUNDBORG, G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. **J. Hand Surg. Am.**, v. 25, n. 3, p. 391-414, May 2000. ISSN 0363-5023 (Print) 0363-5023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10811744> >. Acesso em 21/06/2010.
- 29 SEDDON, H. Three types of nerve injury. **Brain**, v. 66, p. 227-88, 1943
- 30 SUNDERLAND, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain**, v. 74, n. 4, p. 491-516, Dec 1951. ISSN 0006-8950 (Print) 0006-8950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14895767> >. Acesso em 21/06/2010.
- 31 REMPEL, D. M.; DIAO, E. Entrapment neuropathies: pathophysiology and pathogenesis. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 14, n. 1, p. 71-75, 2004. ISSN 1050-6411.
- 32 CHANG, C. J.; HSU, S. H. The effects of low-intensity ultrasound on peripheral nerve regeneration in poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits seeded with Schwann cells. **Ultrasound Med. Biol.**, v. 30, n. 8, p. 1079-1084, Aug 2004. ISSN 0301-5629 (Print) 0301-5629 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15474752> >. Acesso em 21/06/2010.
- 33 CIENA, A. P. et al. Ultra-som terapêutico contínuo térmico em modelo experimental de cialgia. **Fisioter. Pesq.**, p. 173-177, 2009.
- 34 HSIEH, Y. L. Effects of ultrasound and diclofenac phonophoresis on inflammatory pain relief: suppression of inducible nitric oxide synthase in arthritic rats. **Physical Therapy**, v. 86, n. 1, p. 39-49, 2006. ISSN 0031-9023.
- 35 BACKONJA, M. M. Defining neuropathic pain. **Anesthesia & Analgesia**, v. 97, n. 3, p. 785, 2003. ISSN 0003-2999.
- 36 CHONG, M. S.; BAJWA, Z. H. Diagnosis and treatment of neuropathic pain. **J Pain Symptom Manage**, v. 25, n. 5 Suppl, p. S4-S11, May 2003. ISSN 0885-3924 (Print)

- 0885-3924 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694987>>. Acesso em 21/06/2010.
- 37 THACKER, M. A. et al. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. **Anesthesia & Analgesia**, v. 105, n. 3, p. 838, 2007. ISSN 0003-2999.
- 38 BAE, H. J. et al. In-hospital medical complications and long-term mortality after ischemic stroke. **Stroke**, v. 36, n. 11, p. 2441-2445, Nov 2005. ISSN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16224097>>. Acesso em 21/06/2010.
- 39 GJ, B. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on the NMDA-receptor. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 19, n. 1, p. 2-6, 2000. ISSN 0885-3924.
- 40 BARON, A. et al. NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 5, p. 860-871, 2009. ISSN 1350-9047.
- 41 ROCHA FILHO, P. A. S. et al. Gabapentin in the treatment of SUNCT syndrome. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 65, n. 2B, p. 503-505, 2007. ISSN 0004-282X.
- 42 MA, W.; EISENACH, J. C. Morphological and pharmacological evidence for the role of peripheral prostaglandins in the pathogenesis of neuropathic pain. **Eur. J. Neurosci.**, v. 15, n. 6, p. 1037-1047, Mar 2002. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11918652> >. Acesso em 21/06/2010.
- 43 BENOLIEL, R.; ELIAV, E.; TAL, M. Strain-dependent modification of neuropathic pain behaviour in the rat hindpaw by a priming painful trigeminal nerve injury. **Pain**, v. 97, n. 3, p. 203-12, Jun 2002. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044617> > Acesso em 21/06/2010.
- 44 CAVENAGH, J.; GOOD, P.; RAVENSCROFT, P. Neuropathic pain: are we out of the woods yet? **Internal Medicine Journal**, v. 36, n. 4, p. 251-255, 2006. ISSN 1445-5994.
- 45 VISSERS, K. The clinical challenge of chronic neuropathic pain. **Disability & Rehabilitation**, v. 28, n. 6, p. 343-349, 2006. ISSN 0963-8288.
- 46 DWORKIN, R. H. et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 11, p. 1524, 2003.
- 47 GUTIERREZ, V. P. et al. Crotalpine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 594, n. 1-3, p. 84-92, 2008. ISSN 0014-2999.

- 48 FINNERUP, N. et al. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. **Pain**, v. 118, n. 3, p. 289-305, 2005. ISSN 0304-3959.
- 49 STANOS, S. et al. Managment of Chronic pain. **Physical Medicine & Rehabilitation**, 2007.
- 50 FREGNI, F. et al. Estimulação cerebral para o tratamento de dor neuropática. **Revista Psicologia-Teoria e Prática**, v. 9, n. 2, 2009.
- 51 TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da dor neuropatica; Physiopatology of pain neuropatic. **Rev. Med.**, v. 78, n. 2, pt. 2, p. 53-84, 1999. ISSN 0034-8554.
- 52 LEFAUCHEUR, J. P. et al. Motor cortex rTMS reduces acute pain provoked by laser stimulation in patients with chronic neuropathic pain. **Clinical Neurophysiology**, v. 121, n. 6, p. 895-901, 2010. ISSN 1388-2457.
- 53 LORENZINI, L. et al. Laser acupuncture for acute inflammatory, visceral and neuropathic pain relief: An experimental study in the laboratory rat. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 1, p. 159-165, 2010. ISSN 0034-5288.
- 54 GUIRRO, R.; SANTOS, S. A realidade da potência acústica emitida pelos equipamentos de ultra-som terapêutico: uma revisão. **Rev. Fisioter. Univ. São Paulo**, v. 4, n. 2, p. 76-82, 1997.
- 55 SPEED, C. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. **Rheumatology**, v. 40, n. 12, p. 1331-1336, 2001. ISSN 1462-0324.
- 56 TER HAAR, G. Therapeutic ultrasound. **European Journal of Ultrasound**, v. 9, n. 1, p. 3-9, 1999. ISSN 0929-8266.
- 57 MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JÚNIOR, M. J. O efeito do ultra-som em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251-256, 2000.
- 58 WATSON, T. Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. **Ultrasonics**, v. 48, n. 4, p. 321-329, 2008. ISSN 0041-624X.
- 59 BAKER, K. G.; ROBERTSON, V. J.; DUCK, F. A. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. **Physical Therapy**, v. 81, n. 7, p. 1351, 2001. ISSN 0031-9023.
- 60 CHEN, W. Z. et al. Upgraded nerve growth factor expression induced by low-intensity continuous-wave ultrasound accelerates regeneration of neurotometricly injured sciatic nerve in rats. **Ultrasound Med. Biol.**, v. 36, n. 7, p. 1109-1117, Jul 2010. ISSN 1879-291X (Electronic) 0301-5629 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20620698> >. Aceso em 21/06/2010.
- 61 WARDEN, S. J. et al. Ultrasound produced by a conventional therapeutic ultrasound unit accelerates fracture repair. **Physical Therapy**, v. 86, n. 8, p. 1118, 2006. ISSN 0031-9023.

- 62 DA CUNHA, A.; PARIZOTTO, N. A.; VIDAL, B. C. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (tendo calcaneus) of the rat. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 27, n. 12, p. 1691-1696, 2001. ISSN 0301-5629.
- 63 EBENBICHLER, G. R. et al. Ultrasound treatment for treating the carpal tunnel syndrome: randomised “sham” controlled trial. **BMJ**, v. 316, n. 7133, p. 731, 1998. ISSN 0959-8138.
- 64 VAN DER WINDT, D. et al. Therapeutic ultrasound for acute ankle sprains. **The Cochrane Library**, 2009.
- 65 WELCH, V. et al. Therapeutic ultrasound for osteoarthritis of the knee. **Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)**, n. 3, p. CD003132, 2001. ISSN 1469-493X.
- 66 LEWIS, G.; WANG, P.; OLBRICHT, W. **Therapeutic Ultrasound Enhancement of Drug Delivery to Soft Tissues**: American Institute of Physics, 2 Huntington Quadrangle, Suite 1 NO 1, Melville, NY, 11747-4502, USA, 2009. 403-407 p.
- 67 FERRARI, C. et al. Evaluation of therapeutic ultrasound equipments performance. **Ultrasonics**, v. 50, n. 7, p. 704-709, 2010. ISSN 0041-624X.
- 68 MAXWELL, L. Therapeutic ultrasound: Its effects on the cellular and molecular mechanisms of inflammation an repair. **Physiotherapy**, v. 78, n. 6, p. 421-24, 1996.
- 69 NYBORG, W. L. Biological effects of ultrasound: development of safety guidelines. Part II: general review. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 27, n. 3, p. 301-333, 2001. ISSN 0301-5629.
- 70 HONG, C.; LIU, H.; YU, J. Ultrasound thermotherapy effect on the recovery of nerve conduction in experimental compression neuropathy. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 69, n. 6, p. 410, 1988. ISSN 0003-9993.
- 71 KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. J. A Review of Low Level Laser Therapy: Part I: Background, Physiological Effects and Hazards. **Physiotherapy**, v. 77, n. 3, p. 161-168, 1991. ISSN 0031-9406.
- 72 LOW, J.; REED, A. **Electrotherapy explained: principles and practice**. Butterworth-Heinemann Medical, 2000. ISBN 0750641495.
- 73 KARU, T. **Mechanisms of low-power laser light action on cellular level**: Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, 2000. 1-17 p.
- 74 LIRANI, A. P.; LAZARETTI-CASTRO, M. Evidences of physical agents action on bone metabolism and their potential clinical use. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 49, n. 6, p. 891-6, Dec 2005. ISSN 0004-2730 (Print) 0004-2730 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16544010> >. Aceso em 21/06/2010.

- 75 KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **Quantum Electronics, IEEE Journal of**, v. 23, n. 10, p. 1703-1717, 1987. ISSN 0018-9197.
- 76 MONTE-RASO, V. V. et al. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? **J. Neurosci. Methods**, v. 170, n. 2, p. 255-261, May 30 2008. ISSN 0165-0270 (Print) 0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325595> >. Acesso em 21/06/2010.
- 77 RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 111, n. 4, p. 409-419, Sep 1 1957. ISSN 0301-4533 (Print) 0301-4533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13471093> >. Acesso em 21/06/2010.
- 78 CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, p. 55-63, 1994.
- 79 HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, n. 1, p. 77-88, 1988. ISSN 0304-3959.
- 80 DE MEDINACELI, L.; DERENZO, E.; WYATT, R. J. Rat sciatic functional index data management system with digitized input. **Comput Biomed Res**, v. 17, n. 2, p. 185-92, Apr 1984. ISSN 0010-4809 (Print) 0010-4809 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6327185> >. Acesso em 21/06/2010.
- 81 LOWDON, I. M.; SEABER, A. V.; URBANIAK, J. R. An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of de Medinaceli. **J. Neurosci. Methods**, v. 24, n. 3, p. 279-81, Jul 1988. ISSN 0165-0270 (Print) 0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3419210> >. Acesso em 21/06/2010.
- 82 BAIN, J.; MACKINNON, S.; HUNTER, D. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 83, n. 1, p. 129, 1989. ISSN 0032-1052.
- 83 REIS, F. et al. Efeito da terapia com laser de arsenieto de gálio e alumínio (660nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotome seguida de anastomose epineural: análise funcional. **Rev. Bras. Fisioter.**, v. 12, n. 3, p. 215-221, 2008.
- 84 MELLO, L. R. et al. Uso da celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 59, n. 2B, p. 372-379, 2001. ISSN 0004-282X.
- 85 MONTE-RASO, V. V. et al. Uma nova pinça regulável para a produção de lesões por esmagamento do nervo ciático do rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 4, 2009. ISSN 1809-4406.
- 86 FAWEETT, J.; KEYNES, R. J. Peripheral nerve regeneration. **Annual Review of Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 43-60, 1990. ISSN 0147-006X.

- 87 BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgical Focus**, v. 16, n. 5, 2004.
- 88 MAZZER, P. et al. Qualitative and quantitative evaluation of rats acute injuries caused by ischiatic nerve smashing. **Acta. Ortop. Bras.**, v. 14, n. 4, p. 220-224, 2006.
- 89 PACHIONI, C. A. S. et al. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. **Acta. Ortop. Bras.**, v. 14, n. 4, p. 203-7, 2006.
- 90 MONTE-RASO, V. V. et al. Uma nova pinça regulável para a produção de lesões por esmagamento do nervo ciático do rato; A new adjustable pinch designed for producing crush nerve injuries in the sciatic nerve of rats. **Acta Ortop. Bras**, v. 17, n. 4, p. 236-238, 2009. ISSN 1413-7852.
- 91 DECOSTERD, I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, n. 2, p. 149-158, 2000. ISSN 0304-3959.
- 92 KRAYCHETE, D. C.; GOZZANI, J. L.; KRAYCHETE, A. C. Dor neuropática- aspectos neuroquímicos. 2008. ISSN 0034-7094.
- 93 CAMPBELL, W. W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clin. Neurophysiol.**, v. 119, n. 9, p. 1951-1965, Sep 2008. ISSN 1388-2457 (Print) 1388-2457 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18482862> >.
- 94 EVANS, G. R. Approaches to tissue engineered peripheral nerve. **Clin. Plast. Surg.**, v. 30, n. 4, p. 559-563, viii, Oct 2003. ISSN 0094-1298 (Print) 0094-1298 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14621303> >. Aceso em 21/06/2010.
- 95 ROSEN, B.; LUNDBORG, G. A model instrument for the documentation of outcome after nerve repair. **J. Hand Surg. Am.**, v. 25, n. 3, p. 535-543, May 2000. ISSN 0363-5023 (Print) 0363-5023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10811759> >. Aceso em 21/06/2010.
- 96 LAGO, N.; NAVARRO, X. Correlation between target reinnervation and distribution of motor axons in the injured rat sciatic nerve. **Journal of Neurotrauma**, v. 23, n. 2, p. 227-240, 2006. ISSN 0897-7151.
- 97 VALERO-CABRÉ, A. et al. Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n. 1, p. 95-108, 2004. ISSN 0897-7151.
- 98 PIESLA, M. J. et al. Abnormal gait, due to inflammation but not nerve injury, reflects enhanced nociception in preclinical pain models. **Brain Research**, v. 1295, p. 89-98, 2009. ISSN 0006-8993.
- 99 GORIO, A.; MARINI, P.; ZANONI, R. Muscle reinnervation--III. Motoneuron sprouting capacity, enhancement by exogenous gangliosides. **Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 417-429, 1983. ISSN 0306-4522.

- ¹⁰⁰ KINGERY, W. S. A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. **Pain**, v. 73, n. 2, p. 123-139, 1997. ISSN 0304-3959.
- ¹⁰¹ WATSON, C. P. N. et al. Nortriptyline versus amitriptyline in postherpetic neuralgia. **Neurology**, v. 51, n. 4, p. 1166-1171, 1998. ISSN 0028-3878.
- ¹⁰² MACFARLANE, B. et al. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 75, n. 1, p. 1-19, 1997. ISSN 0163-7258.
- ¹⁰³ COLOMBO, B.; ANNOVAZZI, P. O. L.; COMI, G. Medications for neuropathic pain: current trends. **Neurological Sciences**, v. 27, p. 183-189, 2006. ISSN 1590-1874.
- ¹⁰⁴ ROWBOTHAM, M. C. et al. Oral opioid therapy for chronic peripheral and central neuropathic pain. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 13, p. 1223-1232, 2003. ISSN 0028-4793.
- ¹⁰⁵ CHU, L. F.; CLARK, D. J.; ANGST, M. S. Opioid tolerance and hyperalgesia in chronic pain patients after one month of oral morphine therapy: a preliminary prospective study. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 1, p. 43-48, 2006. ISSN 1526-5900.
- ¹⁰⁶ HSIEH, Y. L. Reduction in induced pain by ultrasound may be caused by altered expression of spinal neuronal nitric oxide synthase-producing neurons. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 86, n. 7, p. 1311-1317, 2005. ISSN 0003-9993.
- ¹⁰⁷ LOPES, Á. S. **Estudo da antinociceção induzida pelo ultrassom terapêutico em um modelo experimental de dor neuropática trigeminal, em ratos**. 2005. (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ¹⁰⁸ CRISCI, A. R.; FERREIRA, A. L. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates the regeneration of the sciatic nerve after neurotomy in rats. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 28, n. 10, p. 1335-1341, 2002. ISSN 0301-5629.
- ¹⁰⁹ AKHLAGHI, Z. et al. The Effects of Altered Ultrasound Parameters on the Recovery of Sciatic Nerve Injury. **Iranian Biomedical Journal**, v. 16, n. 2, p. 107, 2012.
- ¹¹⁰ DARVAS, L.; EGYEDI, L. Comparison of ultrasonic therapy with other physical methods; results of combined therapies. **Orv. Hetil**, v. 97, n. 40, p. 1112-1114, Sep 30 1956. ISSN 0030-6002 (Print) 0030-6002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13388348> >. Acesso em 21/06/2010.
- ¹¹¹ GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; ROCHKIND, S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. **Muscle Nerve**, v. 31, n. 6, p. 694-701, Jun 2005. ISSN 0148-639X (Print) 0148-639X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15742372> >. Acesso em 21/06/2010.

- ¹¹² ROCHKIND, S.; GEUNA, S.; SHAINBERG, A. Chapter 25: Phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 87, p. 445-464, 2009. ISSN 0074-7742 (Print) 0074-7742 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19682654> >. Acesso em 21/06/2010.
- ¹¹³ ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N. A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 237-249, 2012. ISSN 0268-8921.
- ¹¹⁴ SANTOS, A. P. et al. Functional and morphometric differences between the early and delayed use of phototherapy in crushed median nerves of rats. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 2, p. 479-486, 2012. ISSN 0268-8921.
- ¹¹⁵ HSIEH, Y. L. et al. Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: Possible involvements in hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α). **Journal of Comparative Neurology**, v. 520, n. 13, p. 2903-2916, 2012. ISSN 1096-9861.
- ¹¹⁶ SAMOILOVA, K. A. et al. Role of nitric oxide in the visible light-induced rapid increase of human skin microcirculation at the local and systemic level: I. Diabetic patients. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 5, p. 433-442, 2008. ISSN 1549-5418.
- ¹¹⁷ TUNER, J.; HODE, L.; ROCHKIND, S. **Low Level Laser Therapy: Clinical Practice and Scientific Background: a Guide for Research Scientists, Doctors, Dentists, Veterinarians, and Other Interested Parties Within the Medical Field.** Prima books, 1999. ISBN 9163076160.
- ¹¹⁸ HAGIWARA, S. et al. GaAlAs (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, n. 10, p. 797-802, 2007. ISSN 1096-9101.
- ¹¹⁹ MEIRELES, A. et al. Role of endogenous opioids in 820 nm low power laser analgesia in the knees of Wistar rats. **Revista Dor**, v. 13, n. 2, p. 152-155, 2012. ISSN 1806-0013.
- ¹²⁰ BJORDAL, J. M. et al. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. **Australian Journal of Physiotherapy**, v. 49, n. 2, p. 107-122, 2003. ISSN 0004-9514.
- ¹²¹ KUSNETZOW, A. et al. The photobleaching sequence of a short-wavelength visual pigment. **Biochemistry**, v. 40, n. 26, p. 7832-7844, 2001. ISSN 0006-2960.
- ¹²² DEMIR, H. et al. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser+ultrasound treatments in experimental tendon healing. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 35, n. 1, p. 84-89, 2004. ISSN 1096-9101.

- ¹²³ DEMIR, H. et al. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, v. 41, p. 721-728, 2004. ISSN 0748-7711.
- ¹²⁴ LIRANI-GALVÃO, A. P.; JORGETTI, V.; DA SILVA, O. L. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomedicine and Laser Therapy**, v. 24, n. 6, p. 735-740, 2006. ISSN 1549-5418.
- ¹²⁵ NUSSBAUM, E. L.; BIEMANN, I.; MUSTARD, B. Comparison of ultrasound/ultraviolet-C and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. **Physical Therapy**, v. 74, n. 9, p. 812-823, 1994. ISSN 0031-9023.
- ¹²⁶ OLIVEIRA, R. F. D. et al. Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 1, p. 6-9, 2008. ISSN 1549-5418.
- ¹²⁷ SAUNDERS, L. Laser versus Ultrasound in the Treatment of Supraspinatus Tendinosis: Randomised controlled trial. **Physiotherapy**, v. 89, n. 6, p. 365-373, 2003. ISSN 0031-9406.
- ¹²⁸ OLIVEIRA, F. et al. Laser action and therapeutic ultrasound in peripheral nerve regeneration. **Acta Ortop. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 98-103, 2012.